



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

SIMONE BONECKER

*Estudo da resposta molecular de pacientes com Leucemia
Mieloide Crônica a diferentes modalidades terapêuticas e dos
mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores
tirosina quinase e progressão na doença*

Orientador(es): Dra. Ilana Zalcborg Renault
Dr. Martin Bonamino

RIO DE JANEIRO
2018



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

SIMONE BONECKER

*Estudo da resposta molecular de pacientes com Leucemia
Mieloide Crônica a diferentes modalidades terapêuticas e dos
mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores
tirosina quinase e progressão na doença*

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Oncologia

Orientador (es): Dra. Ilana Zalcborg Renault
Dr. Martin Bonamino

RIO DE JANEIRO
2018

B712e Bonecker, Simone

Estudo da resposta molecular de pacientes com leucemia mieloide crônica a diferentes modalidades terapêuticas e dos mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores tirosina quinase e progressão na doença / Simone Bonecker. – Rio de Janeiro (RJ), 2018.
190 f.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Orientadora: Dr^a Ilana Zalberg Renault.
Co-orientador: Dr. Martin Bonamino.

Referências Bibliográficas f. 141-157

1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Resposta à inibidores tirosina quinase. 3. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. 4. Mutaç o composta. 5. Sequenciamento de próxima geração I. Renault, Ilana Zalberg (Orient.). II. Bonamino, Martin (Co-Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDU 616.9941906



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

SIMONE BONECKER

*Estudo da resposta molecular de pacientes com Leucemia
Mieloide Crônica a diferentes modalidades terapêuticas e dos
mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores
tirosina quinase e progressão na doença*

Orientador (es): Dra. Ilana Zalcborg Renault
Dr. Martin Bonamino

EXAMINADORES:

Dra. Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Dra. Nathalia de Oliveira Meireles

Dr. André Felipe Andrade dos Santos

Dr. Angelo Maiolino

Dra. Patrícia Abrão Possik

Dra. Cynthia Chester Cardoso

RIO DE JANEIRO

2018

À minha família que sempre acreditou e me apoiou nesta longa jornada e aos pacientes com LMC que ainda não respondem a terapia – a eles dedico essa obra.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, qualquer palavra escrita aqui será pouco para expressar minha gratidão e agradecimento por todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta tese.

À Deus, que não deixou que me faltasse saúde e me guiou ao longo desta jornada.

A minha orientadora Ilana que nos momentos mais difíceis me deu a mão e me mostrou o caminho certo. Sua maior qualidade, entre muitas, é enxergar as qualidades, o lado bom das pessoas, é te mostrar no que você é bom nos momentos de fraqueza para te dar força. Ao lado dela desistir não é uma opção. Obrigada! Sua força, foco, determinação e administração do tempo são fontes de aprendizado para mim.

Ao meu orientador Martin que com a sua sabedoria contribuiu muito para o meu crescimento profissional e enriqueceu esta tese. Sua dedicação profissional, seu entusiasmo com a ciência são inspiradora. Agradeço ainda pelos seminários com frutíferas discussões científicas.

Ao programa de Pós Graduação em Oncologia pelas excelentes aulas e discussões proporcionadas; À toda equipe técnico-administrativa do Programa de Pós-graduação em Oncologia: Rodrigo, Danielle e Andreia, por todo suporte e esclarecimento nos mais diversos momentos.

Ao INCa, MS, CNPq, INCT para o controle do câncer, FAPERJ pelo apoio técnico e financeiro para execução deste trabalho.

À minha família pelo apoio incondicional. Aos meus filhos: Murilo, Miguel e Nicholas, agradeço pela paciência em meus momentos ausentes, pela alegria e sorrisos que me dão força para continuar em frente. Por vocês e com vocês me esforço para ser uma pessoa melhor a cada dia. Ao meu marido Bruno, meu companheiro, meu amigo, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e encorajando a seguir em frente. Que fez deste um sonho dele. Ao seu lado as vitórias são comemoradas em dobro e as derrotas são divididas pela metade. A trajetória da vida é mais prazerosa ao lado de vocês!

Aos meus pais, biólogos que escolhi me inspirar. Eles são minha base, minha fortaleza, meus valores, meus exemplos pessoal e profissional. Esta só foi possível por tê-los ao meu lado. Eles que fizeram da minha ausência menos dolorosa e alegre para os meus filhos. Lembro-me vagamente e sem traumas das horas investidas na escrita de suas teses de doutorado nas máquinas de escrever e a busca incansável em bibliotecas atrás de artigos científicos atualizados. Sei que hoje a vida está mais fácil e reconheço, graças a vocês, as gerações anteriores a minha, facilitaram o presente. Gratidão, reconhecimento, compaixão, empatia, são alguns dos valores passados.

À minha irmã, minha amiga e companheira, que me sempre me ajudou e esteve ao meu lado, me defendendo. Aos meus sobrinhos, Felipe e Pedro, nossa companhia inseparável que alegre e agita nossas vidas.

Às minhas avós: Alcina (*in memorium*) e Marly, que nunca me deixaram faltar um colo de vó, uma palavra de consolo nos momentos de desespero, sempre me confortando com palavras sábias provindas da voz da experiência.

Às minhas sobrinhas Isabella e Ana Lucia, nossas companheiras de viagens e aventuras.

À minha sogra e cunhadas, especialmente a Katia, pela ajuda.

À toda minha família, primas, primos, tios e tias, sobrinhos, sobrinhas e afilhadas por fazerem minha vida mais feliz.

Ao Diego, meu grande amigo, que me levou ao INCA e me apresentou a Ilana e que com o seu humor inigualável sempre me fez sorrir, sem contar sua inteligência ímpar que sempre foram de grande valia para este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Andrea, Bárbara, Danielle, Fátima, Liana, Luciana, Michelle, Natália, Rafaela, Rafaella, Telma e Vivian.

Aos meus amigos da Pesquisa: Mayra, Tonho e Luciana.

Às minhas amigas inseparáveis da faculdade: Amanda, Camilla, Carol, Cris, Lu, Mari e Mariana.

À minha primeira orientadora, Dra. Rosana Gentile, aos meus orientadores do mestrado Dr. Pedro Cabello e Dr. Rodrigo Moura Neto, por terem me dado a oportunidade, por terem acreditado em mim e por todo o ensinamento.

“o que eu sou, sou em par,
Não cheguei sozinho.
(Lenine – Castanho)



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Estudo da resposta molecular de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica a diferentes modalidades terapêuticas e dos mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores tirosina quinase e progressão na doença

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

SIMONE BONECKER

A incidência da leucemia mielóide crônica (LMC) aumenta com a idade e é caracterizada pela translocação entre os cromossomos 9 e 22, originando o gene de fusão *BCR-ABL1* que traduz uma oncoproteína constitutivamente ativa. Essa particularidade permitiu o desenvolvimento do primeiro inibidor alvo específico, reduzindo o número de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Porém, a resistência aos inibidores ainda é um problema clínico crescente, assim como a recaída ao TCTH. Por isso, este trabalho propõe-se a avaliar a resposta molecular de pacientes com LMC submetidos a diferentes terapias (inibidor tirosina quinase (ITK) e TCHT) e os mecanismos genéticos subjacentes à resistência e a progressão. Para que os objetivos propostos fossem alcançados, a coorte inicial dos pacientes foi subdividida em subcoortes com amostras bem caracterizadas clínico e molecularmente. O PCR em tempo real (RT-qPCR) foi utilizado para no monitoramento da doença e para os pacientes pós-TCTH, as amostras foram ainda analisadas por PCR digital (ddPCR) para comparação de metodologias. Clonagem e sequenciamento direto foram utilizados para detecção de múltiplas mutações e sequenciamento de próxima geração alvo específico para identificação de mutação *BCR-ABL1* independentes. Entre os pacientes adultos, 69% foram classificados como respondedores ótimos a terapia e valores $\leq 10\%$ *BCR-ABL1*^{EI} aos 3 meses após início do imatinibe foram associados a melhor prognóstico, corroborando dados da literatura. Nos 21 pacientes pediátricos a %*BCR-ABL1* aos 3 meses também foi associado a um melhor prognóstico, sendo raros os trabalhos avaliando este parâmetro em pacientes com <18 anos. Entre os 74 pacientes que falharam ao imatinibe e trocaram para 2ITK, melhor prognóstico foi associado nos que reduziram a carga leucêmica em ≤ 35 dias. Os poucos trabalhos avaliando redução da carga leucêmica na LMC, utilizaram ITK em primeira linha, sendo este, até o nosso conhecimento, o primeiro avaliado em pacientes com 2ITK. Nos pacientes pós-TCTH com valores $>0,06\%$ *BCR-ABL1*^{EI} foi observado uma maior probabilidade de recaída. A metodologia de ddPCR foi mais sensível e o RT-qPCR mais específico. Entre os pacientes com múltiplas mutações, 66,7% eram mutações compostas e o restante policlonal. Mutações não detectadas por Sanger (antes da clonagem) foram frequentes e na maioria sinônimas, poucos clones abrigavam mutações não-sinônimas. Sugerindo, que a célula tolere um número limitado de mutações de sentido trocado no domínio quinase. Finalmente, as mutações *BCR-ABL1* independentes foram avaliadas em amostras pré e pós-progressão, sendo detectadas quatro mutações, três após a progressão na doença. Apesar dos marcos de resposta já estabelecidos, marcadores precoces de resposta sugeridos neste estudo podem auxiliar ao clínico um melhor acompanhamento dos pacientes que não estão evoluindo como respondedores ótimos dentro dos tempos estabelecidos. Ainda metodologias mais sensíveis, como o ddPCR não apresentou benefício para o monitoramento pós-TCTH, sendo a RT-qPCR ainda a mais indicada. O estudo de mutações mostrou a complexidade observada com metodologias capazes de analisar individualmente cada clone, sendo esta aplicação importante na detecção em baixa sensibilidade de clones portadores de mutações insensíveis aos ITKs disponíveis. Genes com mutações *BCR-ABL1* independentes podem auxiliar na melhor compreensão da progressão da doença.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Estudo da resposta molecular de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica à diferentes modalidades terapêuticas e dos mecanismos genéticos subjacentes à resistência aos inibidores tirosina quinase e progressão na doença

ABSTRACT

Tese de Doutorado

SIMONE BONECKER

The incidence of chronic myeloid leukemia (CML) increases with age and is characterized by translocation between chromosomes 9 and 22, giving rise to the *BCR-ABL1* fusion gene which translates into onco-protein which is constitutively activated. This particularity allowed the development of the first specific target inhibitor, reducing the number of patients undergoing hematopoietic stem cells transplant (HSCT). However, the resistance to inhibitors is still a growing clinical problem, as is relapse to HSCT. Therefore, the aim of this study was to evaluate the molecular response of patients with CML undergoing different therapies (tyrosine kinase inhibitor (TKI) and HSCT) and the genetic mechanisms underlying resistance and progression. For that, the initial cohort of patients was subdivided into sub-cohort with well-characterized clinical and molecular samples. Real-time PCR (RT-qPCR) was used for monitoring CML patients with TKI. For post-HSCT patients, samples were analyzed by digital PCR (ddPCR) in order to compare the methodologies. Cloning and Sanger sequencing were used to detect multiple mutations and target gene panels by next-generation sequencing to identify mutation in genes *BCR-ABL1* independent. Among adult patients, 69% had optimal response and $\leq 10\%$ *BCR-ABL1*^{IS} values at 3 months after imatinib initiation were associated with better prognosis, corroborating literature data. 74 patients who failed to imatinib and switched to 2TKI with halving time ≤ 35 days were also associated with better prognosis. There are few studies evaluating halving time in CML, but only for first line therapy, being this work, to our knowledge, the first evaluated in patients with 2TKI. In 21 pediatric patients the %*BCR-ABL1*^{IS} levels at 3 months was also associated with a better prognosis. For patients post-HSCT with $> 0.06\%$ *BCR-ABL1*^{IS} had higher probability of relapse. ddPCR methodology was more sensitive and RT-qPCR more specific. Among the patients with multiple mutations, 66.7% were compound mutation and remaining polyclonal. The presence of mutations, not previously detected by Sanger, was frequent and in the majority synonyms, the clones harbored missense mutations. Suggesting that cell tolerates a limited number of missense mutations in the kinase domain. Finally, mutations *BCR-ABL1* independent were evaluated in before and after progression samples. Four different non-synonymous variants were observed and three were on post-progression samples. Despite established response outcomes, the early response markers, suggested in this study, may help the clinician better follow-up of patients who are not evolving to be classified as a good responder within the established times. Even more sensitive methodologies such as ddPCR did not represent benefit to monitor CML patients pos HSCT, being RT-qPCR the most suitable. The study of mutations showed the complexity observed with methodologies able to analyze individually each clone, being this application important in the detection in low sensitivity of clones carrying mutations insensible to the available TKIs. *BCR-ABL1* independent *mutation* could help better understanding the progression of the disease.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Incidência anual da leucemia mieloide crônica..	1
Figura 1.2: Ilustração do processo de translocação cromossômica e formação do cromossomo Filadélfia.	2
Figura 1.3: Representação da quebra dos gene <i>ABL1</i> e <i>BCR</i> e os tipos de transcritos mais frequentes na doença.....	5
Figura 1.4: Representação gráfica da porcentagem de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas classificados por doença..	7
Figura 1.5: Efeitos biológicos atribuídos ao interferon-alfa.....	8
Figura 1.6: Curva de sobrevida dos pacientes com leucemia mielóide crônica ao longo do tempo para diferentes terapias..	10
Figura 1.7: Resposta ao tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores tirosina quinase..	15
Figura 1.8: Resultado do RT-qPCR de pacientes com leucemia mieloide crônica ao diagnóstico..	21
Figura 1.9: Mecanismos de resistência aos inibidores tirosina quinase em pacientes com leucemia mieloide crônica..	23
Figura 1.10: Classificação das mutações com relação a localização no clone do domínio quinase do <i>ABL1</i> ..	26
Figura 3.1: Desenho do Estudo.....	35
Figura 3.2: Limite de detecção do número de cópias de <i>BCR-ABL1</i> pela metodologia de RT-qPCR..	50
Figura 3.3: Regressão linear do ensaio de variabilidade intraensaio para detecção do gene <i>ABL1</i> e <i>BCR-ABL1</i> por RT-qPCR.	54
Figura 3.4: Níveis de % <i>BCR-ABL1</i> ^{EI} após 3, 6 e 12 meses do início da terapia com imatinibe.....	58
Figura 3.5: Curva ROC com o índice de Younden..	61
Figura 3.6: Níveis de % <i>BCR-ABL1</i> ^{EI} após a troca para o 2ITK (basal) e 3 meses após o início do tratamento com 2ITK.....	63
Figura 3.7: Curvas de sobrevida dos pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores de segunda geração.....	65
Figura 3.8: Resposta citogenética e molecular pacientes pediátricos com leucemia mieloide crônica..	70
Figura 3.9: Resultado das amostras de pacientes com leucemia mieloide crônica após o transplante de células tronco hematopoiéticas por três metodologias: ddPCR	

(<i>droplet digital PCR</i>), RT-qPCR (PCR em tempo real por retrotranscrição) e Nested PCR.....	77
Figura 3.10: Comparação do resultado de amostras de pacientes com leucemia mieloide crônica submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas por três metodologias: ddPCR (<i>droplet digital PCR</i>), RT-qPCR (PCR em tempo real por retrotranscrição) e Nested PCR.	78
Figura 3.11: Correlação entre os ensaios quantitativos de ddPCR e RT-qPCR, na qual cada ponto representa a média das replicatas de uma amostra. A) <i>BCR-ABL1</i> ; B) <i>ABL1</i> e c) <i>BCR-ABL1^{EI}</i>	79
Figura 3.12: Perfil do grupos de pacientes de acordo com os níveis de transcritos detectáveis após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH).....	81
Figura 3.13: Porcentagem de pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao TCTH (transplante de células-tronco hematopoiética) classificados por grupos.	82
Figura 3.14: Curva ROC com índice de Youden para avaliar recaída ao transplante de células tronco hematopoiéticas em pacientes com leucemia mieloide crônica. ...	83
Figura 3.15: Porcentagem de pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao transplante de células – tronco hematopoiéticas classificados de acordo com o valores de 0,06% <i>BCR-ABL1^{EI}</i>	84
Figura 4.1: Critérios para solicitar a pesquisa de mutação no domínio quinase do <i>ABL1</i> para pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores tirosina quinase.....	95
Figura 4.2: Desenho de estudo.	96
Figura 4.3: Representação do vetor pCR™4-TOPO.	97
Figura 4.4: Perfil das possíveis mutações encontradas no domínio quinase do gene <i>ABL1</i> de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica após o sequenciamento de cada clone.....	102
Figura 4.5: Resultado dos clones com mutações múltiplas no domínio quinase do <i>ABL1</i> de um único paciente com leucemia mieloide crônica.....	111
Figura 4.6: Resultado da análise de mutação após clonagem da região do domínio quinase (DQ) <i>ABL1</i> e sequenciamento de Sanger de cinco amostras sequenciais	113
Figura 5.1: Desenho de estudo.	119
Figura 5.2: Desenho experimental.	120

Figura 5.3: Critérios de exclusão de variantes para posterior avaliação do impacto biológico.	127
Figura 5.4: Cobertura vertical de fragmento para cada amostra.	133
Figura 5.5: Número absoluto de variante por amostra..	135

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Classificação da resposta terapêutica de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica em uso de inibidor de 1ª ou 2ª linha de inibidor (1º ITK e 2º ITK), considerando o tempo é dado após o início da terapia.	17
Tabela 1.2: Critérios de falha ao tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica em uso de inibidor tirosina quinase tanto em 1ª linha de tratamento (1 ITK) quanto em segunda linha (2 ITK), após o início do inibidor.....	22
Tabela 1.3: Mutações no domínio quinase de ABL1 insensíveis aos inibidores.....	25
Tabela 3.1: Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes com leucemia mielóide crônica para cada estudo.	36
Tabela 3.2: Definição das fase da doença segundo as recomendações internacionais do <i>European Leukemia Net</i> (ELN).	38
Tabela: 3.3: Fórmulas matemáticas usadas para calcular os diferentes escores prognósticos.....	39
Tabela 3.4: Resultado da combinação entre diferentes concentrações de iniciadores e sondas.....	49
Tabela 3.5: Avaliação do <i>threshold</i> automático para cada gene.	49
Tabela 3.6: Ensaio de especificidade analítica pela metodologia de RT-qPCR e ddPCR, para a detecção dos genes <i>ABL1</i> e <i>BCR-ABL1</i>	51
Tabela 3.7: Representação tabular dos valores de Cq e número de transcritos, tanto do gene de referência (<i>ABL1</i>) quanto do gene alvo (<i>BCR-ABL1</i>) das amostras positiva e negativa analisadas em quadriplicata em cinco dias consecutivos.	52
Tabela 3.8: Ensaio de especificidade e sensibilidade ao diagnóstico de pacientes com leucemia mielóide crônica pela metodologia de RT-qPCR.....	54
Tabela 3.9: Desvio padrão de cada amostra no ensaio de variabilidade interensaio pela metodologia de RT-qPCR.....	55
Tabela 3.10: Característica clínica da subcoorte de pacientes adultos com leucemia mielóide crônica.	57
Tabela 3.11: Valor prognóstico da resposta molecular aos 3 meses após início da terapia em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com imatinibe.	59
Tabela 3.12: Característica clínica dos pacientes com leucemia mielóide crônica que falharam a terapia com imatinibe e foram para tratados com inibidores de segunda linha.....	60

Tabela 3.13: Correlação entre a exposição prévia ao imatinibe e % de <i>BCR-ABL</i> ^{1E1} antes da troca para inibidores de segunda geração e o tempo de redução da carga leucêmica, em dias, em pacientes com leucemia mieloide crônica.....	62
Tabela 3.14: Correlação entre os níveis de transcritos após início da terapia com inibidores de segunda geração e o tempo de redução da carga leucêmica, em dias, nos pacientes com leucemia mieloide crônica.	64
Tabela 3.15: Características clínicas dos pacientes pediátricos com leucemia mieloide crônica.	67
Tabela 3.16: Correlação entre alcance de resposta molecular em pacientes com leucemia mielóide crônica e gênero e parâmetros clínicos.	71
Tabela 3.17: Valor prognóstico da % <i>BCR-ABL</i> ^{1E1} aos 3 meses após o início da terapia em pacientes com leucemia mieloide crônica.	72
Tabela 3.18: Comparação das característica clínicas e moleculares dos pacientes com leucemia mieloide crônica e o transcrito ao diagnóstico.....	73
Tabela 3.19: Características clínicas dos pacientes com leucemia mieloide crônica que foram submetidos ao transplante de células – tronco hematopoiéticas.	75
Tabela 3.20: Características clínicas dos pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao transplante de célula-tronco hematopoiética (TCTH).	76
Tabela 4.1: Número de clones analisados para cada amostra com múltiplas mutações.....	100
Tabela 4.2: Características clínicas de pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de múltiplas mutações no domínio quinase do ABL1.....	104
Tabela 4.3: Descrição das mutações identificadas nos pacientes com leucemia mieloide crônica / resultado de cada amostra por clones sequenciados.....	106
Tabela 4.4: Número absoluto das mutações identificadas em pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de mutações múltiplas em cada clone sequenciado.....	108
Tabela 4.5: Percentual de nucleotídeo envolvido mutações pontuais com troca de sentido observadas nos clones da região do domínio quinase do ABL1 de pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de mutações múltiplas.....	109
Tabela 5.1: Representação dos 36 genes analisados no painel alvo dirigido por sequenciamento de próxima geração discriminado por suas atividades biológicas.	122
Tabela 5.2: Parâmetros da qualidade dos dados gerados por amostra em cada sequenciamento de próxima geração.	130

Tabela 5.3: Identificação dos fragmentos com menor e maior cobertura vertical do painel alvo específico sequenciados.	131
Tabela 5.4: Identificação das mutações encontradas nas amostras pré pós – progressão para fases mais avançadas da leucemia mieloide crônica.	136

Siglas

μ -BCR = micro - *breakpoint cluster region*

AAS = Anemia Aplástica Severa

ACC = do inglês, *Clonal cytogenetic abnormalities* (= anormalidades citogenética clonal)

AUC = do inglês, *Area Under ROC Curve* (= área dentro da curva ROC)

CB = crise blástica

cDNA = DNA complementar

ddPCR = do inglês, *droplet digital PCR* (= PCR digital em gotas)

DLI = do inglês, *donor lymphocyte infusion* (=infusão de linfócitos do doador)

DQ = domínio quinase

EAC = do inglês, *European Against Cancer* (= grupo europeu contra o câncer)

EI = Escala Internacional

ELN = do inglês, *European Leukemia Net*

EMR = do inglês, *Early Molecular Response* (= resposta molecular precoce)

FA = fase aguda

FC = fase crônica

IFN-alfa = interferon - alfa

INDELS = inserção / deleção;

ITK = inibidor tirosina quinase

kD = quilo dalto

LB = Linfoma de Burkitt

LH = Linfoma de Hodgkin

LLA = Leucemia Linfoide Aguda

LMA = Leucemia Mieloide Aguda

LMC = Leucemia Mieloide Crônica

LNC = Leucemia Neutrófila Crônica

LNH = Linfoma não Hodgkin

LoD = do inglês, *Limit of Detection* (= Limite de Detecção)

LoQ = do inglês, *Limit of Quantification* (= Limite de Quantificação)

LPA = Leucemia Promielocítica Aguda

M-BCR = *major- breakpoint cluster region*

m-BCR = minor - *breakpoint cluster region*

MDR = do inglês, *multiple drug resistance* (= resitência a múltiplas drogas)

MIQE = do inglês, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (= Informação mínima para publicação de experimentos com PCR quantitativo em tempo real)

MNVs = do inglês, *multiple nucleotide variation* (= variação múltiplas de nucleotídeos)

MO = medula óssea

MP = Mielofibrose Primária

pb = do inglês, *pair base* (= pares de base)

PCR = reação de polimerase em cadeia

PV = Policitemia Vera

RCgC = resposta citogenética completa

RHC = resposta hematológica completa

RM = resposta molecular

RMAm = RNA mensageiro

RMC = resposta molecular completa

RMM = resposta molecular maior

ROC = do inglês, *Receiver operating characteristic*

rpm = rotações por minuto

RT-qPCR = PCR quantitativa em tempo real por retrotranscrição

SG = sobrevida global

SH = domínio de homologia SRC

SLE = sobrevida livre de eventos

SLP = sobrevida livre de progressão

SMD = Síndrome Mielodisplásica

SNV = do inglês *single nucleotide variantion* (= variação de nucleotídeo único);

SP = sangue periférico

TCTH = transplante de células-tronco hematopoiéticas

TE = Trombocitemia Essencial

UTR = do inglês *untranslated region* (= região não traduzida)

WHO = do inglês, *world health organization* (OMS = Organização Mundial da Saúde)

Sumário

Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiv
Siglas.....	xvii
1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1) EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	1
1.2) PATOGÊNESE.....	2
1.3) Clínica da LMC.....	3
Gene BCR-ABL1 e a P210 ^{BCR-ABL1}	4
1.4) TRATAMENTO.....	6
1.4.1) Transplante células – tronco hematopoiéticas (TCTH).....	6
1.4.2) Interferon –Alfa (INF- α).....	8
1.4.3) Imatinibe.....	9
1.4.4) Dasatinibe.....	10
1.4.5) Nilotinibe.....	11
1.4.6) Ponatinibe.....	12
1.4.7) Imatinibe Genérico.....	12
1.4.8) Descontinuação do Medicamento.....	13
1.5) RESPOSTA AO TRATAMENTO.....	14
1.5.1) Respostas Moleculares – RM ^{4.0} , RM ^{4.5} E RM ^{5.0}	18
1.5.2) Respostas precoces.....	19
1.5.2.1) Redução pela metade dos níveis de transcritos (Halving time).....	20
1.6) DIAGNÓSTICO.....	21
1.7) MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	22
1.7.1) Mecanismo Genético da Resistência: BCR-ABL1 dependentes.....	24
1.7.2) Mecanismos genéticos da resistência: BCR-ABL1 independente.....	28
1.8) JUSTIFICATIVA.....	30
2) OBJETIVO GERAL.....	32
3) Parte I: Respostas na LMC.....	33
3.1) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	33
3.2) METODOLOGIA.....	34
3.2.1) Pacientes e desenho do estudo.....	34
3.2.2) Definições.....	37
3.2.3) Método.....	44
3.2.4) Cálculo da redução da carga leucêmica pela metade.....	47
3.2.5) Análises estatísticas.....	48

3.3)	RESULTADOS.....	49
3.3.1)	Padronização das metodologias quantitativas.....	49
3.3.2)	Resposta molecular da subcoorte de Adultos.....	56
3.3.3)	Resposta dos pacientes que trocaram de ITK.....	60
3.3.4)	Resposta dos pacientes com LMC pediátricos.....	66
3.3.5)	Resposta dos pacientes submetidos ao TCTH.....	75
3.4)	DISCUSSÃO.....	85
3.4.1)	Pacientes adultos com LMC.....	85
3.4.2)	Estudo do halving time em pacientes em uso do 2ITK.....	87
3.4.3)	Pacientes pediátricos com LMC.....	88
3.4.4)	Pacientes adultos submetidos ao TCTH.....	91
4)	Parte II - Mecanismos de resistência <i>BCR-ABL1</i> dependentes.....	94
4.1)	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	94
4.2)	METODOLOGIA.....	95
4.2.1)	Pacientes.....	96
4.2.2)	Método.....	97
4.2.3)	Nomenclatura.....	101
4.3)	RESULTADOS.....	103
4.4)	DISCUSSÃO.....	114
5)	Parte III – Mecanismos de resistência <i>BCR-ABL1</i> independente e progressão da doença.....	118
5.1)	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	118
5.2)	METODOLOGIA.....	119
5.2.1)	Pacientes.....	119
5.2.2)	Método.....	120
5.2.3)	Análise estatística.....	129
5.3)	RESULTADOS.....	130
6)	DISCUSSÃO.....	137
7)	CONCLUSÃO GERAL.....	139
	REFERÊNCIAS.....	141
	ANEXO 1.....	158
	ANEXO 2.....	160
	ANEXO 3.....	162
	ARTIGOS PUBLICADOS.....	162

1) INTRODUÇÃO

1.1) EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A incidência da leucemia mieloide crônica (LMC) é de 1 a 2 casos para 100.000 habitantes, representando 15 a 20% dos casos das leucemias nos adultos. A mediana da idade ao diagnóstico é em torno de 45 a 55 anos, sendo que 12-30% dos casos ocorrem em idosos (>60 anos), e mais raramente, em crianças e adolescentes, (FADERL et al., 1999; HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015) (Figura 1.1). Em adultos com LMC é observada uma razão homens:mulheres de 1,6:1, mas não há relatos de prognósticos desfavoráveis associados ao sexo.

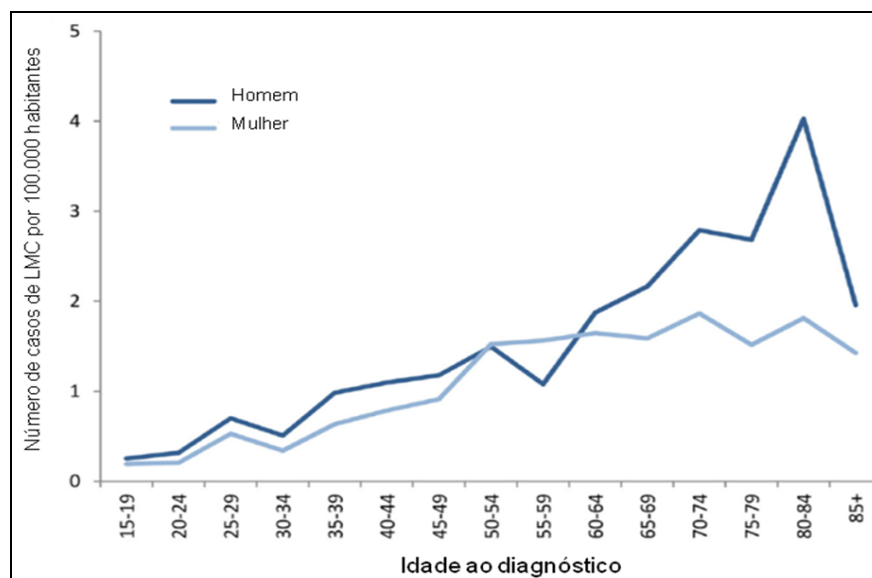


Figura 1.1: Incidência anual da leucemia mieloide crônica. O Número de casos novos por 100.000 habitantes em pacientes com LMC em diferentes faixas etárias (n=1.039). Os sexos estão representados individualmente, sendo a linha azul escura o sexo masculino e o azul claro, o feminino. Fonte: Adaptado de (HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015).

Análises contemporâneas discriminam variações geográficas, sendo a mediana da idade ao diagnóstico mais precoce na África, Ásia e América do Sul (47 a 52 anos) quando comparada a Oceania, América do Norte e Europa (62 a 67 anos) (MENDIZABAL; GARCIA-GONZALEZ; LEVINE, 2013).

No Brasil, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INCA, 2015) a incidência de leucemias (agudas e crônicas) para 2016, em adultos, é de 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, não foram encontrados dados de incidência específicos para a LMC.

1.2) PATOGÊNESE

A LMC é uma neoplasia hematológica considerada um modelo para outros tipos de câncer porque foi a primeira associada a uma alteração cromossômica, o cromossomo Filadélfia (Ph+) e a primeira doença a ter uma terapia específica, contra um alvo molecular (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

Em 95% dos casos, a LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Ph+, que é resultado de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22. Molecularmente, a t(9;22)(q34;q11) justapõe regiões dos genes *BCR* e *ABL1*, gerando o gene de fusão *BCR-ABL1* (BENNETT, 1985; NOWELL; HUNGERFORD, 1960; ROWLEY, 1973). O produto gênico é uma proteína quimérica citoplasmática com atividade tirosina quinase constitutiva, a P210^{BCR-ABL1}; sua presença confere uma vantagem de crescimento às células leucêmicas devido a ativação de vias celulares regulatórias da proliferação e apoptose. A P210^{BCR-ABL1} é condição única, necessária e suficiente para a manutenção do fenótipo maligno na LMC. (DALEY; VAN ETEN; BALTIMORE, 1990; RAMARAJ, 2004; MELO; BARNES, 2007) (Figura 1.2).

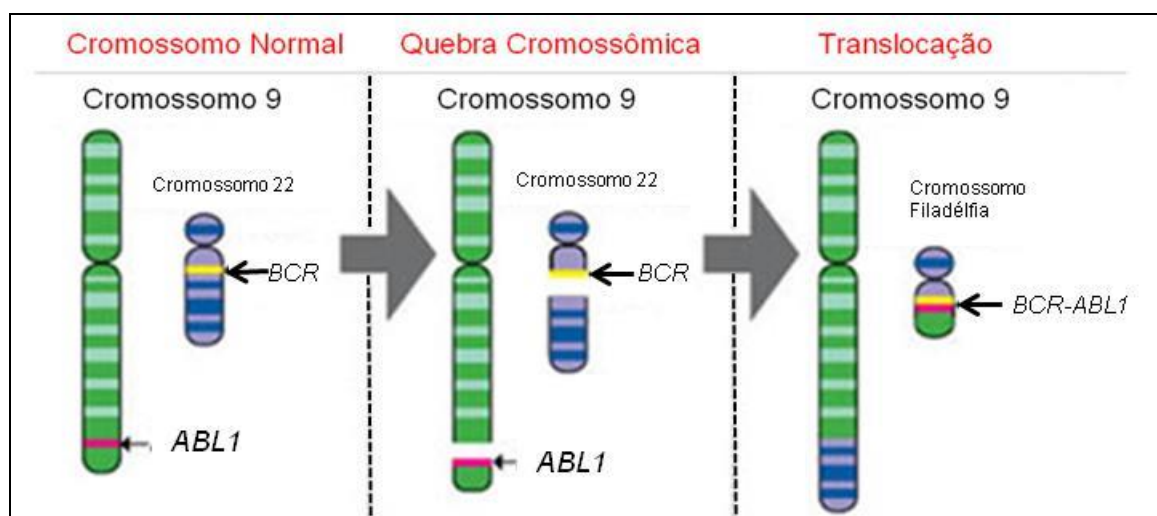


Figura 1.2: Ilustração do processo de translocação cromossômica e formação do cromossomo Filadélfia. As figuras em sequência representam o cromossomo 9 e 22 normais e intactos; as setas indicando o ponto de quebra em cada gene, seguido da quebra cromossômica e por fim a translocação formando o gene fusionado *BCR-ABL1* indicado na seta. Fonte: Adaptado de NCCN (= *National Comprehensive Cancer Network*).

1.3) Clínica da LMC

A atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), em inglês WHO: *World Health Organization*) agrupa a LMC junto as neoplasias mieloproliferativas, junto com: Leucemia Neutrofílica Crônica (LNC), Policitemia Vera (PV), Mielofibrose Primária (MP), Trombocitemia Essencial (TE), Leucemia Eosinofílica Crônica e não classificadas (ARBER et al., 2016).

A LMC, se não tratada, apresenta uma evolução caracterizada por três estágios clínicos: fase crônica (FC), de curso indolente, que progredir para uma fase acelerada (FA) ou crise blástica (CB), estas normalmente associadas a um pior prognóstico, com baixa resposta ao tratamento. Dependendo da natureza das células blásticas, a CB pode ser linfoide ou mieloide (SAUßELE; SILVER, 2015).

Não existem critérios universais para a definição das FA e CB, segundo as recomendações da *European Leukemia Net* (ELN) (BACCARANI et al., 2013), a FA é definida pela presença de 10-20% de blastos no sangue periférico (SP) ou na medula óssea (MO), enquanto que a CB é definida quando a contagem é $\geq 20\%$ ou na presença de um acúmulo de blastos extramedular. Em contraste, a classificação da OMS 2016 inclui parâmetros morfológicos (percentual de basófilos, leucometria, número de plaquetas), citogenéticos (duplo Ph, + 8, + 19, iso17, cariótipo complexo e anormalidades na região 3q26.2), além de resistência ao tratamento, como critério provisório, para classificar a progressão da FC para FA.

O exato mecanismo na progressão ainda é desconhecido, durante a FA da doença, as células leucêmicas perdem a capacidade de diferenciação terminal, resultando na expansão de células primitivas ao invés de granulócitos maduros (MELO; BARNES, 2007; SOVERINI et al., 2011a, 2015). A resposta ao tratamento é o fator prognóstico mais importante associado a um aumento na sobrevida nestes pacientes, ou seja, um melhor resultado será alcançado se houver um retorno para a FC (CERVANTES et al., 1990).

Gene *BCR-ABL1* e a $P210^{BCR-ABL1}$

Em condições normais, o gene *ABL1*, localizado no cromossomo 9, possui 11 éxons e codifica uma proteína tirosina quinase não receptora de 145 kD 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 do gene *ABL1*. A proteína *ABL1* de 145 kD possui livre circulação entre o núcleo-citoplasma, diferente da oncoproteína $P210^{BCR-ABL1}$, que perde esta propriedade, sendo retida preferencialmente no citoplasma. Com a justaposição da sequência *BCR*, a oncoproteína $P210^{BCR-ABL1}$, retida no citoplasma é constitutivamente fosforilada, e desregula diversas vias de sinalização celular. As principais vias ativadas pela $P210^{BCR-ABL1}$ são MAPK, PI3-k/Akt, e JAK-STAT (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

Para a formação do gene de fusão *BCR-ABL1*, o local de quebra em *ABL1*, é pouco variável, podendo ocorrer entre o éxon 1b e 1a em direção ao 5' ao éxon 1b, ou em direção 3' do éxon 1a (MELO, 1997). Em contraste, a região de quebra do gene *BCR* é mais variável podendo ocorrer em três diferentes regiões: major -*BCR* (M-*BCR*), minor-*BCR* (m-*BCR*) e micro (μ -*BCR*). Em 98% dos pacientes com LMC e em 1/3 dos pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) Ph+, o ponto de quebra ocorre em uma região de 5,8 kb, conhecida como M-*BCR*, situada entre os éxons 12-16 (antigamente conhecidos como b1-b5) ou entre os éxons 13 e 14 (antigamente conhecidos como: b2 e b3, respectivamente). Independentemente da localização exata do ponto de quebra do gene *ABL1*, o *splicing* alternativo do RNA mensageiro (RNAm) resulta na fusão do gene *BCR* ao éxon 2a do gene *ABL1*, formando transcritos de RNAm do tipo e13a2 (b2a2) e/ou e14a2 (b3a2), ambas as isoformas codificam a proteína quimérica de 210 kD ($P210^{BCR-ABL1}$) (LUCAS et al., 2009a).

Em 2/3 dos pacientes com LLA Ph+ e em raros casos de LMC, o local de quebra em *BCR* ocorre entre os éxons e2' e e2 na região m-bcr, formando o transcrito e1a2, que codifica a proteína P190^{BCR-ABL1} (JONES et al., 2008). Quebras na região μ -*BCR*, dão origem as isoformas variantes: e6a2, e8a2 ou e19a2. Finalmente, quando há envolvimento do éxon 3 do gene *ABL1* as isoformas e13a3 ou e14a3, que codificam a proteína de fusão, P230^{BCR-ABL1}, de 230k-Dalton Essa última encontrada em pacientes com LMC e intensa neutrofilia (HOCHHAUS et al., 1996; JONES et al., 2008) (Figura 1.3).

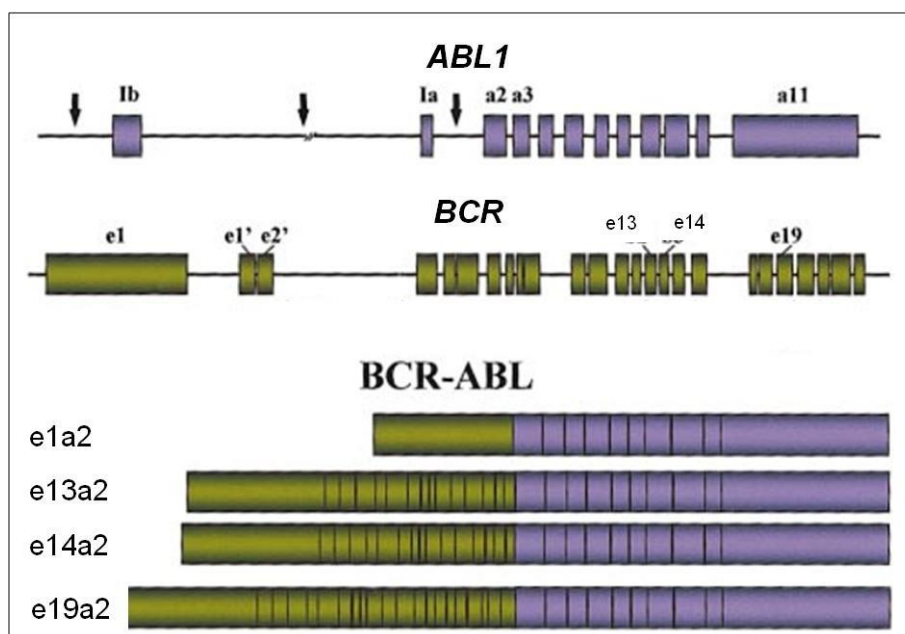


Figura 1.3: Representação da quebra dos gene *ABL1* e *BCR* e os tipos de transcritos mais frequentes na doença. Cada gene está individualmente representado nas duas primeiras figuras, na qual os retângulos representam os éxons e as setas o ponto de quebra para a formação do gene de fusão *BCR-ABL1*. Ainda estão representadas os tipos de transcritos mais frequentes a partir desta quebra: e1a2, e13a2, e14a2 e e19a2. Fonte: Adaptado de (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

O melhor ou pior prognóstico associado às isoformas e13a2 e e14a2 já foi estudado, mas é controverso. Alguns trabalhos mostram que apesar dos pacientes com a isoforma e13a2 possuírem uma leucometria aumentada e menor número de plaquetas ao diagnóstico quando comparada com pacientes com a isoforma e14a2, não foi observado um pior desfecho clínico associado a nenhuma isoforma: e13a2 ou e14a2 ao diagnóstico (BENNOUR et al., 2013; HANFSTEIN et al., 2014). Já na LMC pediátrica, apesar do número de pacientes estudados ser menor, dois estudos mostraram um pior prognóstico associado à isoforma e13a2, tanto para o alcance da RCgC (LUCAS et al., 2009b) quanto para a resposta molecular em uso de imatinibe (SUTTORP et al., 2010), na qual foi demonstrado que os pacientes com o transcritos

e14a2 não só possuem uma mediana nos níveis de transcritos menor aos 3 meses quando comparado com os níveis e13a2 como alcançam menores níveis do transcritos, em média, em menor tempo.

1.4) TRATAMENTO

Inicialmente o tratamento de pacientes com LMC era realizado por agentes citotóxicos (Bussulfan e Hidroxiuréia), sendo controlado somente os sintomas com redução inicial da leucometria, sem alterar o curso de evolução da doença (HEHLMANN et al., 1999). A introdução da terapia com Interferon-alfa (INF- α) e transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) marcou o início de uma nova era no tratamento da LMC tendo a sobrevida em seis anos dobrado (KANTARJIAN et al., 2012a), porém a alta comorbidade associada à regimes de condicionamento mieloablativos, que normalmente podem ser altas doses de quimioterapias, com o objetivo de destruir a medula óssea doente para permitir a entrada da medula óssea do doador.

1.4.1) Transplante células – tronco hematopoiéticas (TCTH)

O TCTH ainda é considerado a única terapia curativa na LMC. Porém, a partir da introdução dos inibidores tirosina quinase (ITK), o número de pacientes submetidos ao transplante sendo reduzido ao longo dos anos. Entretanto, ainda é a terapêutica de escolha para estágios avançados da doença (GRATWOHL; BALDOMERO; PASSWEG, 2015) e para os pacientes que não responderem a terapia com os inibidores tirosina quinase (aproximadamente 10% dos pacientes com LMC que iniciam a terapia com os inibidores não irão responder a nenhum dos inibidores atualmente disponíveis (INNES; APPERLEY, 2014)). Avanços na sobrevida de pacientes pós-transplante foram observados ao longo dos anos, pelo grupo inglês, que demonstrou um aumento na sobrevida global (SG) quando comparados transplantes realizados no período de 1991 a 2000 (SG=55%) com o período de 2001 a 2010 (SG=70%) (PAVLU et al., 2011). Apesar da melhora, o TCTH continua sendo associado à alta morbidade e mortalidade, mesmo com a utilização de critérios de seleção rigorosos (PAVLU; APPERLEY, 2013).

Dados não publicados do Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) / INCA é possível observar uma redução na porcentagem de pacientes com LMC submetidos ao TCTH ao longo dos anos. No período de 1997 a 2005 esses correspondiam a 36% (118/328) dos pacientes transplantados e até 2013 esse número reduziu para 29% (134/463), incluindo os 16 anos analisados, ou seja, um aumento de 16 pacientes (Figura 1.4).

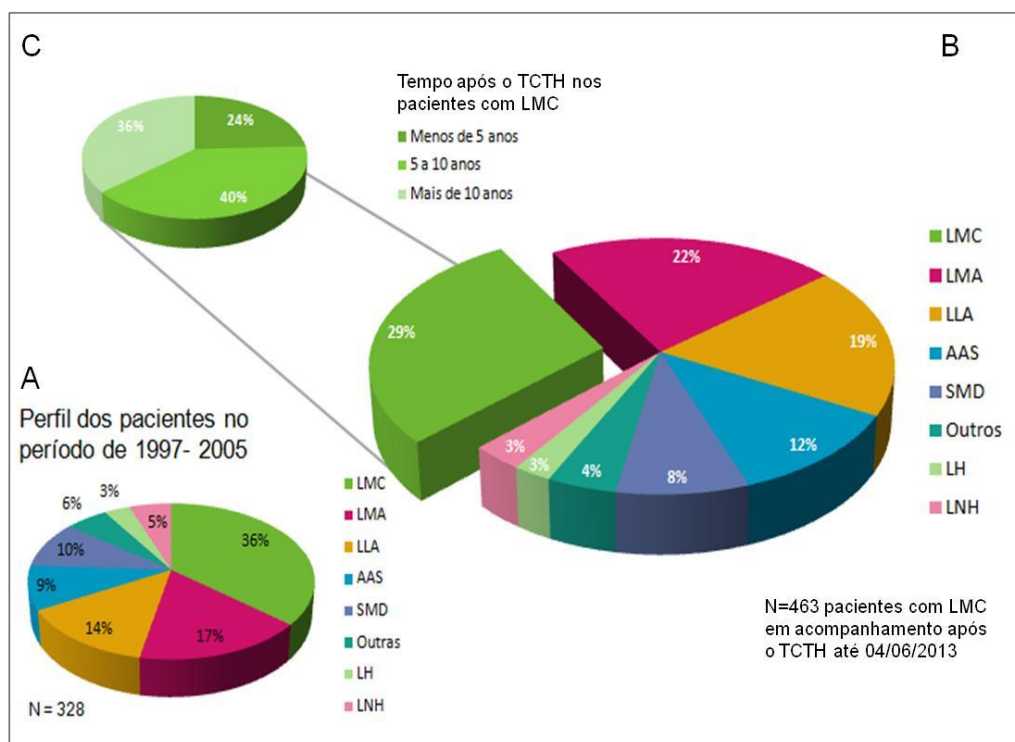


Figura 1.4: Representação gráfica da porcentagem de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas classificados por doença. Estão representados três gráficos, sendo: A) porcentagem dos pacientes que foram submetidos ao transplante no INCA no período de 1997 a 2005, sendo cada cor correspondente a uma neoplasia; B) aumento do período de análise até 04/06/2013; C) destaque para tempo após o transplante dos pacientes com LMC neste período, na qual o degradê em verde representa o tempo de acompanhamento pós transplante, sendo o mais claro o maior tempo e o mais escuro o menor.

Legenda: LMC= Leucemia Mieloide Crônica; LMA = Leucemia Mieloide Aguda; LLA = Leucemia Linfóide Aguda; AAS = Anemia Aplástica Severa; SMD = Síndrome Mielodisplásica; LH = Linfoma de Hodgkin; LNH = Linfoma não Hodgkin

1.4.2) Interferon –Alfa (INF- α)

Ignorado após a introdução do 1º ITK, imatinibe, o uso do INF- α no tratamento da LMC tem sido retomado, sendo atualmente utilizada a combinação INF- α +imatinibe (TALPAZ; MERCER; HEHLMANN, 2015). O racional para a associação é a busca de um sinergismo baseado nas seguintes premissas: (i) ITKs não são capazes de erradicar células-tronco leucêmicas implicadas na resistência; (ii) busca de adjuvância associada aos efeitos biológicos do IFN- α tais como indução de apoptose, inibição de angiogênese, e em particular a ativação da resposta imune (Figura 1.5). Ensaios clínicos recentes mostram que a associação imatinibe+ Peginterferon Alfa-2a apresenta melhores resultados terapêuticos quando comparada ao uso do imatinibe sozinho, naqueles pacientes capazes de tolerar a dose ótima de IFN- α (PREUDHOMME et al., 2010; SIMONSSON et al., 2011).

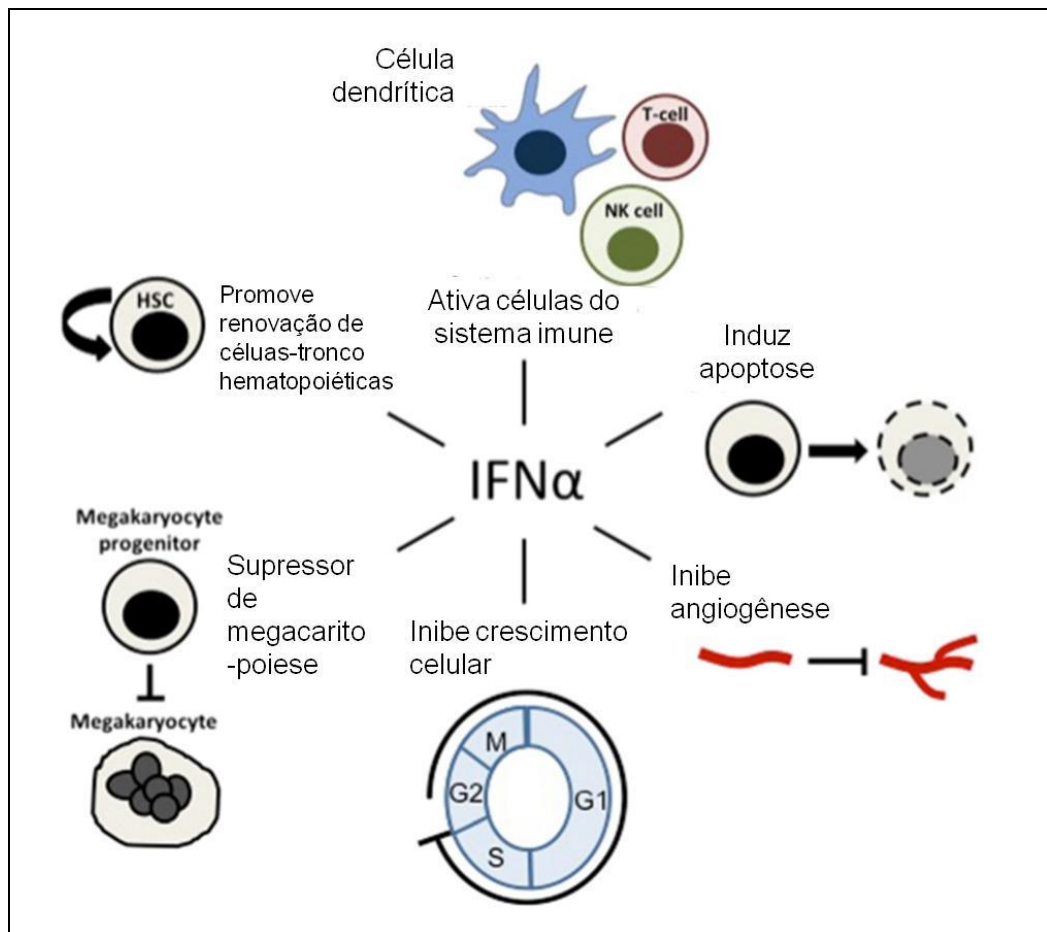


Figura 1.5: Efeitos biológicos atribuídos ao interferon-alfa Exemplificação dos efeitos antitumorais do IFN- α nas células, afetando vários processos biológicos diretamente associados à malignidade hematológica. Fonte: Adaptado de (TALPAZ; MERCER; HEHLMANN, 2015).

1.4.3) Imatinibe

No final da década de 1990, a proteína BCR-ABL1 foi reconhecida como um potencial alvo terapêutico, tendo como foco a região de tirosina quinase da parte fusionada do gene *ABL1*, o que levou ao desenvolvimento da primeira droga alvo específica para um determinado tipo de câncer.

O imatinibe é eficaz para pacientes com alterações com ganho de função como o ABL1, c-Kit e PDGFR, inibindo seletivamente a atividade da P210^{BCR-ABL1}, pela competição no sítio de ligação do ATP na região do domínio quinase (DQ), inibindo seletivamente a ativação das vias transdutoras de sinais proliferativos e antiapoptóticos, levando assim à morte da célula afetada. O efeito benéfico do imatinibe foi observado em todas as fases da doença, sendo mais substancial nos pacientes recém-diagnosticados e em FC, tornando-se o tratamento de primeira linha para os pacientes diagnosticados com LMC no mundo (HUGHES et al., 2003).

O resultado do avanço terapêutico introduzido pelo uso do imatinibe pode ser referendado pelo ensaio clínico IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*) que avaliou 1.106 pacientes recém-diagnosticados com LMC em 16 países, com 533 randomicamente tratados com imatinibe ou IFN- α +citarabina. Um total de 363 pacientes tratados com IFN- α +citarabina foram realocados para o tratamento com imatinibe logo após o início da terapia, visto o benefício desta. Os resultados publicados recentemente, com uma mediana de acompanhamento de 10,9 anos, mostram que a eficácia do imatinibe persiste e que nenhum efeito tóxico tardio ou cumulativo inaceitável foi observado, reportando uma SG de 83,3% (HOCHHAUS et al., 2017b). Um comparativo com ensaios clínicos anteriores a introdução do imatinibe demonstram com clareza a superioridade deste medicamento ao comparamos SG (HEHLMANN, 2015)(Figura 1.6).

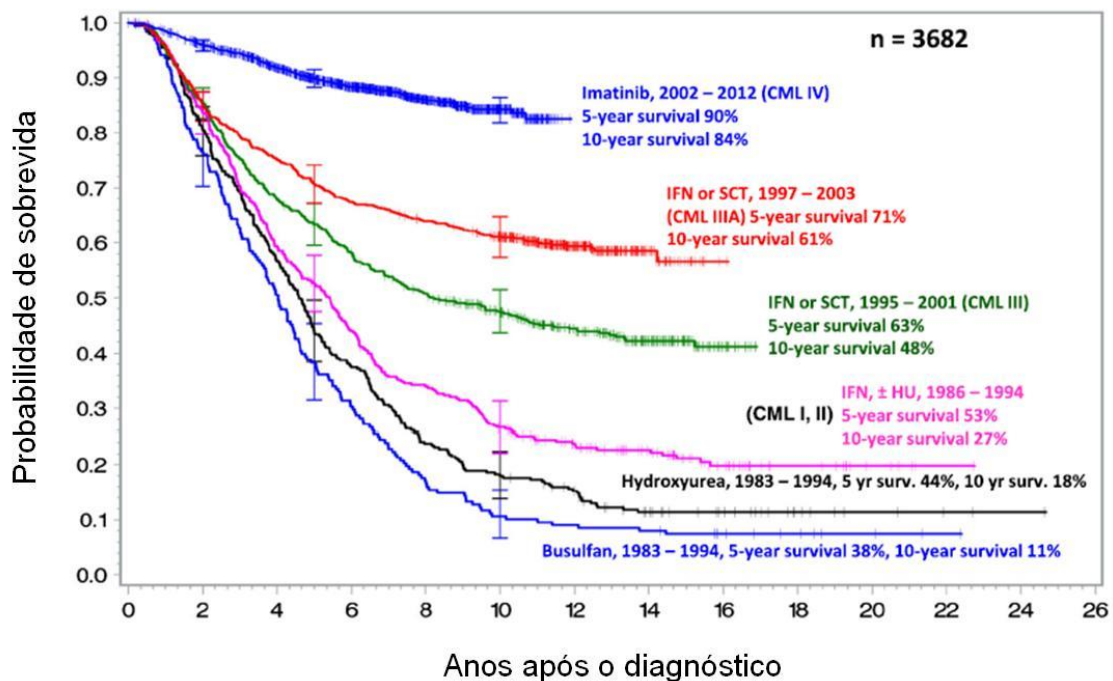


Figura 1.6: Curva de sobrevivida dos pacientes com leucemia mielóide crônica ao longo do tempo para diferentes terapias. Resultados de cinco ensaios clínicos randomizados do grupo alemão em pacientes com LMC (1983 a 2014), na qual foi avaliada a probabilidade de sobrevivida global de 3.682 pacientes. Fonte: (HEHLMANN, 2015).

Atualmente, além do imatinibe estão disponíveis no Brasil os ITK de segunda geração (2ITK): dasatinibe e nilotinibe, desenvolvidos com o intuito de sobrepujar a resistência observada em pacientes em uso de imatinibe. Atualmente diversos países já os utilizam em primeira linha de tratamento (KANTARJIAN et al., 2012b; LARSON et al., 2012), mas no Brasil, o uso destes medicamentos ainda é majoritariamente utilizado no tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes ao imatinibe na segunda linha de tratamento. Enquanto que o ponatinibe, um inibidor de terceira geração (3ITK) foi desenvolvido para o uso de pacientes na presença de mutações no DQ resistentes aos ITK de primeira e 2º geração, em particular em pacientes portadores da mutação T315I (que confere resistência ao imatinibe, dasatinibe e nilotinibe).

1.4.4) Dasatinibe

Resultados *in vitro* mostram que este é um inibidor 325 vezes mais potente que o imatinibe, sendo capaz de inibir as quinases da família SRC, e as formas ativas e inativas de BCR-ABL1. Um estudo realizado com 387 pacientes (288 resistentes e 99 intolerantes) com LMC em FC que falharam ao imatinibe e foram tratados com dasatinibe como segunda linha de tratamento mostrou respostas mais

duradouras e estáveis e uma SG de 96% em 15 meses de acompanhamento (HOCHHAUS et al., 2008b).

Resultados satisfatórios também foram observados quando utilizado em primeira linha de tratamento. Kantarjian e colaboradores mostram em um ensaio clínico randomizado, comparando o dasatinibe com imatinibe em pacientes recém-diagnosticados com LMC observou melhores respostas nos pacientes tratados com dasatinibe quando comparado ao grupo do imatinibe. A progressão para FA e CB também foi menor no grupo de pacientes tratados com dasatinibe, 2,3 % vs 5,0% em relação ao imatinibe em primeira linha (KANTARJIAN et al., 2012b).

O dasatinibe é recomendado para pacientes com LMC em qualquer fase da doença, apresentando melhores respostas na FC, mas superioridade nos pacientes em FA e CB quando comparados com os que usaram imatinibe também foi demonstrada (CORTES et al., 2008; GUILHOT et al., 2007).

1.4.5) Nilotinibe

O nilotinibe, outro 2ITK, foi desenvolvido a partir de uma modificação química do imatinibe e possui sítio de ligação quase idêntico. Porém, necessita de menos ligações de hidrogênio permite sua ligação a várias moléculas BCR-ABL1 mutantes resistentes ao imatinibe. Estudos *in vitro* mostram que ele é 10-30 vezes mais eficaz que o imatinibe na inibição da atividade tirosina quinase em células *BCR-ABL1* positivas.

O nilotinibe em segunda linha de tratamento foi avaliado por diversos estudos. Kantarjian e colaboradores avaliaram a resposta ao tratamento em 321 pacientes com LMC que falharam ao imatinibe, e observou que 124 (39%) mantiveram o tratamento com nilotinibe, 44% atingiram respostas ótimas ao tratamento e dentre esses a maioria (84%) manteve esta resposta ao longo de 24 meses de acompanhamento, com uma SG de 87% neste tempo (KANTARJIAN et al., 2011).

Ensaio clínico mostram que, assim como o dasatinibe, o nilotinibe também pode ser administrado como primeira linha de tratamento em pacientes recém-diagnosticados, sendo eficaz nas três fases da doença. Apesar do número reduzido de pacientes (n=51), um ensaio clínico com nilotinibe em primeira linha mostrou que a sobrevida livre de eventos com 24 meses de acompanhamento foi de 90% (CORTES et al., 2010b), tendo conferido respostas superiores ao imatinibe em alguns relatos (SAGLIO et al., 2010).

1.4.6) Ponatinibe

O ponatinibe, recém-introduzido no Brasil, é um inibidor de terceira linha e é um pan-inibidor, específico para pacientes com mutações no DQ do ABL1, principalmente a T315I, mas também é indicado para pacientes que falharam a um dos inibidores apresentados anteriormente.

Este inibidor pode ser uma alternativa ao TCTH para pacientes com a mutação T315I. A presença desta mutação confere resistência a todos os inibidores descritos anteriormente. Um estudo recente comparou a SG entre esses dois grupos e mostrou que esta foi significativamente maior nos pacientes tratados com ponatinibe, quando comparados aos que foram submetidos ao TCTH, 84% vs 60,5%, respectivamente ($p=0,004$) em 24 meses de acompanhamento. Entretanto, esta diferença não foi significativa em pacientes em FA e em CB e LLA Ph+, onde a SG foi mais baixa para o grupo tratado com inibidor, quando comparado ao que foi submetido ao transplante de medula óssea (NICOLINI et al., 2017a).

Estudos *in vitro* mostraram que a presença da mutação T315I associada a outras em um mesmo clone, a mutação E255K, por exemplo, é um fator de resistência a este medicamento (ZABRISKIE et al., 2014). Mas resultados de um ensaio clínico recente reportou pacientes com T315I e outras mutações em um mesmo clone que responderam a terapia com o ponatinibe (DEININGER et al., 2016). Ainda, em um estudo de pacientes com LMC que falharam a múltiplos ITKs e foram tratados com ponatinibe não foi observada associação entre a presença de múltiplas mutações em BCR-ABL1 e resposta inferior ao tratamento, o que normalmente é observado com dasatinibe e nilotinibe. Porém, pacientes em FC com T315I + outra mutação possuem pior resposta ao ponatinibe quando comparada com a T315I sozinha (PARKER et al., 2016). Logo, a presença de múltiplas mutações conferindo resistência ao ponatinibe ainda não é consenso na literatura.

1.4.7) Imatinibe Genérico

A introdução dos ITKs no tratamento de pacientes com LMC resultou em avanços significativos na sobrevida dos pacientes, mas a custos altíssimos (DAS et al., 2017; EXPERTS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA, 2013). Esse fato acelerou a introdução do imatinibe genérico, inicialmente no Egito (ASFOUR; ELSHAZLY, 2009) e Índia (MATTAR, 2010). Posteriormente o genérico foi introduzido no Brasil (2014) e nos EUA (2016), em seguida a patente foi quebrada em países europeus.

O menor custo do medicamento genérico é extremamente relevante, porém a grande preocupação é se há equivalência na sobrevida em longo prazo, entre os pacientes tratados com o genérico comparado com os tratados com o imatinibe original (CHEN; KESSELHEIM, 2017; STEINER; THOMSON REUTERS ACCELUS, 2016).

Alguns estudos mostraram a superioridade do imatinibe original, quando comparado com o genérico (ALWAN et al., 2014; ASFOUR; ELSHAZLY, 2009), enquanto outros mostraram equivalência (SACHA et al., 2017), e outros ainda mostraram que o genérico utilizado como segunda linha de tratamento é eficaz, mas o mesmo não ocorre quando é utilizado em primeira linha (ISLAMAGIC et al., 2017).

1.4.8) Descontinuação do Medicamento

Após anos de uso de inibidores, em 2010 teve início o primeiro estudo de descontinuação de terapia. Os pacientes elegíveis eram aqueles que atingiam e mantinham níveis indetectáveis de transcritos *BCR-ABL1* durante dois anos consecutivos (MAHON et al., 2010). Entre esses, aproximadamente 40% mantiveram a indetectabilidade dos transcritos, tendo sido “curados”, enquanto que os outros recaíram à terapia. O que sugere que apesar da resposta molecular equivalente, ainda há fatores intrínsecos ao paciente que fazem com que cada um responda de maneira heterogênea à retirada do inibidor. Um acompanhamento deste estudo foi publicado sete anos após o anterior, mostrando que o imatinibe pode ser interrompido de forma segura em pacientes que mantiveram níveis indetectáveis do gene de fusão *BCR-ABL1* (ETIENNE et al., 2017). Na verdade, a terminologia mais correta, seria a “cura operacional” e não uma cura clássica, uma vez que é sabido que estes inibidores não são capazes de eliminar definitivamente as células leucêmicas (MAHON, 2016).

Depois deste estudo pioneiro, outros ensaios clínicos foram realizados com a mesma proposta e resultados bem similares, como o estudo TWISTER. Este mostrou que após 24 meses de acompanhamento, a remissão foi alcançada em 47,1% dos pacientes, e que a maioria dos casos de relapso ocorreram em até quatro meses após a retirada do inibidor, e nenhuma recaída foi observada após 27 meses de acompanhamento (ROSS et al., 2013).

Uma metanálise com 15 estudos de coorte de descontinuidade da terapia, analisando um total de 509 pacientes mostrou que a descontinuidade foi associada à “cura” em metade dos pacientes com LMC com níveis indetectáveis dos transcritos

BCR-ABL1, e que a recaída, quando houve, ocorreu nos seis primeiros meses de suspensão do medicamento, e que a reintrodução dos inibidores foi suficiente para o restabelecimento da resposta molecular (CAMPIOTTI et al., 2017).

Seguindo os mesmos critérios utilizados para a interrupção do tratamento com imatinibe, estudos de retirada do nilotinibe também foram conduzidos com sucesso. O resultado deste estudo, envolvendo diversos centros de referência foi publicado recentemente, envolvendo 190 pacientes elegíveis e uma mediana de tratamento com nilotinibe de 43,5 meses. Este estudo mostrou que 51,6% dos pacientes mantiveram excelentes respostas a terapia. Dentre os que haviam perdido a resposta, o inibidor foi reintroduzido e a resposta readquirida em 88,4% dos pacientes (HOCHHAUS et al., 2017a). Um estudo similar vem sendo conduzido no Brasil.

Visto que 60% dos pacientes elegíveis para descontinuar o tratamento recaem, é importante a introdução de técnicas mais sensíveis para o monitoramento das células leucêmicas, com o objetivo de tornar esses ensaios clínicos ainda mais seguros para os pacientes. Dessa forma, técnicas de PCR digital (ddPCR) têm sido implementadas, apesar do RT-qPCR (PCR em tempo real) ainda ser a metodologia padrão na clínica (ALIKIAN et al., 2017).

1.5) RESPOSTA AO TRATAMENTO

A eficácia terapêutica do paciente com LMC a um ITK é avaliada de acordo com o tipo de resposta: hematológica, citogenética e molecular; alcançadas em tempos pré-definidos, em diferentes momentos ao longo do tratamento. 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 a cada 100 células normais) e molecular (1×10^5 – uma célula tumoral a cada 100.000 células normais) (HASSERJIAN, 2010) (Figura 1.7). Ainda, por serem inibidores alvo específicos, o monitoramento da presença do cromossomo Filadélfia ou do gene de fusão são os mais indicados quando pensamos em monitoramento da doença residual mínima.

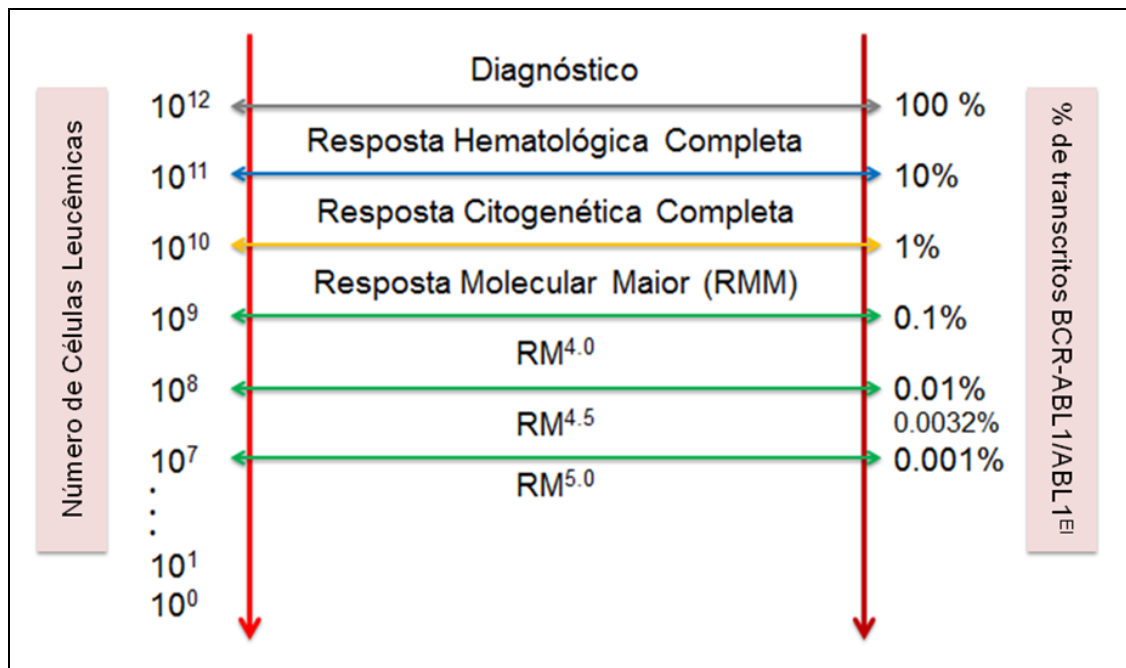


Figura 1.7: Resposta ao tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores tirosina quinase. No eixo esquerdo observa-se o número de células leucêmicas variando de 10^{12} a 10, sendo 10^{12} o número máximo tolerável em um indivíduo, logo o máximo teórico detectável ao diagnóstico, o equivalente a 100% na razão $\%BCR-ABL1/ABL1^{Ei}$ no eixo direito da figura. Ao centro está discriminada a melhor resposta alcançada por cada metodologia de análise, considerando o limite de detecção das células leucêmicas em cada uma delas.

Legenda: RM – resposta molecular

Com a introdução dos ITKs, os parâmetros utilizados para o alcance das respostas hematológica completa (RHC) e citogenética completa (RCgC) eram alcançados logo após três e seis meses do início da terapia. Por isso foi necessária a inclusão de parâmetros mais sensíveis, como os moleculares para o monitoramento da doença residual mínima. A resposta molecular (RM) teve recentemente seus parâmetros modificados com a valoração da resposta precoce após 3 meses após o início do tratamento (MARIN et al., 2012; HANFSTEIN et al., 2012) e da não detecção do *BCR-ABL1* para os ensaios clínicos de descontinuação da terapia (MAHON et al., 2010).

A RM é estabelecida em função da carga leucêmica do paciente obtida pelo número absoluto de transcritos *BCR-ABL1* avaliada por RT-qPCR em amostras do SP preferencialmente. Esta é resultado da razão entre os níveis de transcritos *BCR-ABL1* e um gene de referência (os mais utilizados são *ABL1*, *BCR* ou *GUSB*). Este valor é convertido para escala logarítmica (\log_{10}) e é utilizado ao longo do tratamento com um ITK para avaliar a resposta terapêutica (BRANFORD; HUGHES, 2006; CROSS, 2009). Um consenso foi proposto para o estabelecimento de uma abordagem laboratorial unificada que possibilitasse a comparação de resultados

entre laboratórios que utilizavam métodos diferentes (BRANFORD et al., 2006), resultando na construção da Escala Internacional (EI).

Na EI, uma linha de base foi construída a partir da mediana dos níveis de *BCR-ABL1* em 30 amostras de pacientes com LMC, não tratados, e em FC ao diagnóstico (sem tratamento). Esta mediana, diferente em cada laboratório, foi equalizada para 100%, sendo esta a carga leucêmica atribuída a todo paciente ao diagnóstico, independente do valor absoluto real de *BCR-ABL1* na amostra. Uma redução de 3-log da linha de base (0,1%) equivale a uma Resposta Molecular Maior (RMM) (BRANFORD et al., 2006). Com a implementação da EI ficou permitido a comparação dos resultados moleculares gerados em diferentes laboratórios, independente da técnica ou gene de referência utilizado. Assim, na última atualização das recomendações Internacionais esses parâmetros moleculares foram consolidados (BACCARANI et al., 2013).

Marcos de respostas utilizado como parâmetros operacionais indicativos e/ou preditivos de falha terapêutica, resposta ótima, atenção e falha foram estabelecidos com base no tempo de obtenção das respostas hematológica, citogenética e molecular. A correlação entre tempo de alcance das respostas e progressão da doença fortaleceu a utilização destes parâmetros como guia para a intervenção terapêutica (BACCARANI et al., 2006, 2009a, 2009b, 2013). Os exames citogenéticos e especialmente os moleculares são ótimas ferramentas para auxiliarem aos médicos na correta classificação desses pacientes (Tabela 1.1), tanto que as respostas moleculares foram incorporadas na última atualização das recomendações internacionais (BACCARANI et al., 2013, 2015).

Tabela 1.1: Classificação da resposta terapêutica de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica em uso de inibidor de 1ª ou 2ª linha de inibidor (1º ITK e 2º ITK), considerando o tempo é dado após o início da terapia.

TEMPO	1º ITK			2º ITK		
	Ótima	Atenção	Falha	Ótima	Atenção	Falha
Baseline	NA	Alto risco, ACC/Ph+	NA	NA	Ausência da Resposta ou Perda da RHC pelo imatinibe, ausência de RCg com ITK de 1ª linha ou alto risco	NA
3 meses	$BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ e/ou Ph+ $\leq 35\%$	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph+ 36-95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ $> 95\%$	$BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ e/ou Ph+ $< 65\%$	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph+ 65-95%	Ausência de RHC ou Ph+ $> 95\%$ ou Nova Mutaçào
6 meses	$BCR-ABL1^{EI} < 1\%$ e/ou Ph+ = 0	$BCR-ABL1^{EI} 1-10\%$ e/ou Ph + 1-35%	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph + $> 35\%$	$BCR-ABL1^{EI} \leq 10\%$ e/ou Ph + $< 35\%$	Ph + 35-65%	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph + $> 65\%$ e/ou Nova Mutaçào
12 meses	$BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1^{EI} 0,1-1\%$	$BCR-ABL1^{EI} > 1\%$ e/ou Ph + > 0	$BCR-ABL1^{EI} < 1\%$ e/ou Ph + 0	$BCR-ABL1^{EI} 1-10\%$ e/ou Ph + 1-35%	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph + $> 35\%$ e/ou Nova Mutaçào
A qualquer tempo	$BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$	ACC/Ph+ Ph- (-7 ou 7q)	Perda da RHC Perda da RCgC Perda da RMM* Mutaçào ACC/Ph+	$BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$	ACC/Ph- (-7 or 7q-) ou $BCR-ABL1^{EI} > 0,1\%$	Perda da RHC Perda da RCgC ou RCgP Nova Mutaçào perda da RMM* ACC/Ph+

*Em dois testes consecutivos com níveis de transcritos de $BCR-ABL1^{EI} \geq 1\%$,

NA = Não se aplica

ACC = Anormalidade Cromossômica Clonal nas células Ph+

RMM = $BCR-ABL1^{EI} \leq 0,1\%$ ou melhor

Nos casos em que o resultado da resposta citogenética não pode ser obtida, seja por ausência de metáfase ou não acesso a esta metodologia, estudos mostraram uma correlação entre a resposta citogenética e molecular (Bonecker *et al.* em submissão), auxiliando assim na melhor classificação de resposta do paciente. Essa correlação é importante porque em contraste com a citogenética que utiliza amostra de MO, a análise molecular pode ser realizada em SP, procedimento menos invasivo para o paciente.

Por outro lado, alguns parâmetros prognósticos são exclusivamente obtidos pela análise citogenética, como a presença de alterações cromossômicas adicionais nas células Ph+ ou negativas, essas alterações refletem instabilidade genética e são associadas a um pior prognóstico.

1.5.1) Respostas Moleculares – RM^{4.0}, RM^{4.5} E RM^{5.0}

O termo Resposta Molecular Completa (RMC) foi utilizado durante anos para classificar pacientes com níveis indetectáveis *BCR-ABL1* por RT-qPCR. Entretanto, por esse ser um grupo bastante heterogêneo e importante para estudos clínicos de descontinuidade do tratamento, uma nova terminologia foi adotada para reportar respostas moleculares com níveis de *BCR-ABL1* indetectáveis. Respostas moleculares com diferentes profundidades RM^{4.0}, RM^{4.5} e RM^{5.0} podem ser relatadas (CROSS *et al.*, 2012).

A profundidade da resposta se baseia nos valores obtidos com o gene de referência. Quanto maior o número de cópias identificadas do gene de referência em um mesmo volume analisado e não detectado do transcrito, maior a probabilidade de “cura” sem recaída, conforme identificado em estudos com a descontinuação do uso do imatinibe (MAHON *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 2013). A sensibilidade com a qual a indetectabilidade é reportada em um laudo, é definida em função do número de cópias do gene *ABL1* num mesmo volume de *BCR-ABL1*. Esta definição depende criticamente da capacidade dos laboratórios quantificarem o número de cópias de *ABL1*, refletindo a sensibilidade obtida. Dessa forma, a importância da padronização de respostas profundas em situações de indetectabilidade de transcritos *BCR-ABL1* para obtenção de resultados em EI foi enfatizada em trabalhos recentes (CROSS *et al.*, 2015). O gene *GUS*, além do *ABL1*, também pode ser utilizado para aferir a profundidade da resposta molecular na ausência de transcritos de *BCR-ABL1*. Respostas moleculares também são aferidas quando os transcritos *BCR-ABL1* são detectáveis.

As terminologias RM^{4,0}, RM^{4,5} e RM^{5,0} podem ser utilizadas para os valores detectáveis e indetectáveis de transcritos *BCR-ABL1*, utilizando o *ABL1* como gene de referência. As definições podem ser assim resumidas:

RM^{4,0} = valores detectáveis de *BCR-ABL1*^{EI} ≤0,01%, ou doença indetectável em cDNA com valores de *ABL1* ≥10.000 cópias.

- RM^{4,5} = valores detectáveis de *BCR-ABL1*^{EI} ≤0,0032%, ou doença indetectável em cDNA com valores de *ABL1* ≥32.000 cópias.
- RM^{5,0} = valores detectáveis de *BCR-ABL1*^{EI} ≤0,001%, ou doença indetectável em cDNA com valores de *ABL1* ≥100.000 cópias.

1.5.2) Respostas precoces

Os relatos sobre a importância de respostas precoces são antigos, anteriores a era dos inibidores: o primeiro é de 1998, quando foi demonstrada a importância de se atingir uma RHC aos seis meses em pacientes tratados com IFN- α , esse marco de resposta permitia, em um subgrupo de pacientes, identificar precocemente os que não iriam responder ao tratamento, necessitando de terapia alternativa, naquela época o TCTH (MAHON et al., 1998).

Estudos recentes, com 282 pacientes recém-diagnosticados com LMC em FC, tratados com imatinibe em primeira linha, mostraram o impacto da resposta molecular precoce (EMR = do inglês *Early Molecular Response*) na SG, livre de progressão (SLP) e livre de eventos (SLE), assim como no alcance da RCgC (MARIN et al., 2012). Nesse estudo também foi observado que o valor de 9,84% de *BCR-ABL1*^{EI} (posteriormente para facilitar este número foi arredondado para 10%) aos 3 meses após o início da terapia com imatinibe estava associado a uma maior SG ao longo de 8 anos (56,9% para >10% *BCR-ABL1*^{EI} aos 3 meses vs 93,3% para ≤10% *BCR-ABL1*^{EI}, p<0,001). Sendo, a resposta molecular precoce o único parâmetro preditor para a SG (MARIN et al., 2012).

O *GUS* também pode ser utilizado para aferição da EMR, visto que a razão %*BCR-ABL1/GUS* ao diagnóstico foi capaz discriminar os pacientes que responderam dos que falharam a terapia com imatinibe (BONECKER et al., 2015).

1.5.2.1) *Redução pela metade dos níveis de transcritos (Halving time)*

O conceito básico de *halving time* corresponde ao tempo necessário para que uma determinada quantidade seja reduzida pela metade, no caso do câncer, a massa tumoral ou número de células leucêmicas. Este conceito é recente na LMC (BRANFORD et al., 2014; IRIYAMA et al., 2015), mas já foi utilizado em outras áreas, como mieloma múltiplo (HOKANSON et al., 1977) e câncer de mama (KRYJ et al., 1997).

Ainda, baseado no estudo anterior sobre a importância dos valores de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} aos 3 meses após início do tratamento, um dos primeiros trabalhos sobre o tempo da redução da carga leucêmica na LMC vem justamente preencher uma lacuna observada naquele estudo, com relação à heterogeneidade no comportamento terapêutico dos pacientes com valores de *BCR-ABL*^{1^{EI}} >10%. Um estudo com 528 pacientes, tratados com imatinibe em primeira linha, mostrou que entre os pacientes com valores de *BCR-ABL*^{1^{EI}} >10% aos 3 meses após o início com imatinibe e redução da carga leucêmica pela metade em menos 76 dias, possuíam melhor resposta molecular (RMM aos 12 meses), maior SLP e SLE quando comparada a pacientes também com valores de *BCR-ABL*^{1^{EI}} >10% aos 3 meses, mas tempo de redução de carga leucêmica >76 dias. Sugerindo assim, o tempo de 76 dias como um marco relevante associado a melhor prognósticos principalmente para os pacientes com >10% *BCR-ABL*^{1^{EI}} aos 3 meses (BRANFORD et al., 2014).

Estudo similar realizado por outros grupos, porém com pacientes tratados com dasatinibe (IRIYAMA et al., 2015) ou nilotinibe (STEEGMANN et al., 2017) como primeira linha de tratamento. Iriyama e colaboradores sugeriram um valor de redução da carga leucêmica de 14 dias, ou seja, pacientes que reduziram o número de transcritos ao diagnóstico pela metade em um período de 14 dias apresentaram melhores respostas quando comparado com pacientes que levaram mais de 14 dias para alcançar mesmo feito. Enquanto que para os pacientes tratados com nilotinibe, este tempo foi de 11 dias, sendo a associado a um maior alcance de RMM aos 12 meses e RM^{4.0} aos 18 meses. Para pacientes em segunda linha de tratamento ainda não há trabalhos que utilizem a redução da carga leucêmica como parâmetro de sobrevida.

1.6) DIAGNÓSTICO

Os exames laboratoriais que estabelecem o diagnóstico de LMC são: a citogenética convencional, pela identificação do cromossomo Filadélfia na MO, e o RT-PCR *multiplex*, que detecta o gene de fusão *BCR-ABL1* no SP dos pacientes (Figura 1.8). O RT-PCR é mais sensível do que a citogenética, além de caracterizar diferentes isoformas: as e13a2, e14a2, características da LMC, a e1a2 mais frequente na LLA Ph+, e ainda isoformas variantes como: e13a3, e6a2, e8a2, e19a2, e1a3, e13a3, e14a3 (BURMEISTER; REINHARDT, 2008).

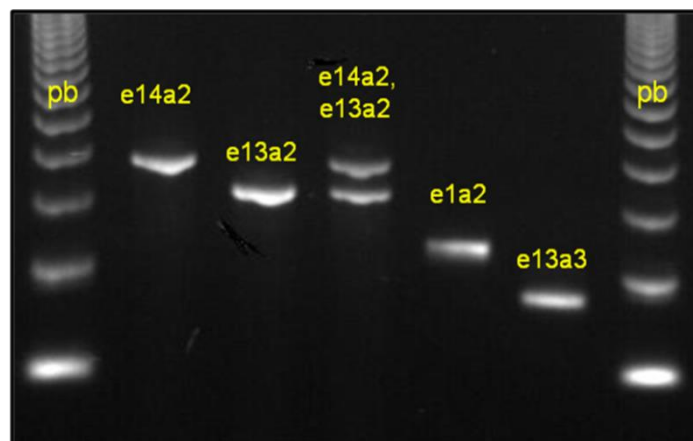


Figura 1.8: Resultado do RT-qPCR de pacientes com leucemia mieloide crônica ao diagnóstico. Identificação de diferentes isoformas pela metodologia de RT-PCR e visualização em gel de agarose a 2%, podendo-se observar na primeira coluna (da esquerda para a direita) o marcador de peso molecular (pb), nas colunas subsequentes, respectivamente as isoformas: e14a2, e13a2, e14a2 e e13a2, e1a2 e e13a3.

1.7) MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A falha de resposta terapêutica ao uso dos ITKs no tratamento da LMC foi observada levando em consideração a não obtenção de respostas hematológica, citogenética e ou molecular dentro dos tempos preconizados, começando a contagem após o início da terapia (BACCARANI et al., 2013, 2015). Esses parâmetros foram delineados baseados em diversos ensaios clínicos (HOCHHAUS et al., 2009; HUGHES et al., 2010). Os critérios considerados como falha ao tratamento são um pouco diferentes com relação ao uso de inibidores em 1ª linha de tratamento ou na 2ª linha (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Critérios de falha ao tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica em uso de inibidor tirosina quinase tanto em 1ª linha de tratamento (1 ITK) quanto em segunda linha (2 ITK), após o início do inibidor.

1 ITK	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95%	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph+ > 35%	$BCR-ABL1^{EI} > 1\%$ e/ou Ph+ > 0	perda da RHC perda da RCgC perda da RMM mutação ACC/Ph+
	3 meses	6 meses	12 meses	A qualquer tempo
2 ITK	Ausência de RHC ou Ph+ > 95% ou Nova Mutação	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph+ > 65% e/ou Nova Mutação	$BCR-ABL1^{EI} > 10\%$ e/ou Ph+ > 35% e/ou Nova Mutação	perda da RHC perda da RCgC ou RCgP nova Mutação perda da RMM* ACC/Ph+

*Em dois testes consecutivos com níveis de $BCR-ABL1^{EI} \geq 1\%$.

NA=Não se aplica

RMM = $BCR-ABL1 \leq 0,1\%$ ou melhor

AAC = Anormalidade Cromossômica Clonal nas células Ph+

RHC= Resposta Hematológica Completa

RCgC = Resposta Citogenética Completa

RMM= Resposta Molecular Maior

Fonte: Adaptado de BACCARANI et al., 2013.

Com base nos parâmetros descritos, a minoria de pacientes em FC e maior parcela de pacientes em FA ou CB apresentam uma refratariedade inicial ao imatinibe, resistência primária, ou perdem a sensibilidade ao longo do tratamento, vivenciando uma recaída, resistência secundária (APPERLEY, 2007a). Os mecanismos que as diferenciam ainda são desconhecidos, mas dados mostram que a presença de mutação no DQ de ABL1 é mais frequente na resistência secundária, quando comparada à primária (SOVERINI, 2005).

A resistência a qualquer droga, normalmente, é um processo multifatorial e na LMC no uso de inibidores também não é diferente. A resistência ao imatinibe em pacientes está associada a múltiplos mecanismos que variam dos não específicos, como resistência a múltiplas drogas (CORRÊA et al., 2012; DA CUNHA

VASCONCELOS et al., 2016; WHITE et al., 2010) a mutações pontuais em clones *BCR-ABL1* positivos (KHORASHAD et al., 2013; SOVERINI, 2005; SOVERINI et al., 2013). O mecanismo de resistência associado à presença de mutações no DQ de *ABL1* é o mais conhecido e estudado, mas outros mecanismos que envolvem moléculas transdutoras de sinais em vias celulares *BCR-ABL1* independentes também são conhecidos (APPERLEY, 2007a; CILLONI; SAGLIO, 2012) (Figura 1.9).

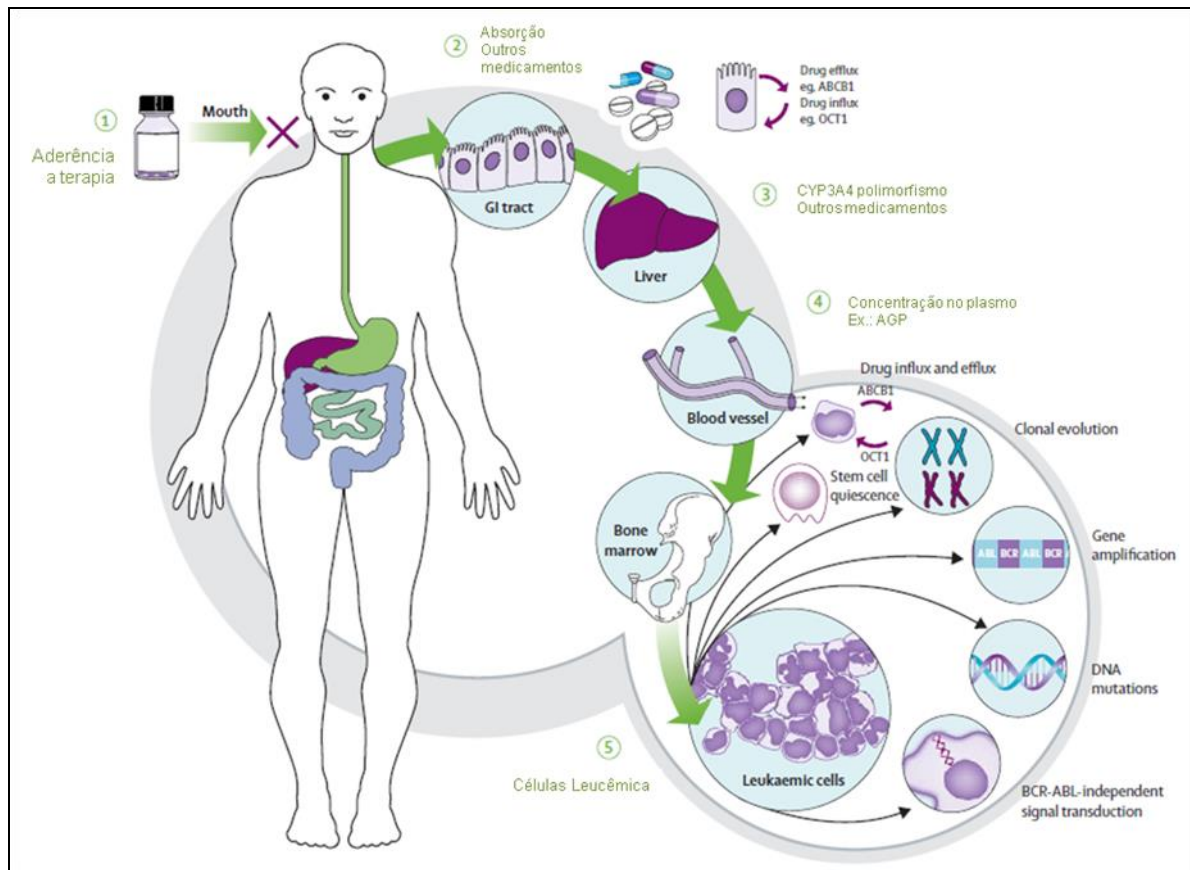


Figura 1.9: Mecanismos de resistência aos inibidores tirosina quinase em pacientes com leucemia mieloide crônica. Identificação de alguns dos mecanismos de resistência já relatados, desde: 1) aderência a terapia; 2) absorção do inibidor; 3) polimorfismo CYP3A4; 4) concentração do inibidor no plasma; 5) célula leucêmica. Fonte: Adaptado de (APPERLEY, 2007a).

Os mecanismos genéticos relacionados à resistência aos ITKs podem ser *BCR-ABL1* dependentes e / ou *BCR-ABL1* independente, de acordo com a via de interação. A seguir será detalhado cada um deles, dando ênfase aos que são propostos nesses estudos. Dessa forma serão ressaltados dentre os mecanismos dependentes, as mutações compostas (no mesmo clone) no DQ de *ABL1*, e dentre os independentes: mutações em genes que não o *BCR-ABL1*.

1.7.1) Mecanismo Genético da Resistência: BCR-ABL1 dependentes

Amplificação Gênica

O aumento de expressão do gene *BCR-ABL1* foi primeiramente associado à resistência por Mahon e colaboradores. Em um estudo original em clones de células BaF3 murinas transfectadas com *BCR-ABL1* em 4 linhagens celulares humanas (que conferiam resistência ao imatinibe), mostraram que a super expressão da proteína BCR-ABL1 estava associada a amplificação do gene em pelo menos uma das linhagens resistentes. Em contraste, em outra linhagem, a super expressão não teve efeito na resistência, dessa forma o estudo ressalta que células podem evadir o efeito inibitório do imatinibe por diferentes mecanismos, sendo a super expressão é somente um desses mecanismos, outros mecanismos discutidos nesse trabalho foram a ingestão reduzida da droga pela PGP e a aquisição de mutações no DQ de ABL1 (MAHON et al., 2000).

Estudos realizados em pacientes mostraram que em três de nove pacientes, com resistência adquirida ao imatinibe, a amplificação do gene *BCR-ABL1* pode ser observada. Em um deles coexistiu com uma mutação pontual no DQ de ABL1 (T315I), nos outros seis pacientes resistentes a mutação T315I foi detectada (GORRE, 2001). Outros relatos já foram reportados associando estes dois eventos (CAMPBELL et al., 2002; MOREL et al., 2003). No entanto, um grande estudo, com 66 pacientes resistentes (resistência primária ou adquirida), em apenas dois pacientes, a resistência foi associada a amplificação gênica (HOCHHAUS et al., 2002).

Apesar da chance de uma amplificação gênica ser maior do que a ocorrência de uma mutação pontual, na prática a presença de mutações no DQ é o mecanismo molecular mais frequentemente associado à resistência.

Mutações pontuais e únicas no domínio quinase do gene ABL1

Apesar das excelentes respostas ao tratamento, um percentual de pacientes (30 a 67% dependendo da fase da doença) com resistência secundária podem apresentar mutações no DQ de ABL1 (APPERLEY, 2007b; SOVERINI et al., 2015). Por isso, a análise de mutação, em pacientes com falha na resposta é uma recomendação para auxiliar na escolha da conduta terapêutica. Inclusive para orientar qual o inibidor de segunda geração é o mais indicado em função da mutação apresentada pelo paciente (BACCARANI et al., 2009a; SOVERINI, 2005; SOVERINI et al., 2011b) (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Mutações no domínio quinase de ABL1 insensíveis aos inibidores.

1ª Geração de ITK						2ª Geração de ITK		3ª Geração de ITK
<i>IMATINIBE</i>						<i>DASATINIBE</i>	<i>NILOTINIBE</i>	<i>PONATINIBE</i>
M237V	L273M	F311L	E355D/G	V379I	A397P	V299L	Y253F/H	?
M244V	E275K/Q	T315I	F359V/I/C	A380T	S417F/Y	T315I	E255K/V	
L248R	D276G	F317 L/V/I/C	D363Y	F382L	I418S/V	T315A	T315I	
G250E/R	T277A	F359 V/I/C	L364I	L384M	S438C	F317L/V/I/C	F359V/I/C	
Q252E/R	E279K	Y342H	A365V	L387M/F	E453G/K			
Y253F/H	V280A/I	M343T	L370P	M388L	E459K/V			
E255K/V	V289A	A344V	V371A	Y393C	P480L			
E258D	V299L	M351T	E373K	H393R/P	F486S			

Fonte: Adaptado de (SOVERINI et al., 2015).

Nos casos de resistência, existem diversas estratégias terapêuticas para o manejo dos pacientes, dentre elas: aumento da dose do ITK em primeira linha, mudança de inibidores para segunda linha de tratamento ou mesmo o TCTH. O aumento da sobrevida e alcance de uma RMM é uma realidade para a grande maioria dos pacientes, mas o sucesso das terapias com ITKs depende do tempo de troca e da presença ou não de algumas mutações específicas (HOCHHAUS et al., 2015).

Múltiplas mutações pontuais no domínio quinase do gene *ABL1*

A presença de múltiplas mutações no DQ de *ABL1* foi observada no início da era dos ITKs de segunda geração, quando mutações que conferem resistência ao dasatinibe foram identificadas em clones que já possuíam mutações invisíveis previamente adquiridas pela exposição ao imatinibe (SHAH et al., 2007). Quando duas ou mais mutações estão no mesmo clone, são classificadas como mutações compostas, e quando duas ou mais mutações estão em clones diferentes são classificadas como policlonais (Figura 1.10).

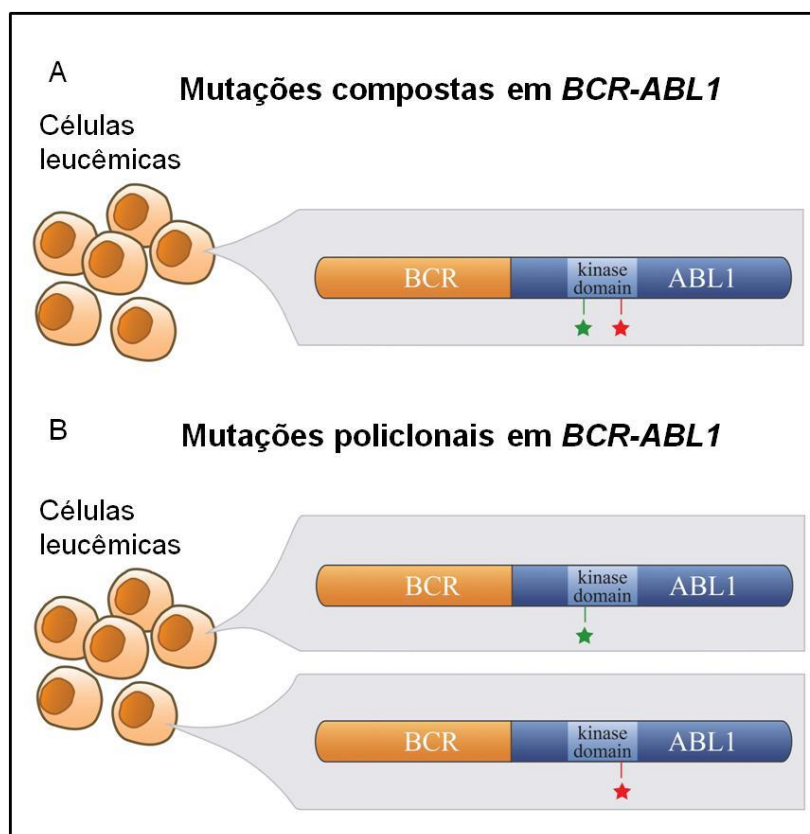


Figura 1.10: Classificação das mutações com relação a localização no clone do domínio quinase do *ABL1*. As mutações estão representadas por estrelas verde e vermelha na figura. A) mutação composta - presença de duas mutações no mesmo clone *BCR-ABL1*; B) mutação policlonal - presença das mutações em clones *BCR-ABL1* diferentes.

Um trabalho publicado por Soverini e colaboradores (SOVERINI et al., 2013) mostrou que as mutações compostas eram frequentemente detectadas em pacientes com LMC e LLA Ph+ após a falha a vários ITKs. Em tal cenário, quase 40% dos clones resistentes aos inibidores detectáveis possuíam mutação composta múltipla (com três ou mesmo quatro mutações podendo ser, ocasionalmente, detectadas), mas as proteínas BCR-ABL1 traduzidas do gene com três mutações

eram geralmente selecionadas contra, provavelmente porque uma carga de mutação excessiva enfraquece a atividade da quinase.

Dois estudos recentes projetaram a linhagem BaF3 para expressar uma dada forma mutante de *BCR-ABL1* de segunda geração ITKs e de ponatinibe. O resultado foi que a concentração de fármaco intracelular necessária para inibir 50% da proliferação [IC50] da linhagem celular BaF3 é muito maior no caso de mutações compostas do que em mutações simples ou policlonais (GIBBONS et al., 2014; ZABRISKIE et al., 2014). Os resultados desses estudos *in vitro* sugerem que: (1) a maioria das mutações compostas confere resistência a todos os ITKs de segunda geração; e (2) algumas mutações compostas podem ser insensíveis até mesmo para o ponatinibe.

Em outro estudo realizado com pacientes em FC resistentes ao ponatinibe na presença da mutação T315I (63/231; 27%), foram observadas respostas superiores ao uso de ponatinibe quando comparado ao uso de outro ITK (dasatinibe e nilotinibe). Além disso, a resposta foi superior em pacientes com mutações simples (T315I) detectadas por espectrofotometria de massa (68%) quando comparada com mutações múltiplas (20, 32%). Em contraste, para pacientes em FC-LMC sem a mutação T315I, as respostas inferiores observadas anteriormente com o tratamento com dasatinibe / nilotinibe, em pacientes resistentes ao imatinibe, e com mutações múltiplas não foram observadas com o tratamento com ponatinibe, sugerindo que este pode ser particularmente vantajoso para pacientes com mutações múltiplas detectáveis por espectrometria de massa após resistência a ITK (PARKER et al., 2016). A experiência clínica é, naturalmente, obrigatória para estabelecer com precisão quais, os mutantes compostos podem certamente prejudicar eficácia de ponatinibe e isto ainda não está definido.

1.7.2) Mecanismos genéticos da resistência: BCR-ABL1 independente

Esses mecanismos referem-se à independência do gene *BCR-ABL1*, ou seja, desde os mecanismos gerais de resistência a múltiplas drogas, por exemplo, como relatado em vários tumores, quanto o influxo de drogas ou até mesmo mutação em outros genes.

OCT1

O transportador de cátion orgânico 1 (hOCT-1, também conhecido como SLC22A1) é o principal transportador de influxo ativo para o imatinibe nas células leucêmicas (THOMAS, 2004). Porém, os estudos que o correlacionam com a resistência também são controversos, assim como resultados *in vivo* e *in vitro*. Alguns encontraram uma relação diretamente proporcional entre a expressão do RNAm de OCT-1 e a resposta ao tratamento (CROSSMAN, 2005; WANG et al., 2008), inclusive relacionado a uma SLE e SLP (WHITE et al., 2007), enquanto que essa relação não foi encontrada em outros estudos (ZHANG et al., 2009).

ABCB1

Embora o papel da bomba de efluxo P-glicoproteína (Pgp), codificado pelo gene *ABCB1*, é inquestionável na resistência a fármacos de muitas neoplasias, na LMC, no entanto, existe uma longa questão se a PGP tem uma implicação na resistência ao ITK no cenário clínico (MAIA et al., 2018).

O imatinibe é um substrato da PGP de superfície celular que atua como uma bomba de efluxo de multidrogas dependente da energia. Estas são codificadas pelo gene membro 1 (*ABCB1 / MDR1*) pertencente a subfamília B (MDR / TAP). Estudos mostraram que as concentrações intracelulares do imatinibe foram significativamente menores nas células que expressam PGP (HEGEDUS et al., 2002; WIDMER, 2003). Um estudo de multianálise mostrou que os alelos: 2677G ou 3435T do gene (*ABCB1/MDR1*) previam uma resposta inferior ao imatinibe em pacientes com LMC, enquanto o genótipo 1236CC foi associado com melhor resposta em pacientes da região asiática, sugerindo a presença destes polimorfismos como marcadores de resposta (ZHENG et al., 2015).

Mutação em genes *BCR-ABL1* independentes

Do ponto de vista biológico o interesse está em saber quais alterações são verdadeiras diretoras (*drivers*) ou passageiras (*passangers*), ou seja, quais são os verdadeiros impulsionadores da doença e quais são resultados de uma maior instabilidade genética durante o curso de progressão da doença. Enquanto que do ponto de vista clínico, ainda são recentes as possibilidades de melhor segmentar os pacientes em FA ou CB.

Estudos mostraram que as células-tronco leucêmicas primitivas de LMC em FC de camundongos acumulam mais dano oxidativo ao DNA do que a sua contraparte normal, resultando na aquisição de mutações *BCR-ABL1* que conferem resistência a ITKs, como: deleções em *IKZF1* e ganhos e perda de cópias gênicas são observadas na fase acelerada e em pacientes com LMC resistentes a ITK (BOLTON-GILLESPIE et al., 2013). Outras mutações / alterações classicamente implicadas na CB incluem os genes: *TP53* (10-30%)(MORI et al., 1992), *RB 1* (até 20% dos casos) (AHUJA et al., 1991), *RUNX 1*(BECK et al., 2000; ROCHE-LESTIENNE et al., 2008) com fenótipo mieloide e deleções intragênicas de *CDKN2A* (50%) (SILL; GOLDMAN; CROSS, 1995) e *IKZF1* (65 a 80%) (NAKAYAMA et al., 1999) nas CB com fenótipos linfóide.

1.8) JUSTIFICATIVA

A LMC é um modelo de estudo para o tratamento e monitoramento de doença residual mínima em outras neoplasias em virtude do amplo conhecimento adquirido ao longo do tempo. O sucesso da terapia em adultos é um espelho para a modificação do tratamento em crianças e adolescentes. Porém, como esta é uma doença rara na infância, estudos que caracterizam marcos de resposta molecular ao longo da terapia ainda são poucos.

Estudos com 2ITK e 3ITK introduziram o conceito de resposta molecular precoce, formulando a ideia de que quanto mais cedo identificarmos o paciente que irá falhar a terapia, maior benefício ele terá com o uso de uma terapia alternativa. No Brasil, de maneira geral, o algoritmo de tratamento é iniciar com imatinibe, caso haja necessidade, trocar para um dos inibidores de segunda geração: dasatinibe e nilotinibe. A resposta molecular precoce é normalmente abordada para identificar falha aos inibidores de primeira linha, por isso, neste projeto decidimos utilizar o mesmo conceito, mas nos pacientes que falharam ao imatinibe com o objetivo de identificar precocemente o paciente que possui uma maior probabilidade de falhar, visando intervalos mais curtos de acompanhamento ao longo do tratamento a fim de impedir mais uma falha.

A única terapia curativa propriamente dita, ou seja, o alcance de indetectabilidade duradoura dos transcritos *BCR-ABL1*, ainda é o TCTH, que apesar de cada vez mais raro, ainda corresponde a uma parcela significativa (aproximadamente 10%) dos pacientes monitorados em nosso laboratório. Nesse caso, a aplicação de metodologias mais sensíveis, disponíveis atualmente, e o impacto na antecipação de uma possível recidiva em pacientes acompanhados por muito tempo (>5 anos) deve ser investigado. Existem poucos relatos, no TCTH, em relação ao valor (limiar) de %*BCR-ABL1*^{EI} capaz de identificar precocemente uma possível recaída. Além disso, é controverso se a demarcação de um valor ao longo do pós-TCTH poderá ser utilizado para tomada de decisão clínica.

Enquanto o valor clínico da presença e do tipo de mutação pontual simples, no DQ de *ABL1*, está bem caracterizado como mecanismo de resistência aos ITKs, o valor de múltiplas mutações (compostas ou policlonais) ainda não está totalmente elucidado. Do ponto de vista molecular, múltiplas mutações poderiam estar associadas ao mecanismo de evolução clonal da LMC. O aumento da proliferação celular, obtido pela ativação constitutiva da via, pode levar a um aumento da instabilidade genética e o surgimento de mutações pontuais no DQ de *ABL1*. Na

presença do inibidor pode haver seleção de clones portadores de mutações que conferem vantagem seletiva a célula afetada. O uso de mais de um inibidor por um mesmo paciente aumenta a evolução clonal das células *BCR-ABL1*, reduzindo a resposta ao tratamento. A existência de uma larga coorte de pacientes com LMC, possibilita a investigação, nos casos resistentes, da frequência e impacto clínico de múltiplas mutações.

Os mecanismos relacionados à progressão na doença ainda são pouco conhecidos, a grande instabilidade genética refletida no aumento do número de mutações *BCR-ABL1* dependentes (DQ de ABL1) ou independentes pode ser causa ou consequência da evolução da doença. A introdução de metodologias de sequenciamento de larga escala e com alta sensibilidade para detectar mutações em baixa frequência, que permitem avaliar um maior número de genes pode ser útil para um melhor entendimento das fases avançadas da doença. Nós propomos a avaliar, através de sequenciamento de nova geração (NGS) alvo dirigido, a presença de mutações em um painel gênico em pacientes com amostras antes e depois da progressão da doença, em pacientes que não possuíam mutações no DQ de ABL1.

Como observado, apesar de ser proveniente de uma alteração cromossômica consistente, sua abordagem ainda é complexa, se avaliarmos que apesar do sucesso, as respostas a terapia são heterogêneas com grupos resistentes ao tratamento e os mecanismos subjacentes a tal não foram totalmente elucidados e compreendidos assim como os relacionados a progressão na doença.

Este trabalho foi dividido em três partes:

- I) Resposta ao tratamento com ITK e TCTH;
- II) Mecanismos *BCR-ABL1* dependentes;
- III) Mecanismos *BCR-ABL1* independentes.

2) OBJETIVO GERAL

Estudar a resposta molecular de pacientes com LMC submetidos a diferentes modalidades terapêuticas (ITK e TCTH) e os mecanismos genéticos subjacentes à resistência e a progressão.

3) Parte I: Respostas na LMC

Visando uma caracterização do perfil dos pacientes com LMC referenciados ao laboratório, a primeira parte desta tese abordará os parâmetros definidos para classificar os pacientes como respondedores ótimos e falha ao tratamento com imatinibe e a partir deste entendimento, estudar marcadores precoces de resposta, seja aos inibidores de segunda geração ou recaída ao TCTH.

3.1) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Padronizar a metodologia de PCR em tempo real para o monitoramento molecular dos pacientes com LMC em acompanhamento;
- Caracterizar a subcoorte de pacientes adultos com LMC em uso de ITK quanto a resposta a terapia;
- Avaliar o valor da resposta molecular precoce aos 3 meses após o início da terapia na subcoorte de pacientes adultos com LMC;
- Avaliar nos pacientes com LMC que falharam a terapia com imatinibe e trocaram para inibidores de segunda geração marcadores precoces preditivos de resposta;
- Caracterizar a subcoorte de pacientes pediátricos com LMC em uso de ITK quanto a resposta a terapia e frequência de isoforma;
- Avaliar o valor da resposta molecular precoce aos 3 meses após o início da terapia na subcoorte de pacientes pediátricos com LMC;
- Comparar a metodologia de PCR digital com RT-qPCR em amostras de pacientes com LMC submetidos ao TCTH;
- Estabelecer um parâmetro de corte no valor dos níveis de *BCR-ABL1* preditivos de recidiva em pacientes com LMC submetidos ao TCTH;

3.2) METODOLOGIA

3.2.1) Pacientes e desenho do estudo

A coorte do laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA, Rio de Janeiro compreende 1.401 pacientes provenientes de diversos centros de tratamento além do Serviço de Hematologia do INCA. No presente trabalho foram incluídas amostras *BCR-ABL1* positivas, referidas ao laboratório para estabelecimento do diagnóstico de LMC (método de RT-PCR para detecção do gene *BCR-ABL1*, *vide seção 3.2.3.3*) e acompanhamento de doença residual mínima por biologia molecular (método de RT-qPCR para quantificação do gene *BCR-ABL1*, *vide seção 3.2.3.4*) no período de dezembro de 2005 a dezembro de 2016 (Figura 3.1). Da coorte original, foram selecionados para a Parte I deste trabalho subcoortes de acordo com os seguintes critérios: (i) existência de amostra suplementar para estender as análises do diagnóstico; (ii) existência de amostras com acompanhamento mínimo de 12 meses após início da terapia ou após o TCTH; (iii) existência de dados clínicos bem caracterizados; (iv) amostras nos tempos: 3, 6 e 12 meses após o início da terapia (Figura 3.1).

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a coorte original foi dividida em dois grandes grupos: LMC de adulto (252 pacientes) e LMC pediátrica (21 pacientes). A subcoorte dos pacientes que foram avaliados no estudo de marcadores precoces de resposta ao tratamento foi selecionada do grupo dos pacientes adultos com LMC que falharam ao imatinibe e fizeram uso de 2ITK (74 pacientes). Enquanto que a subcoorte de 101 pacientes submetidos aos TCTH foi originada da coorte principal (Tabela 3.1).

Esse estudo obedeceu às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res. nº 196/1996) de acordo com o projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA de número 100/04 (Anexo I).

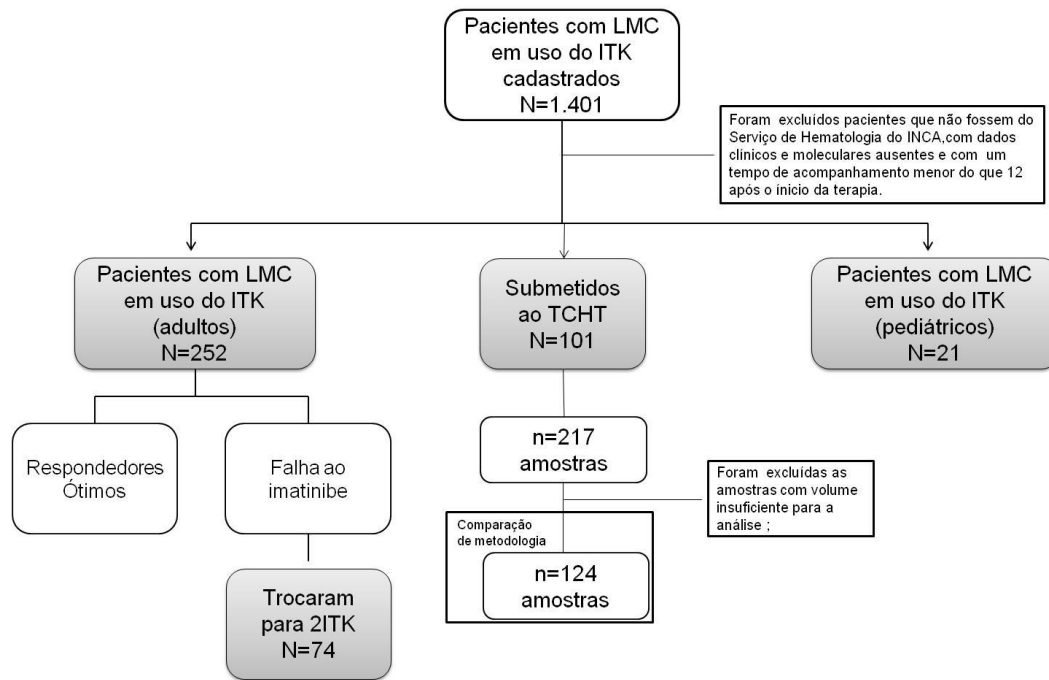


Figura 3.1: Desenho do Estudo. Este quadro apresenta o desenho do estudo e seleção dos pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) para as diferentes etapas do trabalho (projetos principais destacados em cinza). Primeiramente foram selecionados da coorte total (n=1.401), pacientes clínica e molecularmente caracterizados provenientes do Serviço de Hematologia do INCA diagnosticados com LMC maiores de 18 anos (adultos, n=252) e ≤18 anos (pediátricos, n=21). Entre os que falharam ao imatinibe e trocaram para inibidores de segunda geração (2ITK): dasatinibe ou nilotinibe foram selecionados 74 para o estudo de marcadores precoces de resposta ao tratamento e os 101 pacientes que foram submetidos para transplante de célula-tronco hematopoiética (TCTH) vieram da coorte inicial, sendo 217 amostras analisadas para avaliar o valor preditivo de *BCR-ABL1* e 124 amostras comparadas pela metodologia de RT-qPCR e ddPCR.

Legenda: ITK = inibidor tirosina quinase

Tabela 3.1: Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes com leucemia mielóide crônica para cada estudo.

Subcoorte	ADULTOS	TROCARAM PARA 2ITK	PEDIÁTRICOS	SUBMETIDOS A TCTH
N	252	74	21	101
Critérios de inclusão:	1. dados clínicos bem caracterizados; 2. dados moleculares nos tempos de 3, 6 e 12 meses (no mínimo) após o início da terapia; 3. acompanhamento de no mínimo 12 meses após o início da terapia;			
Critérios de exclusão:	1. interferon –alfa em primeira linha de tratamento 2. pacientes com <18 anos;	1. pacientes submetidos ao TCTH 2. pacientes com <18 anos; 3. pacientes que trocaram de inibidor por toxicidade ao imatinibe;	1. pacientes com ≥18 anos;	1. pacientes que não foram submetidos ao TCTH 2. pacientes com <18 anos;

Legenda: 2ITK = inibidor de segunda linha de tratamento, podendo ser dasatinibe ou nilotinibe; TCTH = transplante de células – tronco hematopoiéticas.

3.2.2) Definições

3.2.2.1) Resposta: hematológica, citogenética e molecular

Os conceitos de resposta utilizados neste trabalho, e utilizados para discriminar pacientes respondedores e não respondedores a terapia, foram baseados nas recomendações internacionais do ELN (BACCARANI et al., 2009a).

Existem diferentes tipos de resposta, que variam em relação ao parâmetro utilizado: hemograma, cromossomo Ph+ e *BCR-ABL1*. Logo, as repostas podem ser do tipo: hematológica, citogenética e molecular, respectivamente.

a) resposta hematológica completa (RHC) é quando a leucometria é $<10 \times 10^9/L$ em granulócitos imaturos, presença de menos de 5% de basófilos, plaquetas $<450 \times 10^9/L$ no SP e baço não palpável.

b) resposta citogenética (RCg) - é discriminada em vários níveis de sensibilidade, sendo a RCgC o principal marco no acompanhamento. As repostas citogenéticas se baseiam na proporção de cromossomos Ph+ em relação ao total de células analisadas (no mínimo 20 metáfases). As repostas citogenética classificadas neste estudo foram: completas (RCgC; Ph + = 0), parcial (RCgP; Ph + $<35\%$) e nenhuma (Ph + $>95\%$).

c) resposta molecular (RM) - é classificada de acordo com a porcentagem da razão entre os níveis de transcritos *BCR-ABL1* e um gene de referência, neste estudo, o *ABL1*. Essa razão é obtida por RT-qPCR e multiplicada por um fator de conversão laboratório específico para obtenção dos resultados em escala internacional (EI).

A Resposta Molecular Maior (RMM) é definida como uma redução de 3 log em relação aos níveis de *BCR-ABL1* do diagnóstico (100%) ou seja sempre que os valores sejam $\leq 0,1\%$ *BCR-ABL1*^{EI}. Esse valor é um marco de resposta ao tratamento com ITK, ou seja, pacientes que atingem a RMM dentro de um determinado tempo são considerados respondedores ótimos. O número mínimo de 10.000 cópias do gene de referência (*ABL1*) foi estabelecido como critério de qualidade (amostras com <10.000 cópias foram repetidas). Os critérios para a classificação de repostas mais profundas, RM^{4.0}, ^{4.5} e ^{5.0} foram utilizados de acordo com recomendações de Cross e colaboradores (CROSS et al., 2012, 2015).

3.2.2.2) Sobrevida: global, livre de progressão e livre de evento

Os conceitos de SG, SLP e SLE foram estabelecidas de acordo com as seguintes recomendações (GUILHOT et al., 2012):

- a) Sobrevida Global (SG) – definida como morte a qualquer tempo, morte de qualquer natureza, relacionada diretamente ou não com a doença;
- b) Sobrevida Livre de Progressão (SLP) – progressão para FA ou CB. A data utilizada foi a do hemograma ou mielograma em que o número de blastos evidenciou progressão, utilizando os critérios da ELN (Tabela 3.2);

Tabela 3.2: Definição das fase da doença segundo as recomendações internacionais do *European Leukemia Net (ELN)*.

	parâmetros
fase crônica	blastos <15% basófilo < 20%
fase acelerada	blastos 15% basófilos ≥20% trombocitopenia ≤ 100x10 ⁹ /L
crise blástica	≥ 20% de blastos proliferação de blastos extramedular

c) Sobrevida Livre de Evento (SLE) – foram considerados eventos em uso de imatinibe: (i) falha de resposta molecular sempre quando valores de *BCR-ABL1*^{EI} >10% aos 6 e/ou *BCR-ABL1*^{EI} >1% aos 12 meses após o início da terapia; (ii) perda de qualquer melhor resposta atingida (hematológica, citogenética ou molecular); (iii) perda da RMM obtida em duas análises sequenciais; (iv) aquisição de mutações relacionadas a resistência a qualquer tempo. Enquanto que falha para 2ITK foi considerado: (i) falha de resposta molecular sempre quando valores de *BCR-ABL1*^{EI} >10% aos 6 e/ou 12 meses após o início da terapia; (ii), (iii) e (iv) iguais ao anterior. Foi considerada a data da amostra em que um desses eventos ocorreu primeiro.

Os fatores prognósticos para estabelecimento do risco relativo ao diagnóstico na LMC é baseado em três sistemas pelas características clínicas: Sokal, Hasford (ou Euros) e Eutos. Nesse trabalho para o estabelecimento do prognóstico foi utilizado o Sokal na subcoorte dos adultos e na coorte pediátrica os três sistemas foram utilizados, isso porque alguns estudos mostram que o Sokal e o Hasford, não são sistemas associados a prognóstico na LMC pediátrica (OYEKUNLE et al., 2012; GURREA SALAS et al., 2015), sendo o Eutos o mais recomendado (MILLOT et al., 2017).

O Sokal considera a idade, a porcentagem de blastos no sangue, o tamanho do baço e a quantidade de plaquetas. Estes fatores são utilizados para classificar os pacientes em grupos de risco (baixo, intermediário ou alto). Enquanto que o Hasford inclui além dos fatores mencionados acima, o número de basófilos e eosinófilos. Ter grandes quantidades dessas células indica um pior prognóstico. O Eutos leva em consideração somente as variáveis: basófilo e tamanho do baço (Tabela 3.3).

Tabela: 3.3: Fórmulas matemáticas usadas para calcular os diferentes escores prognósticos.

Sistema	Fórmula matemática	Categorização do risco baixo/intermediário/alto
Sokal	$0,0116 \times (\text{idade}-43,4) + 0,0345 \times (\text{baço}-7,51) + 0,188 \times ((\text{plaquetas}/700)^2 - 0,563) + 0,0887 \times (\text{blastos}-2,10)$	<0,8/0,8-1,2/>1,2
Sokal (pediátrico)	$(0,0255 \times (\text{baço} - 8,14) + 0,0324 \times (\text{blastos} - 2,22) + 0,1025 \times [(\text{plaquetas}/700)^2 - 0,627] - 0,0173 \times (\text{hematocrito}-34,2) - 0,2682 \times (\text{sex}-1,4))$ feminino=-2,0; masculino=-1,0	<0,8/0,8-1,2/>1,2
Hasford	$(0,6666 \times \text{idade} [0 \text{ quando a idade } <50 \text{ anos; } 1 \text{ diferente do } 0] + 0,0420 \times \text{tamanho do baço [cm abaixo da margem costal]} + 0,0584 \times \text{blastos [\%]} + 0,0413 \times \text{eosinófilos[\%]} + 0,2039 \times \text{basófilos [0 quando basófilos } <3 \text{ \%; } 1 \text{ diferente do } 0] + 1,0956 \times \text{contagem de plaqueta [0 quando a contagem da plaqueta } <1500 \times 10^9/\text{L; } 1 \text{ diferente de } 0]) \times 1000)$	$\leq 780 / >780-1480 / >1480$
Eutos	$7 \times [\% \text{ basófilo}] + 4 \times [\text{tamanho do baço}]$	$\leq 87 / \text{não definido} / >87$

3.2.2.3) Nomenclatura e conceitos para o ensaio RT-qPCR:

Todos os parâmetros avaliados no ensaio de RT-qPCR foram definidos baseado no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009) e pelas recomendações internacionais para o monitoramento molecular de pacientes com LMC em uso de inibidor tirosina quinase (FORONI et al., 2011; CROSS et al., 2015).

a) Parâmetros da Curva Padrão

A curva padrão do ensaio quantitativo de RT-qPCR é graficamente representada como uma regressão linear semi-log plotada, sendo o eixo x representado pelo ciclo de quantificação (C_q) e o eixo y a diluição seriada de seis pontos (variando de 10⁶ a 10) com número de cópias conhecido em duplicata.

➤ **Threshold** - representa o limiar de amplificação, ou seja, o número mínimo de ciclos para o início da amplificação. O ponto em que o amostra cruza este limite, a quantificação do produto será determinada. Este limite ideal deve ser no início da fase exponencial da amplificação do produto, visando uma melhor eficiência da reação, pois se supõe que nesta fase há abundância de insumos como enzimas e substratos para a reação de PCR.

- o ciclo de amplificação (C_q) corresponde ao ciclo da reação em que a amplificação cruzou a linha do *threshold* e o ponto de referência para a quantificação.

A determinação do *threshold* ideal foi calculada após a análise consecutiva da curva padrão em quatro ensaios independentes, sendo analisados as diluições seriadas do plasmídeo (10⁶ a 10), em triplicata e o valor médio do *threshold* automático sugerido em cada ensaio e cada gene foi adotado. Após a determinação desta linha limite para cada gene individualmente (*BCR-ABL1* e *ABL1*), esta foi mantida para todas as análises.

➤ **Slope = inclinação da reta** - A regressão linear da diluição seriada em log resultado da reação de amplificação é uma medida da eficiência. Para obter resultados precisos e reproduzíveis, as reações devem ter uma eficiência o mais próxima possível de 100%, para isso o declive deve ser em torno de -3.32 (vide o cálculo da eficiência da reta 3.2.2.3 – seção d).

- Para este estudo foram considerados os valores de inclinação da reta calculado pelos seis pontos de diluições analisados em duplicata na faixa de -3,20 e -3,60, sendo o ideal de -3,32.

➤ **Intercept = interceptar** – este valor corresponde ao limite teórico de detecção da reação, ou seja, o valor de C_q esperado se o menor número de cópias de moléculas-alvo indicado no eixo x desse origem a amplificação estatisticamente significativa. O ensaio foi otimizado para que os valores de interceptação da reta no eixo x fossem similares para ambos os genes, uma vez que variação, tanto entre ensaios quanto entre os genes analisados indicam ensaio subótimo.

➤ **Eficiência da reação** - é calculada de acordo com a seguinte fórmula: $10^{-1/\text{slope}}$, quanto mais próximo de 100%, melhor é a eficiência. Por isso a importância do valor de inclinação da reta, quanto mais próximo de -3,32 em uma diluição de 10, mais perto de 100% será a eficiência a reação.

Uma reação com 100% de eficiência significa que a cada ciclo de amplificação todas as suas moléculas duplicaram no ciclo seguinte.

b) Conceitos aplicado nas metodologias de RT-qPCR, ddPCR e Nested

Para o ensaio de ddPCR, os parâmetros foram definidos baseado no dMIQE (digital *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (HUGGETT et al., 2013) e pelo artigo previamente publicado na área comparando metodologias quantitativas (ALIKIAN et al., 2017).

➤ **Sensibilidade analítica** – refere-se ao número mínimo de transcritos detectáveis medidos com precisão em um ensaio. Normalmente, a sensibilidade é expressa como limite de detecção (= do inglês *Limit of detection* - LoD), que é a concentração que pode ser detectado com razoável certeza (95% de probabilidade é comumente usada) um dado procedimento analítico. O LoD mais sensível teoricamente possível é de três cópias por PCR, supondo distribuição de Poisson, 95% de chance de

incluir pelo menos 1 cópia no PCR e cópia única detecção (BURNS; VALDIVIA, 2008).

Como o gene *ABL1*, já possui um número mínimo de 10.000 cópias para que o seu resultado determinada amostra seja analisada, por questões de controle de qualidade do cDNA, o LoD só foi analisado para a detecção do transcrito *BCR-ABL1*.

Para o cálculo do LoD das metodologias utilizadas foram realizadas diluições seriadas dos plasmídeos em 100, 50, 10, 5 e 1 cópia, analisadas em três ensaios consecutivos, com seis replicatas para cada cópia para o ensaio RT-qPCR, enquanto que para o ddPCR foi realizado um único experimento, em duplicata dessas diluições.

Para os ensaios RT-qPCR e ddPCR foi utilizado o programa GenEx (bioMCC, v.6.0) para o cálculo da distribuição de Poisson, ou seja, em 95% das vezes em que um determinado número de cópias foi detectado (não necessariamente quantificada com precisão).

O cálculo do Limite de Quantificação (LoQ, do inglês *Limit of Quantification*) foi baseado em publicação anterior (ARMBRUSTER; PRY, 2008). Este levou em consideração o desvio padrão (DP) das replicatas: (LoQ= LoD \pm 2 x DP).

- **Especificidade Analítica** - refere-se detecção da sequência alvo apropriada, ao ensaio de RT-qPCR e ddPCR, excluindo alvos não específicos também presentes numa amostra.

O ensaio de especificidade analítica foi realizado para o RT-qPCR e ddPCR. Este foi realizado com cDNA de linhagens *BCR-ABL1* positivas: K562 e KBM5; *BCR-ABL1* negativa: Nalm6 além, de DNA de linhagens *BCR-ABL1* positiva, a K562 e KBM5. Essas foram analisadas em triplicatas, em 1 placa. A curva padrão com diluição de 10^6 a 10 também foi analisada em triplicata tanto para o gene de referência *ABL1* quanto para o gene alvo *BCR-ABL1*.

- **Especificidade do Diagnóstico** – refere-se a percentagem de indivíduos sem uma determinada doença em que o ensaio identifica como negativo para aquela doença.

Foram selecionadas duas amostras, sendo a primeira de um paciente diagnosticado para a LMC (por outra metodologia, o RT-PCR *multiplex*), e a segunda de um paciente negativo para esta neoplasia (também comprovado pela metodologia de RT-PCR *multiplex*). Essas amostras foram analisadas em quadriplicata e em cinco dias consecutivos e só foi realizado para a metodologia de RT-qPCR.

As terminologias descritas a seguir foram utilizadas no experimento de especificidade ao diagnóstico e para comparação dos ensaios quantitativos de RT-qPCR e ddPCR

Sensibilidade – é a capacidade de um teste detectar corretamente os indivíduos doentes, ou seja, os verdadeiros positivos;

Especificidade – é a capacidade de um teste identificar corretamente os indivíduos saudáveis, ou seja, os verdadeiros negativos;

Valor Preditivo Positivo – corresponde a proporção dos verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com o teste positivo; expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença;

Valor Preditivo Negativo – corresponde a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com o teste positivo; expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença;

- **Variabilidade Intraensaio** - refere-se à robustez e precisão do ensaio com as mesmas amostras repetidamente analisados no mesmo ensaio. Para este ensaio, foi analisados seis replicatas para cada uma das 6 diluições do plasmídeo, a fim de avaliar a repetibilidade do ensaio.
- **Variabilidade Interensaio** - refere-se à variação entre os resultados de corridas diferentes. Valores C_q gerados a partir de diferentes experimentos estão sujeitos à variação prazo entre inerente; portanto, inapropriados para

tal representação. Para este ensaio, foram comparados os DP entre cada uma das seis replicatas para cada diluição de plasmídeo entre três experimentos diferentes. Ou seja, cada placa havia seis replicata para cada uma das diluições do plasmídeo (10^6 a 10) para cada gene alvo; o DP entre cada um desses pontos entre cada placa foi comparado. Este foi realizado somente para a metodologia de RT-qPCR.

3.2.3) Método

As amostras de pacientes com LMC (suspeita clínica ou monitoramento) provenientes preferencialmente do SP em tudo com EDTA foram identificadas e cadastradas no banco de dados do laboratório. O RNA foi extraído do sangue total, após a lise celular de acordo com os protocolos descritos a seguir.

3.2.3.1) Extração de RNA total

Após lise celular, 7×10^6 células foram ressuspensas em 1mL de Trizol[®], de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foram agitadas vigorosamente e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e adicionados 0,2mL de clorofórmio. A amostra foi centrifugada a 12.000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo devidamente identificado e o RNA precipitado mediante a adição de 0,5mL de isopropanol, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 75%, incubado à temperatura ambiente por 7 minutos e diluído em 12µl de água Dietil pirocarbonato (DEPC).

A quantificação e o grau de pureza do RNA foram avaliados por espectrofotometria (NanoDrop[®]), pela leitura no comprimento de onda em 260 e 280nm, considerando-se como pura uma amostra de RNA com valor da razão 260/280 próximo a 2,0. Este foi armazenado a -80°C.

3.2.3.2) Síntese do DNA complementar (cDNA)

A reação de retrotranscrição foi realizada a partir de 2µg de RNA total. O RNA foi incubado por 10 minutos a 65°C com iniciadores randômicos hexaméricos (5µM) (*Random Hexamer Primers*, Invitrogen). Posteriormente foram adicionados um *mix* contendo tampão ((20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM

KCl), MgCl₂ (2,5mM), DTT (10mM), dNTPs (1mM)), a enzima transcriptase reversa Superscript™ (10U/ml) (Invitrogen), o inibidor de RNase *RNAguard* (1U/ml) (Invitrogen) e água-DEPC até completar o volume de 20µL. Esta reação foi incubada por 10 minutos a 42°C. Após o termino da retrotranscrição, esta reação foi novamente incubada, mas a 65°C por 5 minutos, para a interrupção da transcriptase reversa. Por fim, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.2.3.3) PCR qualitativos para BCR-ABL1

O Nested PCR, com uma sensibilidade de 10⁻⁶, foi realizado em duas etapas, tendo como objetivo o isolamento do *ABL1* translocado e não o constitutivo, para isso utiliza-se iniciadores mais internos na segunda etapa. O resultado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta (OTAZÚ et al., 2000).

3.2.3.4) PCR quantitativa em tempo real por retrotranscrição (RT-qPCR)

A quantificação absoluta do transcrito *BCR-ABL1* foi realizada por RT-qPCR, no equipamento Vii7 (ThermoFisher®), através de uma curva padrão, construída por plasmídeos com número de cópias conhecidos. Esta técnica só permite a identificação das isoformas mais frequentes na LMC: e13a2 e e14a2. O gene *ABL1* não translocado foi utilizado como gene de referência. Os iniciadores e sondas utilizados foram os descritos anteriormente durante a padronização internacional do Grupo Europeu Contra o Câncer (*European Against Cancer – EAC*) (GABERT et al., 2003).

Este ensaio quantitativo necessita de uma curva padrão e esta foi realizada em cada ensaio e individualmente para cada gene, ou seja, é realizada uma curva para o gene *ABL1* e outra para o *BCR-ABL1*. O plasmídeo foi o mesmo, porém o conjunto de iniciadores e sondas é específico.

Todos os pontos da curva padrão foram analisados em duplicatas e em seis diluições que variaram de 10⁶ a 10 cópias, para ambos os genes: alvo e de referência. Para valores menores do que 10 cópias para o gene *BCR-ABL1*, foram utilizadas as recomendações de Cross e colaboradores (2015) (CROSS et al., 2015).

Em dois tubos cônicos de 1,5mL foram preparado o *mix* de reação, um para o gene de referência (*ABL1*) e outro para o alvo (*BCR-ABL1*), na qual foi adicionando 9,5mL do *mix* (0,01 de iniciador *forward* + *reverse* + 0,03 de sonda + 9,3 de água de injeção) + 12,5mL de taqMan MasterMix® (comercial - ThermoFisher®) para cada amostras. Posteriormente foi adicionado 22µL desta reação na placa de 0,1mL de 96 poços e distribuídos individualmente em cada poço devidamente identificado. Por fim, 3µL de cDNA de cada amostra foi adicionado no poço.

O plasmídeo foi adicionado em uma sala independente, de pós – PCR no volume de 3µL de cada diluição. A placa foi selada e levada ao termociclador para a reação da PCR: 95°C por 10 minutos; 40 vezes o 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minutos e 60°C por 1 minuto.

O fator de correção laboratório específico para validação dos resultados na Escala Internacional foi realizada através do programa internacional de padronização de ensaios de RT-qPCR para *BCR-ABL1* liderado pela Dra Susan Branford, Centro de Biologia do Câncer, Universidade de Adelaide, Australia (BRANFORD et al., 2008).

3.2.2.5) Droplet digital PCR (ddPCR -BioRad®)

Para cada amostras foi utilizado 20µL de reação contendo 1x Bio-Rad RT-dPCR SuperMix. e 900nmol/L dos iniciadores *forward* e *reverse* e 250nmol/L de para cada sonda (genes alvos: *ABL1* e *BCR-ABL1* analisados individualmente) e 1µL de cDNA. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e para o controle negativo foi utilizado 1µL de água sem nuclease no lugar do cDNA. Esta reação foi colocada no equipamento para que as gotas (*droplets*) fossem geradas, de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR foi realizada no *C1000 Touch thermocycler* (Bio-Rad), com velocidade de rampa de 2°C/segundo. O programa utilizado para a reação de amplificação foi: 96°C por 10 minutos e 40 ciclos a 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, com incubação final a 98°C por 10 minutos e estabilização da temperatura a 12°C. O QX200 Droplet foi utilizada para a contagem e determinação da fluorescência das gotas geradas, enquanto que os dados

foram analisados através do programa QuantaSoft v.7.0.1. Foi considerado resultado indetectável um valor <5.000 gotas.

Os mesmos plasmídeos diluídos descritos anteriormente foram utilizados também nesta metodologia a fim de comparar a equivalência no número de cópias em ambos os ensaios.

3.2.4) Cálculo da redução da carga leucêmica pela metade

O *halving time* é um ponto em que carga leucêmica foi reduzida pela metade. Essa redução se dá ao longo do tempo, contado em dias de modo que o *halving time* é definido dentro de um período de tempo.

O cálculo foi baseado em publicação anterior (BRANFORD et al., 2014), de acordo com a fórmula $c = -\ln(2) / k$, onde c é o tempo, em dias, em que a carga leucêmica foi reduzida pela metade, k é o valor da dobra de *BCR-ABL1* (valores de *BCR-ABL1* no momento da troca para 2ITK (linha de base), menos %*BCR-ABL1^{EI}* após 3 meses divididos pelos dias entre esses valores ($k = [\ln(b) - 2 \ln(a)]/d$), sendo a o valor basal de %*BCR-ABL1^{EI}*; b %*BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses e d o valor em dias entre essas duas medições. O *halving time* então incorpora as variações relativas aos transcritos %*BCR-ABL1^{EI}* entre as medições e também o número de dias entre essas, que são parâmetros importantes para uma avaliação confiável da cinética da resposta molecular.

Os valores utilizados para o cálculo, para cada paciente, foram:

- %*BCR-ABL1^{EI}* antes da troca; a data do momento da troca (com uma mediana de tempo de 20 dias – variando de 10 a 30 dias); o valor de %*BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses depois da troca; a data exata aos 3 meses (com uma mediana de 3,2 meses).

3.2.5) Análises estatísticas

Para a análise dos testes estatísticos foram utilizados os seguintes programas: GraphPad Prism (v.6.0); SPSS (v5.0) e MedCal (v.16.4.3).

3.2.5.1) Distribuição de Poisson

Foi utilizado para o cálculo do limite de detecção do número de cópias de *BCR-ABL1* pela metodologia de RT-qPCR, vide figura 3.3.

3.2.5.1) Regressão Linear

Foi utilizado para os parâmetros de linearidade dos pontos de diluição da curva padrão, vide tabelas 3.4 e 3.5; e figura 3.4. E no ensaio de comparação das metodologias de RT-qPCR e ddPCR para cada gene, vide figura 3.19.

3.2.5.3) Teste t

Para as variáveis quantitativas foi utilizado o teste T bi-caudal, considerando os valores $<0,05$ como significativos, vide figuras 3.6 e 3.10; tabelas 3.13 e 3.17 (variáveis: tamanho do baço e leucometria) e 3.18 (variáveis: tamanho do baço, leucometria e mediana dos valores dos transcritos *BCR-ABL1*^{EI}).

3.2.5.4) Teste de Fisher

Foi utilizado para comparação de variáveis qualitativas, vide tabela 3.11, 3.14, 3.16, 3.17 e 3.18 (variáveis: respostas citogenética e molecular e sobrevida).

3.2.5.5) Curva ROC

O cálculo, em dias, que apresentou uma maior sensibilidade e especificidade foi calculado através da curva ROC (características operacionais do receptor, do inglês *Receiver Operating Characteristic*) pelo índice de Youden, uma vez que nossas variáveis eram quantitativas. A área dentro da curva ROC (AUC, do inglês *Area Under ROC*) também foi avaliada, vide figuras 3.11; 3.13; 3.16 e 3.17.

3.2.5.6) Kaplan Meier

Foi utilizado para as curvas de SLE, SLP e SG as probabilidades de sobrevivência foram comparadas usando o teste log-rank, vide figuras 3.7; 3.8, 3.11, 3.14 e 3.16.

3.2.5.7) Índice kappa

é uma medida de concordância usada em escalas nominais e reflete o quanto as observações se afastam do esperado, fruto do acaso, indicando assim o quão legítimas as interpretações são. Neste estudo foi utilizada para avaliar os valores de *BCR-ABL1* identificados por diferentes metodologias.

3.3) RESULTADOS

3.3.1) Padronização das metodologias quantitativas

Volumes de reação / concentrações de iniciadores e sonda – A combinação que obteve a melhor eficiência de reação com menor concentração foi a de 300nM de iniciador e 100nM de sonda. A eficiência foi de 99,7% para o gene *ABL1* e 99,9% para o *BCR-ABL1*, e o R^2 foi, respectivamente, 0,9997 e 0,9999 (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Resultado da combinação entre diferentes concentrações de iniciadores e sondas.

	<i>ABL1</i>				<i>BCR-ABL1</i>			
	Inclinação = <i>slope</i>	Intercepta = <i>Intercept</i>	Eficiência	R^2	Inclinação = <i>slope</i>	Intercepta = <i>Intercept</i>	Eficiência	R^2
100nM de iniciador x 100nM de sonda	-3,51	39,08	92,7%	0,9210	-3,50	39,58	92,4%	0,9210
200nM de iniciador x 200nM de sonda	-3,55	38,88	91,3%	0,9098	-3,50	38,18	89,6%	0,9098
300nM de iniciador x 300nM de sonda	-3,61	37,09	89,2%	0,8901	-3,58	38,39	87,9%	0,8901
100nM de iniciador x 200nM de sonda	-3,34	39,01	99,3%	0,9927	-3,33	39,51	99,7%	0,9927
100nM de iniciador x 300nM de sonda	-3,44	38,76	95,3%	0,9912	-3,41	40,03	94,5%	0,9912
200nM de iniciador x 100nM de sonda	-3,34	39,91	99,3%	0,9992	-3,33	39,31	99,7%	0,9992
200nM de iniciador x 300nM de sonda	-3,32	38,90	100,0%	0,9991	-3,33	38,02	99,7%	0,9991
300nM de iniciador x 100nM de sonda	-3,33	39,98	99,7%	0,9997	-3,32	39,71	100,0%	0,9997

Em negrito estão as concentrações de iniciadores e sondas com maior eficiência de reação.

Cálculo do *threshold* para cada gene

O *threshold*, limite da amplificação, foi definido como 0,1 para o gene *ABL1* e 0,04 para o *BCR-ABL1*, após a aferição da média do valor automático sugerido pelo programa de análise dos dados do termociclador após quatro ensaios (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Avaliação do *threshold* automático para cada gene.

Ensaio	<i>ABL1</i>					<i>BCR-ABL1</i>				
	<i>Threshold</i> automático	Inclinação = <i>slope</i>	Intercepta = <i>Intercept</i>	Eficiência	R^2	<i>Threshold</i> automático	Inclinação = <i>slope</i>	Intercepta = <i>Intercept</i>	Eficiência	R^2
Placa 1	0,11	-3,44	39,4	95,3%	0,997	0,04	-3,51	38,4	92,70%	0,992
Placa 2	0,12	-3,32	39,2	100,0%	0,998	0,05	-3,45	38,9	94,90%	0,993
Placa 3	0,09	-3,61	39,1	89,2%	0,989	0,03	-3,60	39,1	89,60%	0,992
Placa 4	0,12	-3,34	38,9	99,3%	0,991	0,04	-3,34	38,8	99,30%	0,999
MÉDIA	0,11	-3,43	39,15	95,9%	0,994	0,04	-3,48	38,8	94,1%	0,994

Sensibilidade Analítica (= Limite de Detecção - LoD)

O resultado das seis replicatas nas diluições 100, 50, 10, 5 e 1 para o gene BCR-ABL1, foram avaliados e 95% das amostras foram detectadas com valores > 2,53 cópias, sendo este o LoD do nosso ensaio para a metodologia de RT-qPCR (Figura 3.2). Enquanto que o LoQ variou de 2,29 a 2,77 cópias, uma vez que o desvio padrão das replicatas no ensaio foi, em média, 0,12. Sendo conservador, isso significa dizer que nosso ensaio foi capaz de quantificar três cópias e que menos do que isso, mesmo que seja detectável, não foi quantificável.

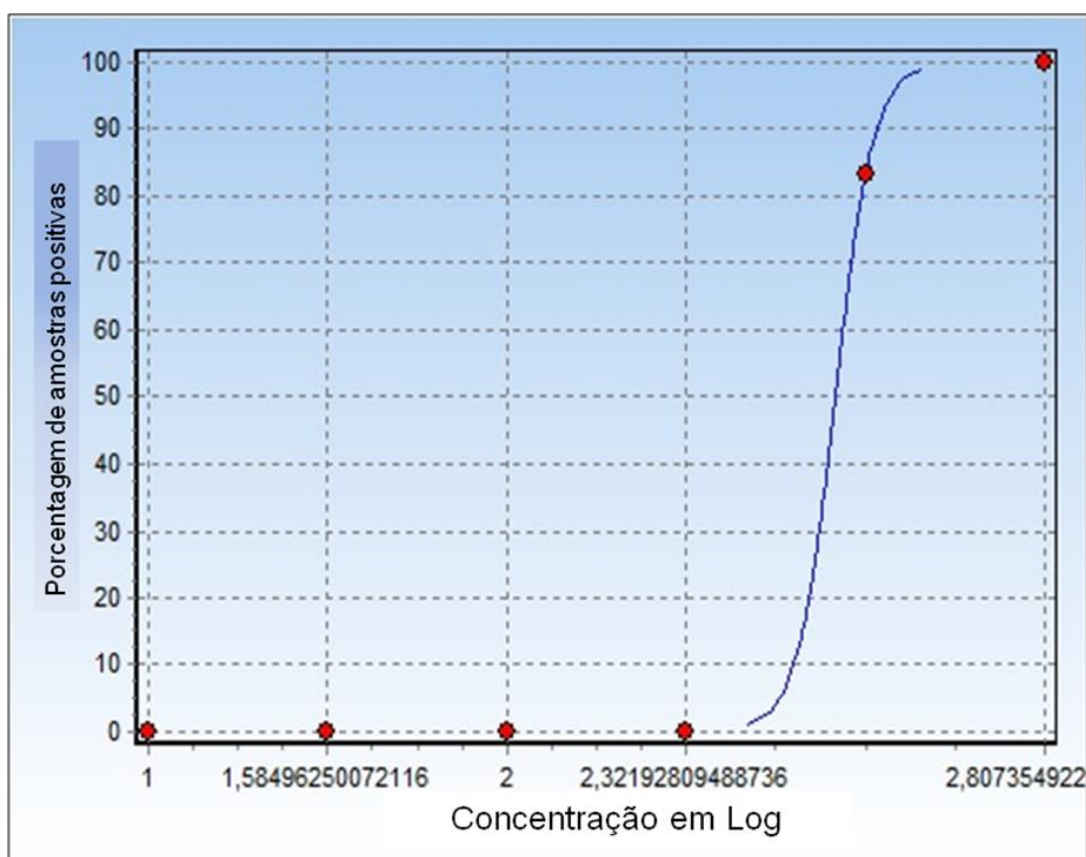


Figura 3.2: Limite de detecção do número de cópias de *BCR-ABL1* pela metodologia de RT-qPCR. Representação da distribuição de Poisson, na qual 95% das amostras positivas para o mínimo de concentração da amostra em logaritmo.

Especificidade Analítica

O DNA das linhagens celulares não foi detectado para nenhum dos dois genes, em nenhum ensaio. Enquanto que o cDNA das linhagens celulares positivas para o gene *BCR-ABL1* apresentaram número de cópias para ambos os genes. Finalmente o cDNA da linhagem celular *BCR-ABL1* negativo apresentou cópias somente para o gene de referência (Tabela 3.6). Para o ensaio de ddPCR o resultado foi similar ao observado pelo RT-qPCR.

Tabela 3.6: Ensaio de especificidade analítica pela metodologia de RT-qPCR e ddPCR, para a detecção dos genes *ABL1* e *BCR-ABL1*.

	RT-PCR		ddPCR	
	<i>ABL1</i>	<i>BCR-ABL1</i>	<i>ABL1</i>	<i>BCR-ABL1</i>
K562 DNA	IND*	IND*	IND*	IND*
KBM5 DNA	IND*	IND*	IND*	IND*
K562	16.813,01	5.068,97	24.872,17	8.463,56
KBM5	586.447,25	360.210,41	740.801,03	622.004,98
Nalm6	46.146,10	IND*	66.829,32	IND*
NTC	IND*	IND*	IND*	IND*

*IND = indeterminado

Especificidade do Diagnóstico

Foi observado que para o gene *ABL1* na amostra positiva o Cq entre as replicatas dentro do mesmo dia foi, em média, de 24,86 (variando de 24,67 a 25,17), enquanto que o DP entre todos os Cq foi de 0,16 e o número médio de cópias foi de 26.518 em todo o ensaio. Ainda na amostra positiva, para o gene de fusão *BCR-ABL1* foi observado que a média dos Cq foi de 25,99 (variando de 25,81 a 26,29), o DP foi de 0,15 e o número médio de cópias foi de 9.163,97.

Para a amostra negativa foi observado que o gene de referência o Cq variou de 23,41 a 23,68 (em média 23,52) e o DP foi 0,16 para todas as amostras. O número médio de cópias para o gene *ABL1* foi de 37.553. O gene *BCR-ABL1* apresentou duas amostras positivas com Cq >38 (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Representação tabular dos valores de Cq e número de transcritos, tanto do gene de referência (*ABL1*) quanto do gene alvo (*BCR-ABL1*) das amostras positiva e negativa analisadas em quadruplicata em cinco dias consecutivos.

Tabela continua na próxima página

Amostra	Dia do experimento	ABL1					BCR-ABL1				
		Cq da amostra	Média do Cq	Desvio do Cq	Número de transcritos	Média dos transcritos	Cq da amostra	Média do Cq	Desvio do Cq	Número de transcritos	Média dos transcritos
POSITIVA	Dia 1	24,99	24,88	0,15	23.056,13	26.692,31	25,94	26,00	0,12	9.155,14	8.935,22
		24,74			30.762,72		26,02			8.913,75	
		24,75			29.983,42		26,15			8.483,79	
		25,03			22.966,97		25,88			9.188,19	
	Dia 2	24,83	24,84	0,21	24.146,48	27.279,84	26,29	25,97	0,22	8.459,65	9.389,91
		25,14			22.239,38		25,97			9.103,09	
		24,74			30.660,66		25,81			10.136,96	
		24,67			32.072,83		25,83			9.859,94	
	Dia 3	24,80	24,79	0,04	24.585,24	25.952,85	25,86	25,88	0,01	9.827,50	9.448,60
		24,81			24.225,07		25,88			9.235,81	
		24,83			24.088,24		25,87			9.704,23	
		24,74			30.912,83		25,89			9.026,88	
	Dia 4	24,83	24,78	0,12	24.088,23	27.900,12	25,94	25,99	0,11	9.138,47	9.121,21
		24,92			23.345,59		26,12			8.778,58	
		24,67			32.117,92		25,88			9.587,10	
		24,70			32.048,74		26,02			8.980,69	
	Dia 5	25,04	25,00	0,19	22.961,45	24.765,54	26,15	26,09	0,20	8.333,86	8.934,92
		25,08			22.769,01		25,81			10.146,56	
		24,72			31.449,93		26,29			8.459,65	
		25,17			21.881,78		26,11			8.799,61	

continua

continuação

Amostra	Dia do experimento	ABL1				BCR-ABL1					
		Cq da amostra	Média do Cq	Desvio do Cq	Número de transcritos	Média dos transcritos	Cq da amostra	Média do Cq	Desvio do Cq	Número de transcritos	Média dos transcritos
NEGATIVA	Dia 1	23,48	23,45	0,03	38.071,563	39.087,27	38,22	38,22	-	1,83	1,83
		23,41			40.037,126		indeterminado			-	
		23,43			39.544,875		indeterminado			-	
		23,46			38.695,527		indeterminado			-	
	Dia 2	23,50	23,48	0,03	37.823,082	38.343,84	indeterminado	-	-	-	-
		23,43			39.639,672		indeterminado			-	
		23,48			38.177,535		indeterminado			-	
		23,50			37.735,059		indeterminado			-	
	Dia 3	23,51	23,49	0,08	37.411,805	38.057,28	indeterminado	38,90	-	-	1,06
		23,41			40.026,336		indeterminado			-	
		23,45			39.367,672		indeterminado			-	
		23,59			35.423,313		38,90			1,06-	
	Dia 4	23,55	23,57	0,02	35.822,016	35.916,13	indeterminado	-	-	-	-
		23,56			36.274,316		indeterminado			-	
		23,56			36.134,406		indeterminado			-	
		23,59			35.433,797		indeterminado			-	
	Dia 5	23,59	23,63	0,05	35.467,867	36.364,27	indeterminado	-	-	-	-
		23,59			35.323,765		indeterminado			-	
		23,67			41.219,652		indeterminado			-	
		23,68			33.445,797		indeterminado			-	

Entre as 20 replicatas analisadas em dias consecutivos para os genes de referência e alvo em amostras sabidamente positivas e negativas, três amostras apresentaram resultado negativo em amostras sabidamente positiva, logo a especificidade do ensaio foi de 85%, enquanto que a sensibilidade foi de 100% (Tabela 3.8). Não foi observada amplificação no controle negativo em nenhuma das placas.

Tabela 3.8: Ensaio de especificidade e sensibilidade ao diagnóstico de pacientes com leucemia mieloide crônica pela metodologia de RT-qPCR.

	LMC		TOTAL
	presente	ausente	
RT- positivo	20	2	22
qPCR negativo	0	17	17
TOTAL	20	20	80

Sensibilidade	1,00
Especificidade	0,89
Valor preditivo positivo	0,91
valor preditivo negativo	1,00

Variabilidade Intraensaio

Para o gene *ABL1* o desvio padrão do C_q entre as seis replicatas analisadas no mesmo ensaio para cada uma das diluições do plasmídeo (10^6 a 10^1) variou de 0,04 a 0,27; todas menores do que o recomendado de 0,5. Enquanto que para o *BCR-ABL1* esse valor oscilou entre 0,07 e 0,16 entre as seis replicatas (Figura 3.3). Nenhuma amostra foi excluída da análise e não foi observada amplificação no controle negativo, nem no branco.

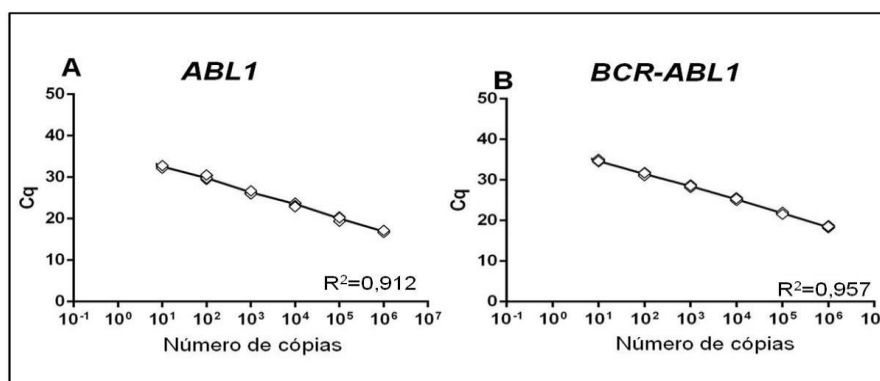


Figura 3.3: Regressão linear do ensaio de variabilidade intraensaio para detecção do gene *ABL1* e *BCR-ABL1* por RT-qPCR. Foram analisados seis replicatas para cada diluição. A) *ABL1* e B) *BCR-ABL1*.

Variabilidade Interensaio

Foram analisadas seis replicatas das diluições do plasmídeo, com número de cópias conhecido variando de 10^6 a 10 em três dias consecutivos para os genes de referência e gene alvo. Para o gene *ABL1* foi uma variação de Cq de 0,02 a 0,12 e para o *BCR-ABL1* foi de 0,01 a 0,11. Nenhuma amostra foi excluída da análise e não foi observada amplificação no controle negativo, nem no branco (Tabela 3.9).

Tabela 3.9: Desvio padrão de cada amostra no ensaio de variabilidade interensaio pela metodologia de RT-qPCR.

	<i>ABL1</i>						<i>BCR-ABL1</i>					
	Experimento 1						Experimento 1					
	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6
1E+06	0,18	0,31	0,17	0,33	0,22	0,17	0,38	0,42	0,17	0,15	0,08	0,25
1E+05	0,13	0,15	0,25	0,36	0,25	0,13	0,22	0,26	0,09	0,32	0,25	0,20
1E+04	0,20	0,18	0,16	0,49	0,38	0,10	0,25	0,29	0,224	0,40	0,33	0,27
1E+03	0,22	0,28	0,22	0,50	0,39	0,26	0,35	0,39	0,23	0,19	0,12	0,29
1E+02	0,25	0,33	0,15	0,52	0,41	0,21	0,40	0,44	0,25	0,47	0,40	0,32
1E+01	0,29	0,31	0,36	0,39	0,28	0,24	0,38	0,42	0,12	0,43	0,36	0,36
	Experimento 2						Experimento 2					
	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6
	1E+06	0,24	0,28	0,22	0,20	0,31	0,15	0,4	0,34	0,04	0,07	0,25
1E+05	0,2	0,36	0,17	0,28	0,23	0,11	0,32	0,18	0,21	0,24	0,28	0,16
1E+04	0,17	0,27	0,24	0,19	0,36	0,08	0,454	0,21	0,29	0,32	0,41	0,13
1E+03	0,33	0,33	0,26	0,25	0,37	0,24	0,46	0,31	0,08	0,11	0,42	0,29
1E+02	0,28	0,26	0,29	0,18	0,39	0,19	0,48	0,36	0,36	0,39	0,44	0,24
1E+01	0,31	0,47	0,33	0,39	0,26	0,22	0,35	0,34	0,32	0,35	0,31	0,27
	Experimento 3						Experimento 3					
	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6	replicata 1	replicata 2	replicata 3	replicata 4	replicata 5	replicata 6
	1E+06	0,14	0,308	0,29	0,18	0,31	0,28	0,25	0,02	0,15	0,28	0,23
1E+05	0,31	0,228	0,13	0,15	0,28	0,24	0,09	0,19	0,23	0,12	0,20	0,40
1E+04	0,39	0,362	0,16	0,22	0,35	0,21	0,12	0,27	0,14	0,15	0,27	0,31
1E+03	0,18	0,368	0,26	0,24	0,37	0,37	0,22	0,06	0,20	0,25	0,29	0,37
1E+02	0,46	0,388	0,31	0,27	0,40	0,32	0,274	0,34	0,13	0,304	0,32	0,30
1E+01	0,42	0,258	0,29	0,31	0,44	0,35	0,25	0,3	0,34	0,28	0,36	0,51

3.3.2) Resposta molecular da subcoorte de Adultos

A mediana de idade ao diagnóstico foi 52,2 anos (intervalo de 21,1 a 79,2 anos) e razão entre homens e mulheres foi 1,3:1. A maioria dos pacientes foi diagnosticada ainda na fase crônica (82,1%) e com baixo risco de Sokal (58,0%). A mediana da leucometria foi $147,2 \times 10^9/L$ ao diagnóstico, enquanto que a contagem de plaquetas e hemoglobina foi: $402,4 \times 10^9/L$ e $116,7 \times 10^9/L$, respectivamente. Todos os pacientes utilizaram imatinibe como primeira linha de tratamento e 63,1% (159/252) mantiveram o inibidor, enquanto que o 36,9% (93/252) descontinuaram a terapia, sendo submetidos à segunda linha de tratamento, entre esses: 84 pacientes trocaram para os 2º ITK: dasatinibe (n=48) ou nilotinibe (n=36); três foram submetidos ao TCTH e 6 trocaram para IFN- α . 20 pacientes ainda falharam a terapia com os 2ITK, indo para terceira linha de tratamento: 22,6% (19/84) foram 3ITK após falha ao 2ITK e um paciente que perdeu a resposta ao imatinibe e não respondeu ao tratamento após 9 meses dasatinibe foi submetido ao TCTH (Tabela 3.10).

Entre os 36,9% dos pacientes que descontinuaram o imatinibe: 36,6% (34/93) falharam ao tratamento dentro do primeiro ano; 51,6% (48/93) perderam a RMM adquirida e 11,8% (11/93) apresentaram intolerância ao medicamento.

Tabela 3.10: Característica clínica da subcoorte de pacientes adultos com leucemia mieloide crônica.

Característica	N
Número de pacientes	252
Mediana de idade ao diagnóstico, anos (intervalo)	52,2 (21,1 - 79,2)
Gênero	
feminino	110 (43,6%)
masculino	142 (56,4%)
Fase ao diagnóstico	
fase crônica	207 (82,1%)
fase avançada	29 (11,4%)
crise blástica	16 (6,5%)
Risco de Sokal*	
baixo	94 (58,0%)
intermediário	49 (30,3%)
alto	19 (11,7%)
Leucometria (x10⁹/L), mediana (intervalo)	147,2 (5,8 – 640,0)
Contagem de plaqueta (x10⁹/L), mediana (intervalo)	402,4 (100,4 - 1890,1)
Hemoglobina (x10⁹/L), mediana (intervalo)	116,7 (30,3 - 181,9)
Mediana tempo: diagnóstico - início da terapia, meses (intervalo)	1,7 (0,2 - 7,5)
Permaneceu com imatinibe?	
Sim	159 (63,1%)
Não	93 (36,9%)
2º ITK	84
3º ITK **	19
TCTH (2ª linha)	1
TCTH (3ª linha)	3
IFN-alfa	6
Tempo de acompanhamento, em anos (intervalo)	5,1 (2,1 – 9,3)

* sem o dado de 90 pacientes

** depende do 2º ITK

Legenda: ITK = inibidor tirosina quinase; TCTH = transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Os níveis de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} foram avaliados em todos, aos 3, 6 e 12 meses após o início da terapia com imatinibe. Aos 3 meses uma variação de logarítmica (de 1 a quase 100), com mediana de 9,95% , foi observada (Figura 3.6). A maior parte dos pacientes, 61,2% (154/252) atingiram o marco de ≤10% *BCR-ABL*^{1^{EI}} aos 3 meses após início da terapia, considerado um bom respondedor. Aos 6 e 12 meses após o início da terapia a mediana de *BCR-ABL*^{1^{EI}} foi de 0,96% e 0,1%, respectivamente (Figura 3.4). A RMM foi alcançada por 69,0% (174/252) dos pacientes aos 12 meses, aos 18 meses o número subiu para 179 (71%) pacientes. A porcentagem dos transcritos referente ao último acompanhamento mostrou que 191 (75,8%) dos pacientes mantiveram a RMM ou respostas mais profundas: 34,1% (60/191) com RM^{4,0}; e 19,9% (38/191) com RM^{4,5}.

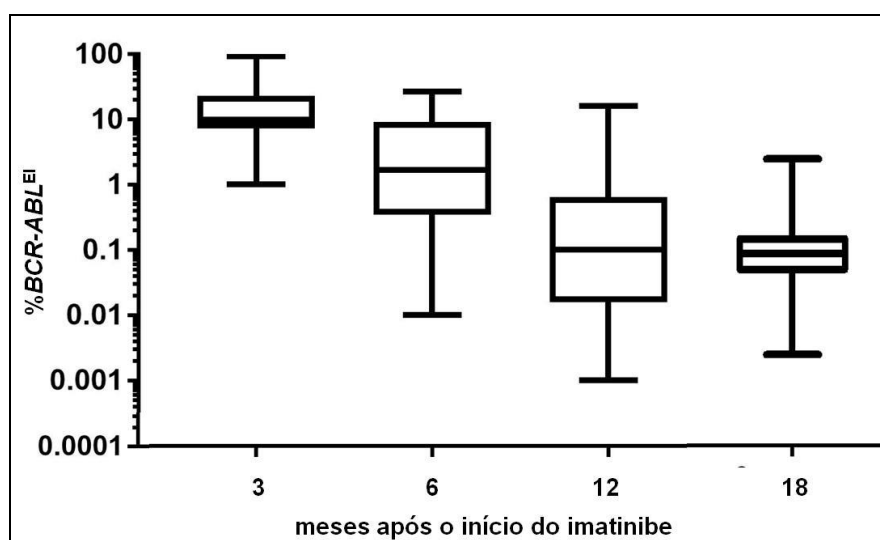


Figura 3.4: Níveis de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} após 3, 6 e 12 meses do início da terapia com imatinibe. Box plot representando a mediana dos transcritos de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} ao longo do tratamento e o desvio padrão entre a média das amostras.

As amostras foram separadas de acordo com os níveis de transcrito aos 3 meses após o início da terapia com imatinibe. 61,2% (154/252) estavam no grupo de melhor prognóstico, ou seja, com valores $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* e 38,8% (98/252) possuíam $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*. Aos seis meses, a mediana dos transcritos foi 0,109 *BCR-ABL1^{EI}* no grupo com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* e 5,189 no grupo com $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* ($p < 0,05$), enquanto que aos 12 e 18 meses os níveis de transcritos foram respectivamente: 0,080 vs 0,178 e 0,074 vs 0,165 nos grupos $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* e $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*.

O valor da resposta molecular precoce aos 3 meses após início do inibidor é um parâmetro estabelecido em adultos com LMC e foi avaliado em nossa subcoorte de pacientes. Para isso as amostras foram classificadas de acordo com os valores aos 3 primeiros meses após o início com imatinibe ($\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* vs $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*) e foi observado que no grupo com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* a probabilidade de alcance de RMM aos 12 e 18 meses após o início da terapia foi significativa maior quando comparado ao grupo de $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*. Ainda, SLE e SLP foram significativamente menores no grupo com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*. A SG também não foi significativa, apesar de mais do que um terço dos pacientes estarem no grupo de pior prognóstico (Tabela 3.11).

Tabela 3.11: Valor prognóstico da resposta molecular aos 3 meses após início da terapia em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com imatinibe.

	N	%	Valores aos 3 meses após início da terapia com imatinibe		P
			$\leq 10\%$ <i>BCR-ABL1^{EI}</i>	$>10\%$ <i>BCR-ABL1^{EI}</i>	
			N=154	N = 98	
Pacientes que atingiram a RMM aos 12 meses	174	69,0%	127	47	<0,05
Pacientes que atingiram a RMM aos 18 meses	179	71,0%	132	47	<0,05
Sobrevida Livre de Evento	154	61,1%	116	38	<0,05
Sobrevida Livre de Progressão	209	82,9%	142	67	<0,05
Sobrevida Global	219	86,9%	147	72	>0,05

Entre os 93 pacientes que trocaram de inibidor, 74 tinham informações clínicas e dados completos de resposta molecular. A análise desses pacientes para o estudo de redução da carga leucêmica em pacientes com LMC em uso de 2ITK foi descrito no estudo a seguir.

3.3.3) Resposta dos pacientes que trocaram de ITK

Entre os pacientes que trocaram para 2ITK, a idade média ao diagnóstico foi de 50,2 anos, homens mais representados em comparação a mulheres, na razão 2,4:1. A maioria dos pacientes trocou para o dasatinibe (n=52), o nilotinibe foi a segunda linha de tratamento em 22 pacientes. O mérito da escolha dos ITKs não será discutido neste trabalho. Nesse grupo, 75,6% (56/74) dos pacientes foram diagnosticados em FC e 84,6% (44/52) possuíam baixo risco de Sokal, o valor do Sokal não pode ser encontrado para 22 pacientes (dado não disponível no prontuário). A mediana de tratamento com imatinibe foi de 23,8 meses (intervalo de 8,6 a 94,9) antes da troca do imatinibe (Tabela 3.12).

Tabela 3.12: Característica clínica dos pacientes com leucemia mieloide crônica que falharam a terapia com imatinibe e foram para tratados com inibidores de segunda linha.

Característica	N
Número de pacientes	74
Mediana da idade ao diagnóstico, em anos (intervalo)	50,2 (19,1 - 83,5)
Gênero	
feminino	22 (29,7%)
masculino	52 (70,3%)
Fase ao diagnóstico	
fase crônica	56 (75,6%)
fase avançada	12 (16,2%)
crise Blástica	6 (8,2%)
Risco de Sokal*	
baixo	44 (84,6%)
intermediário	4 (7,7%)
alto	4 (7,7%)
Mediana de uso de imatinibe, em meses (intervalo)	23,8 (8,6 - 94,9)
2ITK utilizado	
dasatinibe	52
nilotinibe	22
Tempo de acompanhamento, em anos (intervalo)	3,4 (1,3 - 9,7)

*22 pacientes sem dados

O decaimento dos níveis %*BCR-ABL*1^{EI} no intervalo desde o início do tratamento com o 2ITK (valor basal) até os 3 primeiros meses de terapia foi avaliado para cada paciente, com o objetivo de detectar o período para decaimento pela metade nos níveis dos transcritos ao diagnóstico. Dessa forma o valor, em dias, da redução da carga leucêmica pela metade (*halving time*) pode ser calculado para cada paciente.

Através da análise quantitativa da curva ROC foi avaliado o tempo em que cada paciente reduziu a carga leucêmica pela metade considerando os eventos: SG, SLP e SLE. O tempo observado para cada uma das sobrevidas foi: SG, 35,3 dias (AUC, 0,685; IC 95%, 0,566 - 0,789); SLP, 35,5 dias (AUC, 0,709; IC 95%, 0,591 - 0,808); e SLE, 36,8 dias (AUC, 0,844; IC 95%, 0,742 - 0,918) (Figura 3.5).

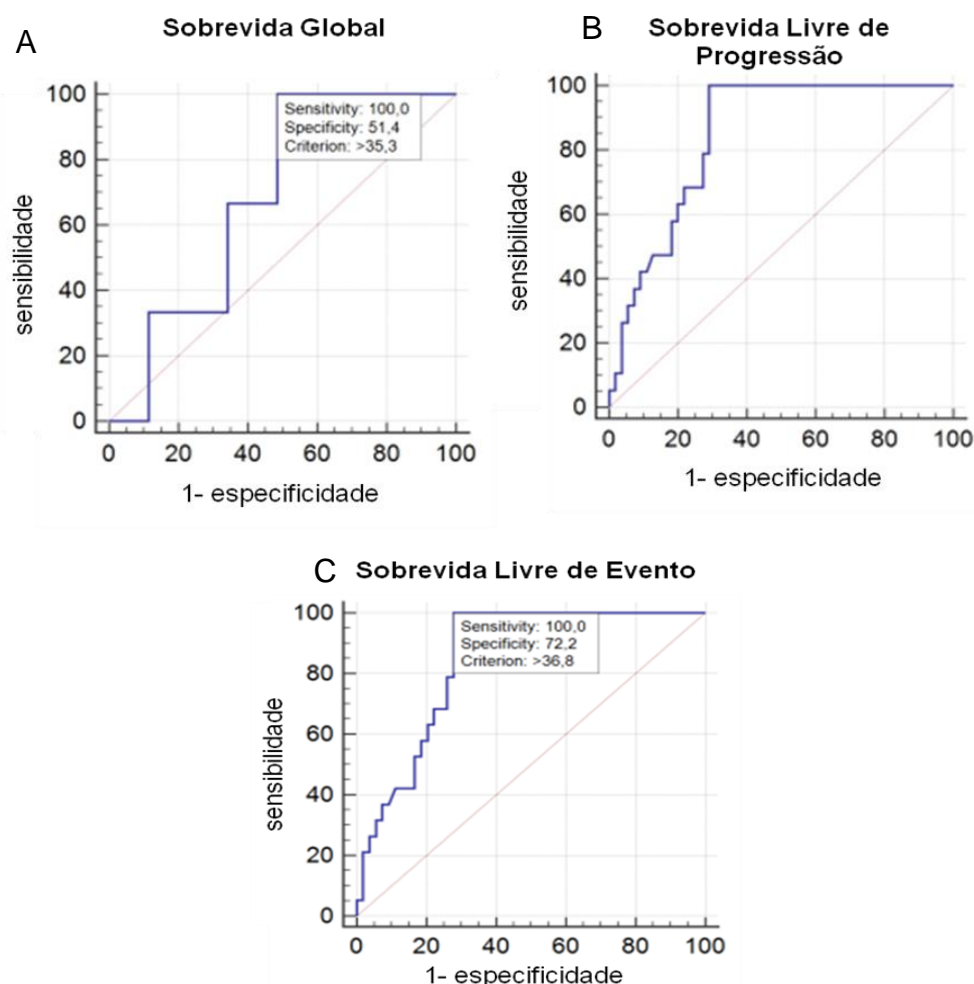


Figura 3.5: Curva ROC com o índice de Younden. Identificação do valor quantitativo referente a redução, pela metade, da carga leucêmica, que possuía maior sensibilidade e especificidade utilizando como parâmetros: (a) sobrevida global, (b) sobrevida livre de progressão; (c) sobrevida livre de evento.

Para cálculo do tempo de redução da carga leucêmica pela metade foi selecionado como evento, aquele capaz de prever a SLP, visto que evitar o avanço da doença da doença é uma das principais metas, por isso, 35 dias foi o tempo selecionado neste estudo como o tempo para a redução da carga leucêmica pela metade, associado a um melhor prognóstico clínico. Vale notar que o tempo para redução da carga leucêmica pela metade foi bem similar entre as SLP e SG.

Após a definição do tempo, em dias, da redução da carga leucêmica, os pacientes foram então classificados em dois grupos (≤ 35 dias e >35 dias) dependendo do tempo que cada um levou para reduzir a carga leucêmica logo após o início com o 2ITK. Foi então observado que o período prévio de exposição ao imatinibe não foi significativamente diferente nos dois grupos ($p=0,81$). Assim como os valores de %*BCR-ABL*^{EI} antes da troca ($p=0,44$) (Tabela 3.13).

Tabela 3.13: Correlação entre a exposição prévia ao imatinibe e % de *BCR-ABL*^{EI} antes da troca para inibidores de segunda geração e o tempo de redução da carga leucêmica, em dias, em pacientes com leucemia mieloide crônica.

	tempo de imatinibe (em meses)	% <i>BCR-ABL</i> ^{EI} antes da troca
≤ 35 dias (n=34)	20,3	7,3
> 35 dias (n=40)	26,9	9,7
<i>p</i>	0,81	0,44

O nível de %*BCR-ABL1^{EI}* também foi avaliado após a troca para 2ITK e foi observado que, independente do tempo em que os pacientes levaram para reduzir a carga leucêmica pela metade, o %*BCR-ABL1^{EI}* não foi significativamente diferente ($p=0,36$). Já quando considerado o tempo de 3 meses após o início do tratamento com 2ITK, foi mostrado que os pacientes que levaram mais tempo para reduzir a carga leucêmica pela metade (>35 dias), possuíam níveis de transcritos mais altos quando comparados ao grupo que reduzia a carga leucêmica pela metade em ≤ 35 dias ($p<0,05$) (Figura 3.6).

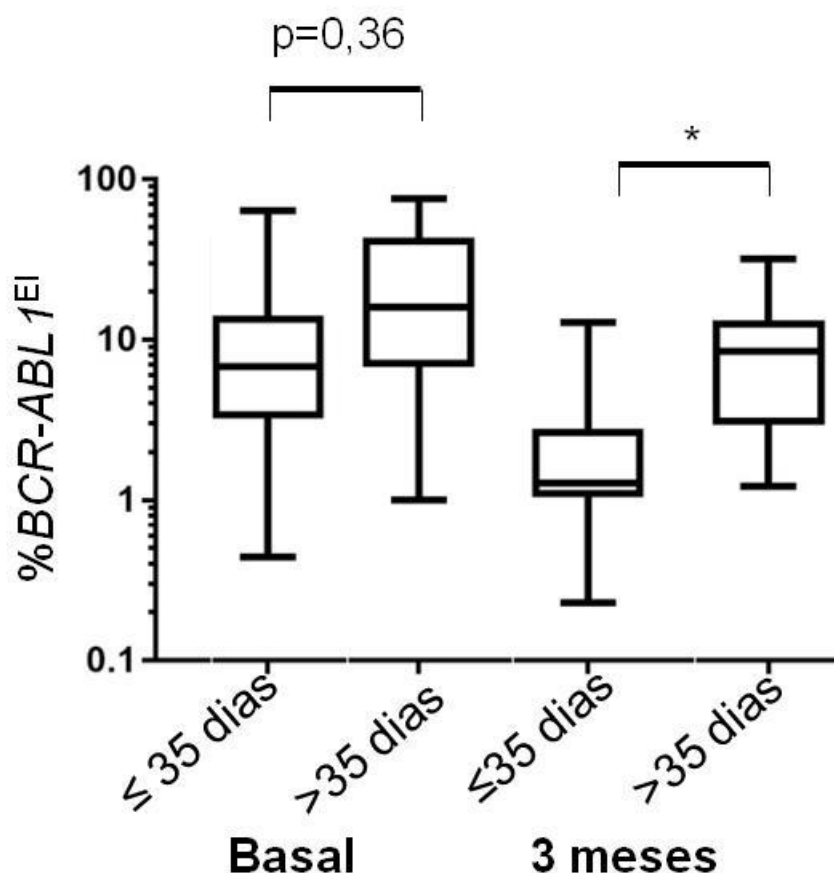


Figura 3.6: Níveis de %*BCR-ABL1^{EI}* após a troca para o 2ITK (basal) e 3 meses após o início do tratamento com 2ITK. No gráfico estão representadas em uma escala log, a mediana e o desvio padrão dos níveis dos transcritos %*BCR-ABL1^{EI}* em pacientes com leucemia mieloide crônica classificados de acordo com o tempo de redução da carga leucêmica pela metade (≤ 35 ou >35 dias) logo após o início do tratamento com inibidores de segunda linha. * foi utilizado para $p<0,05$.

O nível %*BCR-ABL* 1^{EI} também foi avaliado aos 6 e 12 meses após o início da terapia com o 2ITK, nesse período do tratamento foi observado que os pacientes que levavam mais tempo para reduzir a carga leucêmica pela metade (>35 dias), possuíam níveis de transcritos mais altos quando comparados ao grupo que reduzia a carga leucêmica pela metade em ≤35 dias (p=0,03 e 0,02, respectivamente) (Tabela 3.14).

Tabela 3.14: Correlação entre os níveis de transcritos após início da terapia com inibidores de segunda geração e o tempo de redução da carga leucêmica, em dias, nos pacientes com leucemia mieloide crônica.

	% <i>BCR-ABL</i> aos 6 meses	% <i>BCR-ABL</i> aos 12 meses
≤ 35 dias (n=34)	0,29	0,09
> 35 dias (n=40)	3,15	1,99
<i>p</i>	0,03	0,02

Outros parâmetros como: índice de Sokal e idade ao diagnóstico foram avaliados e não foi observada diferença significativa quando analisados em função do tempo em que a carga leucêmica foi reduzida pela metade (≤35 dias e >35 dias), p = 0,47 e p = 0,99, respectivamente.

A sobrevida dos pacientes foi comparada para os grupos que tiveram uma redução pela metade da carga leucêmica com o tempo ≤ 35 dias ou > 35 dias, ao longo da mediana de 3,4 anos de acompanhamento. Foi observado que a SLE, SLP e SG foram maiores no grupo de pacientes que levaram menos tempo para reduzir pela metade os transcritos %*BCR-ABL*^{1^{EI}} ($p=0,032$, $p= 0,023$ e $p=0,021$) (Figura 3.7).

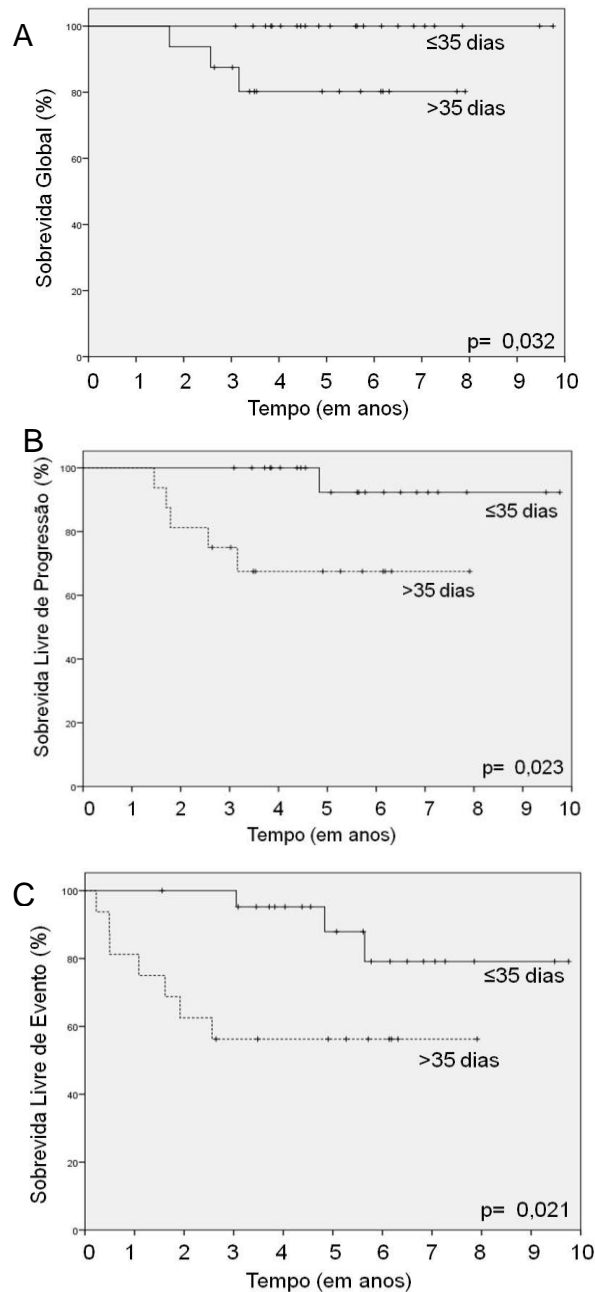


Figura 3.7: Curvas de sobrevida dos pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores de segunda geração. Comparação das curva de sobrevida entre os grupos de acordo com redução da carga leucêmica pela metade em ≤ 35 dias e > 35 dias. A) SG, B) SLP, C) SLE.

3.3.4) Resposta dos pacientes com LMC pediátricos

A tabela 3.15 resume as características gerais ao diagnóstico dos 21 pacientes pediátricos. A maior parte, 85,7% dos pacientes, estavam em FC, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 12 anos (intervalo, 2,5 a 17,4 anos), relação homem:mulher de 1,1: 1. Com relação às características clínicas e parâmetros laboratoriais, foi observado baço palpável em quatro pacientes. A mediana na contagem dos leucócitos e as contagens de plaquetas foram, respectivamente, $288,1 \times 10^9/L$ e $537,2 \times 10^9/L$. Ainda, a maioria dos pacientes foi classificada como baixo risco de acordo com os índices prognósticos: Sokal (90,5%); Hasford e Eutos (95,2%).

Não foi identificada nenhuma alteração citogenética adicional (ACA) ao diagnóstico e molecularmente, o transcrito mais frequente foi o e13a2 em 52,4% (11/21 casos), seguido do e14a2 em 38,1% (8/21). Dois pacientes apresentaram os dois transcritos e13a2/e14a2 (9,5%).

A hidroxiuréia foi utilizada no pré-tratamento de todos os pacientes. Seis pacientes utilizaram o IFN- α como primeira linha de tratamento, antes do imatinibe, com a mediana entre o diagnóstico e início do IFN- α de 1,5 meses (com intervalo de 0,9 a 6,7) e 15 pacientes iniciaram a terapia com imatinibe, a mediana do tempo entre o diagnóstico e início do tratamento foi de 1,4 meses (com intervalo de 0,2 a 8,6 meses).

Tabela 3.15: Características clínicas dos pacientes pediátricos com leucemia mieloide crônica.

Característica	N (%)
Número de pacientes	21
Mediana de idade ao diagnóstico, em anos (intervalo)	12 (2,5-17,4)
Gênero	
feminino	10 (47,6%)
masculino	11 (52,4%)
Fase ao diagnóstico	
fase crônica	18 (85,7%)
fase avançada	2 (9,5%)
crise blástica	1 (4,8%)
Leucometria (x10⁹/L)	288,1
mediana (intervalo)	(98,0 - 758,9)
Plaqueta (x10⁹/L)	537,2
mediana (intervalo)	(194,1 – 890,3)
Risco de Sokal	
baixo	19 (90,5%)
intermediário	2 (9,5%)
alto	0
Risco de Hasford	
baixo	20 (95,2%)
intermediário	1 (4,8%)
Eutos	
baixo	20 (95,2%)
intermediário	1 (4,8%)
alto	0
Tratamento	
interferon-alpha	6 (28,6%)
imatinibe	15 (71,4%%)
Mediana tempo: diagnóstico - início da terapia, meses (intervalo)	
interferon-alpha	1,5 (0,9 - 6,7)
imatinibe	1,4 (0,2 - 8,6)
Tempo de acompanhamento, em anos (intervalo)	5,1 (2,3-7,5)

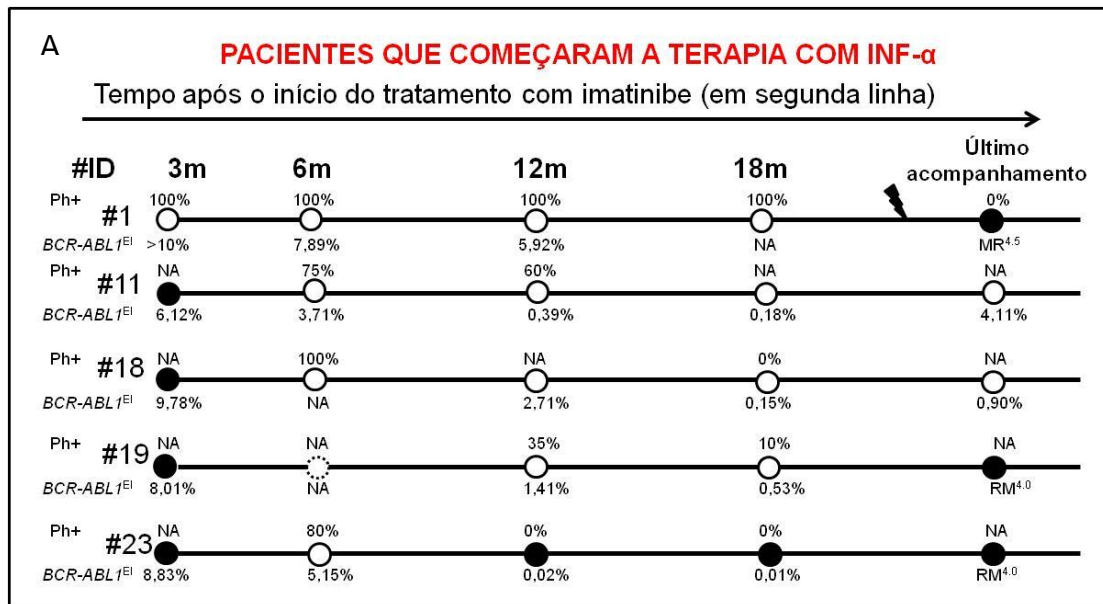
Entre os 21 pacientes analisados, seis iniciaram a terapia com IFN- α e cinco trocaram para o imatinibe como segunda linha de tratamento, enquanto que um se manteve no IFN- α (#8). Este obteve uma RCgC após 8 meses de tratamento e níveis indetectáveis de %*BCR-ABL*1^{EI} após 11 meses (RM^{4.0}) e após 2,6 anos de seguimento mantém a RM^{4.0} (Figura 3.8A). Quinze pacientes iniciaram o tratamento com imatinibe e cinco descontinuaram, sendo que: dois foram submetidos ao TCTH (#1 e #10) e quatro trocaram para o dasatinibe (#2, #4, #6 e #16). O paciente #2 falhou ao tratamento após 20 meses de imatinibe, ficou 8 meses com dasatinibe sem reduzir os níveis de *BCR-ABL*1^{EI}, e atingiu a RMM com nilotinibe após 9 meses de início de tratamento. Já o #4 foi observada uma perda da RMM após 62 meses de uso e com a troca para o dasatinibe, este paciente voltou a alcançar a RMM. O #6, assim como o anterior só atingiu a RMM durante a terapia com o dasatinibe, mas nunca havia atingido a RMM com o imatinibe. Enquanto que o paciente #16, também nunca havia alcançado a RMM com o imatinibe, falho a terapia com dasatinibe e até o último acompanhamento com nilotinibe ainda não havia alcançado a RMM (Figura 3.8B).

Em relação aos dois pacientes que foram submetidos ao TCTH, um foi diagnosticado com 8 anos, atingiu a RHC aos 3 meses de tratamento e após 12 meses de tratamento com IFN- α não atingiu uma RCgC. Foi submetido ao transplante e após um seguimento 10,8 anos apresenta níveis indetectáveis de %*BCR-ABL*1^{EI}. Já o segundo paciente, que foi submetido ao transplante após falha do imatinibe possui, até o último acompanhamento, níveis detectáveis de transcritos com uma RM^{4.5}.

Para os dados de resposta (hematológica, citogenética e molecular), o único paciente que se manteve no IFN- α foi excluído das análises, pois os parâmetros utilizados são estabelecidos para os inibidores alvo específicos.

A resposta molecular aos 12 e 18 meses também foi avaliada para todos os 20 pacientes, uma vez que esses tempos são importante marcos para classificar os pacientes adultos como respondedores ótimos (previstos nas recomendações internacionais) e crianças, respectivamente. Considerando todo o grupo, 75,0% (15/20) atingiram RMM ou RM^{4.0/ 4.5} até a data do último seguimento, com uma mediana de 5,1 anos. Aos 12 meses, 60% (12/20) dos pacientes tratados com imatinibe alcançaram RMM, este número aumentou

para 14 (70%) após 18 meses de terapia. 57% (8/14) deles também obtiveram RM4.0 (n=3) e RM4.5 (n=5). Entre os cinco pacientes que obtiveram um decaimento %*BCR-ABL1*^{EI} de 4,5log (RM^{4,5}), 3 deles apresentaram níveis indetectáveis de %*BCR-ABL1*^{EI} com cópias *ABL1* > 32.000, ainda, essa resposta foi mantida com níveis indetectáveis, durante um período de mais de 2 anos de acompanhamento.



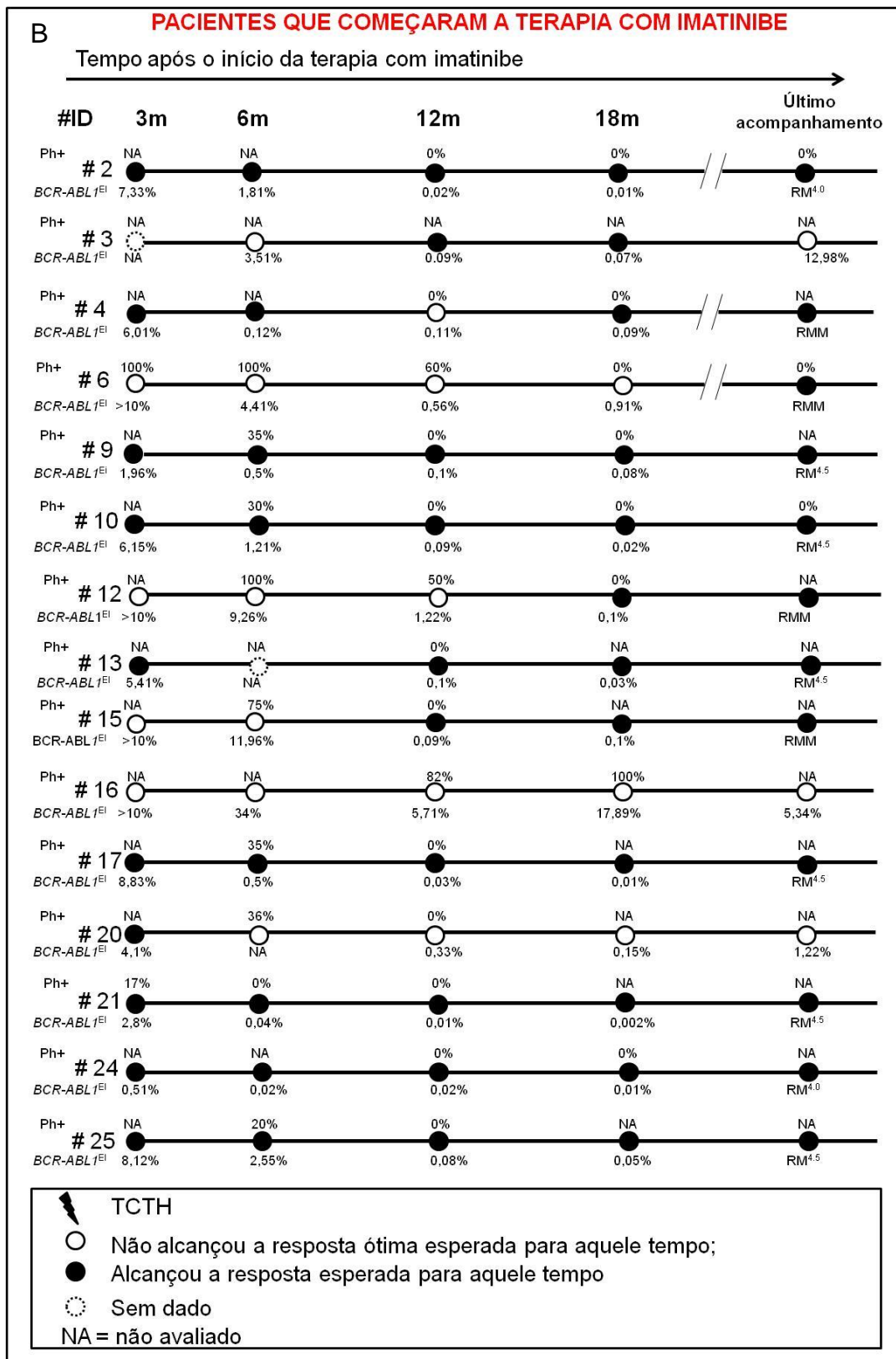


Figura 3.8 Resposta citogenética e molecular pacientes pediátricos com leucemia mieloide crônica. Cada linha representa um paciente, e cada círculo a resposta, sendo a parte superior correspondente à resposta citogenética e a inferior a resposta molecular. A) pacientes que começaram o tratamento com interferon- alfa; B) pacientes que começaram o tratamento com imatinibe.

A correlação entre o alcance da RMM aos 12 e 18 meses e parâmetros como: gênero, idade ao diagnóstico, risco de Sokal, eventos e progressão da doença foram avaliados. Foi observado que gênero, mediana da idade ao diagnóstico e risco de Sokal não foram associados a uma maior probabilidade de obtenção de RMM aos 12 e 18 meses. Enquanto que a SLE foi significativamente maior nos grupos que atingiram RMM aos 18 meses ($p=0,02$), a SLP não foi associada ao alcance da RMM, apesar de todos os pacientes que progrediram na doença estarem no grupo que não alcançou nenhuma resposta ao longo do tratamento ($p=0,08$) (Tabela 3.18).

Tabela 3.16: Correlação entre alcance de resposta molecular em pacientes com leucemia mielóide crônica e gênero e parâmetros clínicos.

	RMM aos 12 meses N (%)	P	RMM aos 18 meses N (%)	P
Gênero				
feminino	5 (45,4)	0,07	7 (63,6)	0,64
masculino	7 (70,0)		7 (70,0)	
Idade ao diagnóstico				
≤ 12 anos	7 (63,6)	1,00	8 (72,7)	1,00
> 12 anos	5 (50,0)		6 (60,0)	
Risco de Sokal				
baixo	11 (57,9)	1,00	13 (68,4)	1,00
intermediário	1 (50,0)		1 (50,0)	
Tempo entre o diagnóstico início da terapia				
< 2,2 meses	6 (54,5)	1,00	6 (54,5)	0,16
≥ 2,2 meses	6 (60,0)		8 (80,0)	
Apresentou evento?				
não	9 (69,2)	0,38	11 (84,6)	0,02
sim	3 (37,5)		3 (37,5)	
Progrediu?				
não	12 (63,2)	0,15	14 (73,7)	0,08
sim	0(0)		0 (0)	

Em negrito estão destacados os valores de $p < 0,05$.

Legenda: RMM = Resposta Molecular Maior, SLE = sobrevida livre de evento e SLP= sobrevida livre de progressão.

Com os dados moleculares disponíveis dos 20 pacientes aos 3 meses após início do imatinibe, esses foram separados em dois grupos, de acordo com os níveis de *BCR-ABL*^{EI}: ≤10% e >10%. 70% (14/20) dos pacientes foram classificados no grupo de ≤10% *BCR-ABL*^{EI} e um terço (n=6) no grupo com >10% *BCR-ABL*^{EI}. Pacientes pediátricos apresentaram tamanho do baço e risco prognóstico (Sokal, Hasford e Euros) semelhantes nos dois grupos (p=0,08 e p=0,98, respectivamente). Enquanto que a leucometria foi significativamente maior nos pacientes com >10% de *BCR-ABL*^{EI} em relação ao grupo com ≤10% *BCR-ABL*^{EI} (218,4x10⁹/L vs 567,0 x 10⁹/L; p<0,05). 85,7% dos pacientes que atingiram a RMM aos 18 meses estavam classificados no grupo com ≤10% de *BCR-ABL*^{EI}, enquanto 33,3% que atingiram essas mesmas respostas possuíam >10% de *BCR-ABL*^{EI} (p=0,04). Aos 12 meses após o início da terapia com imatinibe não foi observada diferença estatística entre os dois grupos e o alcance da RMM (71,4% ≤10% *BCR-ABL*^{EI} vs 33,3% >10% *BCR-ABL*^{EI}; p=0,12) apesar de proporcionalmente haver um maior número de pacientes que alcançaram a RMM no grupo de níveis menores de transcritos. Após um acompanhamento mediano de 61,2 meses, foi observado que nenhum pacientes do grupo ≤10% *BCR-ABL*^{EI} progrediu na doença e os dois que progrediram (33,3%) estavam no grupo de níveis de transcritos > 10% (p=0,08) (Tabela 3.17).

Tabela 3.17: Valor prognóstico da %*BCR-ABL*^{1EI} aos 3 meses após o início da terapia em pacientes com leucemia mieloide crônica.

	≤ 10% <i>BCR-ABL</i> ^{1EI}	> 10% <i>BCR-ABL</i> ^{1EI}	p
	N	N	
Tamanho do baço, em cm, mediana (intervalo)	2,0 (0-8)	7,0 (0-17)	0,08
Leucometria, mediana	218,4 x 10 ⁹ /L	567,0 10 ⁹ /L	0,02
RMM aos 12 meses	10/14 (71,4%)	2/6 (33,3%)	0,12
RMM aos 18 meses	11/14 (78,6%)	2/6 (33,3%)	0,04
% de pacientes que progrediram	0/14 (0%)	2/6 (33,3%)	0,08

Em negrito estão destacados os valores significativos; p<0,05.

Legenda: ^{EI} = Escala Internacional, RMM = Resposta Molecular Maior

Na LMC as isoformas mais frequentes são: e13a2 e e14a2 e o valor prognóstico associado a elas foi avaliado. Nesta coorte pediátrica, a isoforma mais frequente foi a e13a2 com 52,4%(11/21), seguida da isoforma e14a2 com 38,1% (8/21) e dois pacientes apresentaram ambas as isoformas (e13a2 e e14a2) com 9,5%. Não foi detectada isoforma variante nos pacientes pediátricos.

A mediana do tamanho do baço foi de 6cm para a isoforma e13a2 e 3 cm para a e14a2 (p=0,37), os pacientes com ambas as isoformas apresentaram 6 e 17 cm. A leucometria foi de 278,6 x 10⁹/L e 308,1x10⁹/L para e13a2 e e14a2, respectivamente (p=0,84). Os níveis dos transcritos aos 3 meses após o início da terapia com imatinibe não foi significativamente diferente entre as duas isoformas, apesar de ser um pouco maior no grupo e13a2, esses níveis mais altos de %*BCR-ABL1*^{EI} não representaram maior probabilidade de alcançar a RMM ou uma menor probabilidade de progressão. Já a RMM aos 12 meses foi de 72,7% na e13a2 e 50,0% na e14a2 (p=0,38) e aos 18 meses, a porcentagem dos pacientes que atingiram uma RMM subir para 81,8% no grupo e13a2 e 62,5% no grupo e14a2 (p=0,60). Entre os pacientes que progrediram, um deles possuía a isoforma e14a2 e o outro ambos os tipos de transcritos, e13a2 e e14a2 (Tabela 3.18).

Tabela 3.18: Comparação das característica clínicas e moleculares dos pacientes com leucemia mieloide crônica e o transcrito ao diagnóstico.

	e13a2	e14a2	p
	N	N	
Tamanho do baço em cm, mediana (intervalo)	6,0 (0-10)	3,0 (0-8)	0,37
Leucometria, mediana	278,6 x 10 ⁹ /L	308,1 x 10 ⁹ /L	0,84
Mediana da % <i>BCR-ABL1</i> ^{EI} aos 3 meses (intervalo)	5,3 (0,6 - 21,9)	2,6 (0,5 - 16,8)	0,43
RMM aos 12 meses	8/11 (72,7%)	4/8 (50,0%)	0,38
RMM aos 18 meses	9/11 (81,8%)	5/8 (62,5%)	0,60
% de pacientes que progrediram	0/11 (0%)	1/8 (12,5%)	0,42

Legenda: ^{EI} = Escala Internacional

Análise de mutação na subcoorte pediátrica

Dez pacientes foram avaliados para pesquisa de mutação no DQ da ABL1. Os critérios para pesquisar mutações foram: perda da RMM; não alcançar a RMM após 18 meses; ou antes da troca do imatinibe por outro inibidor.

As mutações G250E e E255V foram detectadas em 2/10 pacientes. A mutação G250E foi encontrada no paciente #6 após 20 meses de tratamento com imatinibe, sem alcance de RMM, apesar de ter alcançado a RCgC. A pesquisa de mutação foi realizada antes da troca do inibidor, e o inibidor escolhido foi o dasatinibe. Como esperado, após a troca de inibidor, uma RMM foi alcançada em 6 meses e no último seguimento uma resposta molecular do tipo RM4.5 foi observada

A mutação E255V foi detectada no paciente #16 após 115 meses de tratamento com imatinibe. A análise de mutação foi realizada porque o paciente não alcançou uma RCgC após 30 meses de tratamento. Durante o acompanhamento, os níveis de %*BCR-ABL*1^{EI} flutuaram em torno de níveis pouco maiores que 1%, tendo sido essa a melhor resposta à terapia. Esse paciente foi tratado com 2ITK sem melhora na resposta terapêutica. No último seguimento, este paciente estava na fila para o TCTH.

3.3.5) Resposta dos pacientes submetidos ao TCTH

As características dos 101 pacientes selecionados para estudo encontram-se na tabela 3.19, sendo possível observar que a mediana da idade ao diagnóstico foi de 45,3 anos (variando de 19,1 a 75,8), 61,4% eram homens, uma razão de 1,6:1 com as mulheres e 32,6% dos pacientes foram diagnosticados em fase mais avançadas da doença. Mais da metade (58,4%) dos pacientes foram transplantados entre 4 e 11 anos e 18,9% entre 7 e 11 anos, o que talvez explique os 28,7% dos pacientes que utilizaram o IFN- α como primeira linha de tratamento antes do transplante.

Tabela 3.19: Características clínicas dos pacientes com leucemia mieloide crônica que foram submetidos ao transplante de células – tronco hematopoiéticas.

Característica	N (%)
Número de pacientes	101
Idade ao diagnóstico, mediana, em anos (intervalo)	45,3 (19,1 - 75,8)
Gênero	
feminino	39 (38,6%)
masculino	62 (61,4%)
Fase ao diagnóstico	
fase crônica	68 (67,3%)
fase avançada	16 (15,8%)
crise blástica	17 (16,8%)
Tratamento em primeira linha	
interferon-alpha	29 (28,7 %)
imatinibe	72 (71,3%)
2ITK	
dasatinibe	12
nilotinibe	7
3ITK	
dasatinibe e nilotinibe	4
Tempo pós-transplante	
1 a 3 anos	23 (22,7%)
4 a 6 anos	59 (58,4%)
7 a 11 anos	19 (18,9%)
Tempo de acompanhamento, em anos (intervalo)	5,7 (1,6 - 10,8)

O resultado referente a última amostra de seguimento de cada paciente, com mediana de 5,7 anos (intervalo de 1,6 a 10,8 anos) de acompanhamento, mostrou que: 39,6% dos pacientes (40/101) possuíam níveis indetectáveis do transcrito, sendo 25% (10/40) com RM^{4,0} e 75% com RM^{4,5}. Enquanto 43,6% dos pacientes (44/101) apresentaram níveis de transcrito detectáveis com respostas moleculares equivalentes a: RMM (18,2%); RM^{4,0} (45,4%) e RM^{5,0} (36,4%); e 17 (16,8%) pacientes recaíram ao TCTH.

Entre os que recaíram ao transplante foi observado que 35,3% (6/17) fizeram uso prévio do imatinibe, enquanto que 64,7% (11/17) utilizaram IFN- α . O uso do imatinibe antes do transplante foi associado a uma menor probabilidade de recaída quando comparada com os pacientes que fizeram uso prévio do IFN- α ($p < 0,01$). Foi observado ainda que a mediana da idade ao diagnóstico foi de 58 anos, sendo 76,5% homens e 17,6% haviam sido diagnosticados em FA ou CB. A mediana de tempo entre o transplante e a recaída foi de 18 meses (8-121 meses) (Tabela 3.20).

Tabela 3.20: Características clínicas dos pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao transplante de célula-tronco hematopoiética (TCTH).

identificação do paciente	idade	gênero	fase da doença ao diagnóstico	imatinibe antes do TCTH?	tempo de recaída (em meses)
# 1	58	M	FC	Sim	57
# 15	52	M	FC	Não	99
# 32	40	M	FC	Sim	121
# 33	46	M	FC	Não	96
# 39	69	F	FC	Não	7,1
# 44	72	M	FC	Não	8,8
# 49	55	F	FC	Não	22,5
# 52	62	M	FA	Não	24
# 55	49	F	FC	Não	12,3
# 59	67	M	FA	Sim	18
# 60	59	M	FC	Não	9,3
# 66	51	M	FC	Não	18
# 72	61	M	CB	Sim	12
#75	40	M	FC	Não	8
# 81	39	F	FC	Sim	10
# 88	63	M	FC	Sim	14,5
# 91	59	M	FC	Não	23,2

Legenda: TCTH: transplante de célula-tronco hematopoiética; M = masculino, F = feminino; FC = fase crônica, FA = fase acelerada; CB = crise blástica.

A doença residual mínima desses pacientes normalmente é avaliada por Nested-PCR (qualitativo) e/ou RT-qPCR (quantitativo), visando avaliar o benefício de metodologia quantitativa teoricamente mais sensíveis, como o ddPCR, a sensibilidade e especificidade das três metodologias foram comparadas entre si.

Comparação entre as metodologias

Quando aplicadas as três metodologias disponíveis: nested PCR, RT-qPCR e ddPCR, nas 124 amostras de pacientes pós TCTH, os resultados foram concordantes para 26 amostras positivas para %*BCR-ABL1* e 79 negativas para %*BCR-ABL1*. Entretanto, o resultado de 19 amostras foi divergente (Figura 3.9). Oito amostras antes negativas para a detecção do transcrito pelo RT-qPCR e nested foram positivas pelo ddPCR.

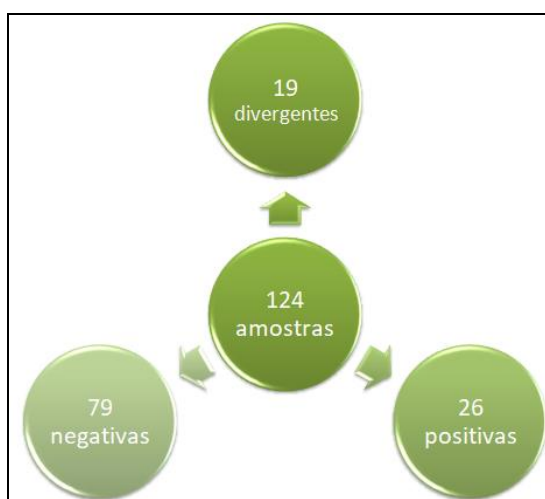


Figura 3.9: Resultado das amostras de pacientes com leucemia mieloide crônica após o transplante de células tronco hematopoiéticas por três metodologias: ddPCR (*droplet digital PCR*), RT-qPCR (PCR em tempo real por retrotranscrição) e Nested PCR.

As três metodologias foram comparadas qualitativamente (ou seja, apesar do RT-qPCR e ddPCR serem técnicas quantitativas, para este ensaio comparativo foram consideradas apenas a presença ou ausência do transcrito). A mais sensível foi o ddPCR (93,5%) e a mais específica foi RT-qPCR com 97,6% (Figura 3.10). O índice k entre as metodologias quantitativas foi de 0,75.

SENSIBILIDADE			
	RT-qPCR	ddPCR	Nested
RT-qPCR	100%	74,4%	81,3%
ddPCR	93,5%	100%	87,5%
Nested	83,9%	90,0%	100%

ESPECIFICIDADE			
	RT-qPCR	ddPCR	Nested
RT-qPCR	100%	97,6%	94,6%
ddPCR	89,2%	100%	88,0%
Nested	93,5%	96,4%	100%

Figura 3.10: Comparação do resultado de amostras de pacientes com leucemia mieloide crônica submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas por três metodologias: ddPCR (droplet digital PCR), RT-qPCR (PCR em tempo real por retrotranscrição) e Nested PCR.

A comparação entre os resultados quantitativos do RT-qPCR e ddPCR foram avaliados e a regressão linear (R^2) tanto para o *BCR-ABL1*, quanto *ABL1* e a razão em % de *BCR-ABL1/ABL1^{EI}* foi: 0,9039, 0,8947, 0,9408, respectivamente. Vale observar que para níveis mais baixos de transcritos essa correlação é menor (Figura 3.11).

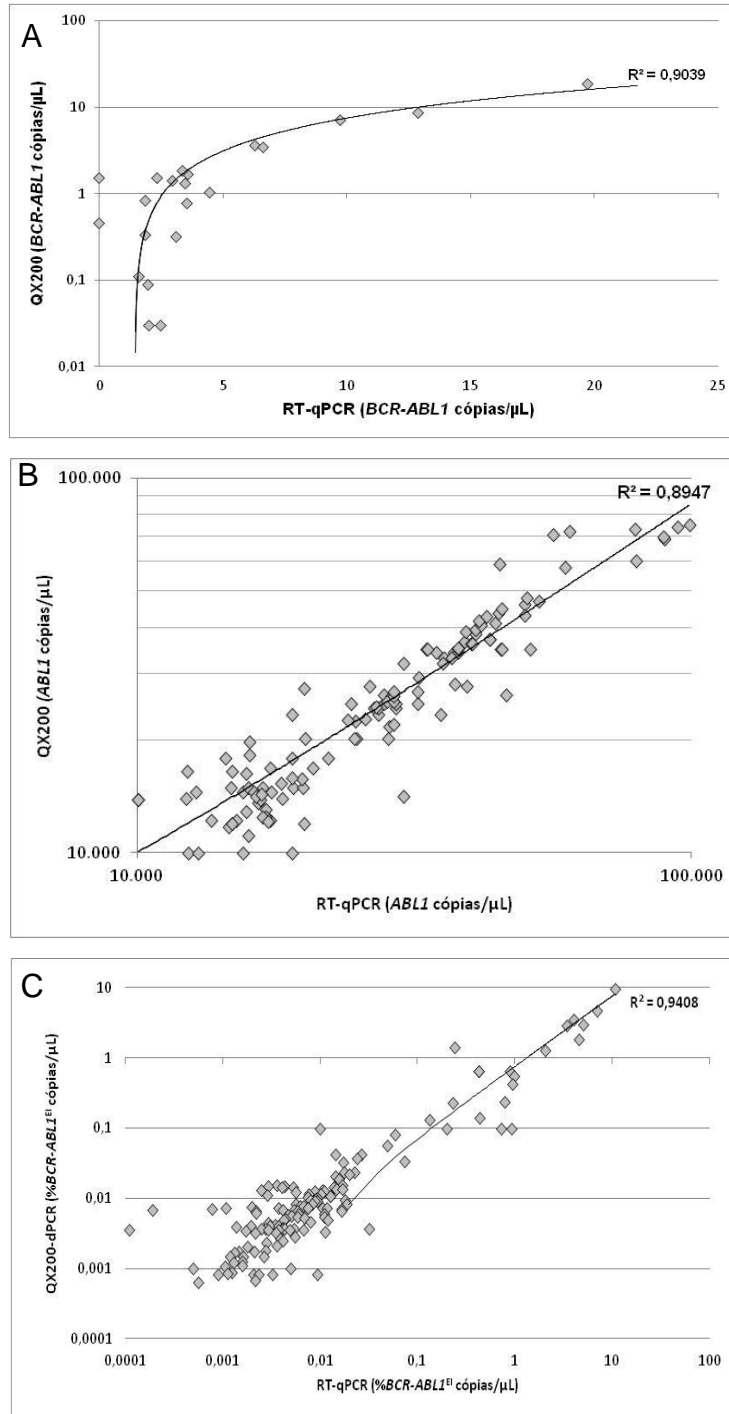


Figura 3.11: Correlação entre os ensaios quantitativos de ddPCR e RT-qPCR, na qual cada ponto representa a média das replicatas de uma amostra. A) *BCR-ABL1*; B) *ABL1* e c) *BCR-ABL1^{EI}*.

Os dados quantitativos mostram que pacientes após o transplante podem apresentar níveis detectáveis de transcritos, ainda que baixos (<0,1% de %*BCR-ABL* 1^{EI}=RMM), sem necessariamente recaírem. A fim de avaliar o impacto dos níveis dos transcritos e recaída, os pacientes com LMC submetidos ao TCTH foram classificados em três grupos de acordo com o número de amostras positivas para %*BCR-ABL* 1^{EI} após o transplante:

- I) pacientes com resultados indetectáveis para %*BCR-ABL* 1^{EI} (40 pacientes – N = 48 amostras) (Figura 3.12 - A);
- II) pacientes com 1 amostra detectável para %*BCR-ABL* 1^{EI} (38 pacientes – N= 95 amostras) (Figura 3.12 - B);
- III) pacientes com mais de 1 amostra detectável para %*BCR-ABL* 1^{EI} (23 pacientes – N = 74 amostras) (Figura 3.12 - C)

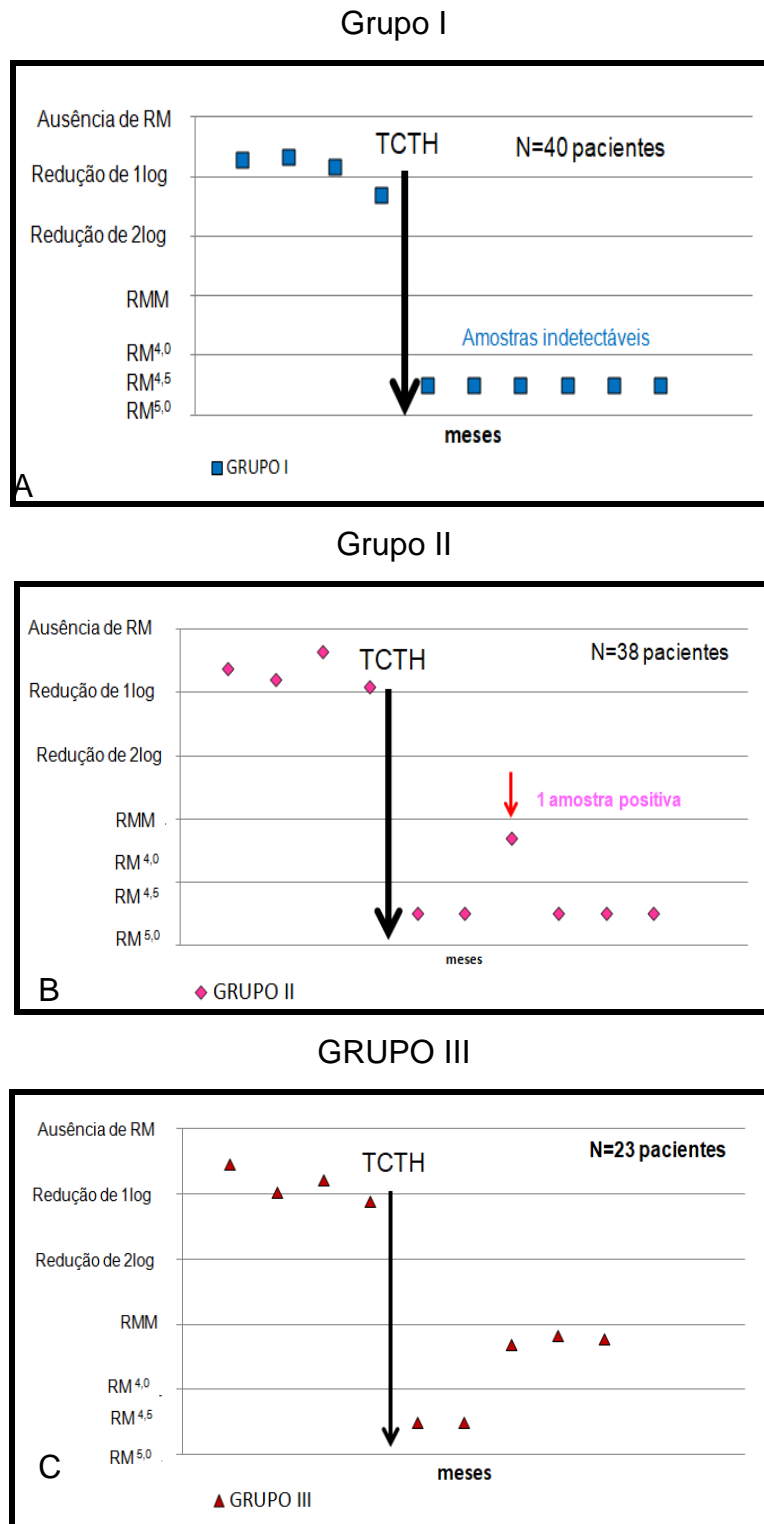


Figura 3.12: Perfil do grupos de pacientes de acordo com os níveis de transcritos detectáveis após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). A seta representa o momento do TCTH, o eixo x a resposta molecular (RM), sendo as $RM^{4.0}$ e $^{4.5}$ equivalente aos níveis indetectáveis de *BCR-ABL1* avaliados em 10.000 e 32.000 cópias, respectivamente do gene de referência *ABL1*. A) Grupo I: amostras com níveis indetectáveis de *BCR-ABL1* após o TCTH; B) Grupo II: uma amostra com nível detectável, mas baixo, de *BCR-ABL1*; C) Grupo III: mais de uma amostra com nível detectável, mas baixo, de *BCR-ABL1*.

Legenda: RMM – Resposta Molecular Maior

Analisando o perfil da carga leucêmica dos pacientes após o TCTH foi observado que: pacientes com níveis indetectáveis para %*BCR-ABL1^{EI}* não recaíram ao TCTH; pacientes com flutuações em baixos níveis de %*BCR-ABL1^{EI}* com uma amostra positiva, recaíram em 11,7% (2/17) dos casos (grupo II), enquanto que pacientes do grupo III, os que apresentaram mais de uma amostra positiva para %*BCR-ABL1^{EI}*, 88,3% (11/17) recaíram. Ou seja, os 17 pacientes que recaíram apresentaram pelo menos uma amostra positiva para a detecção do transcrito, enquanto que 44/101 (43,6%) apesar de terem resultados positivos para %*BCR-ABL1^{EI}* não recaíram ao TCTH. A recaída foi significativamente diferente no grupo com resultado positivo para detecção do transcrito ($p < 0,01$).

Ao compararmos individualmente cada grupo não foi observada diferença significativa entre o grupo I e II com relação a % de pacientes que recaíram ($p = 0,097$). Enquanto que ao compararmos o grupo III com os grupos I e II foi observada diferença em ambos: Grupo I vs III - $P = 0,0002$; Grupo II vs III - $P = 0,0176$ (Figura 3.13).

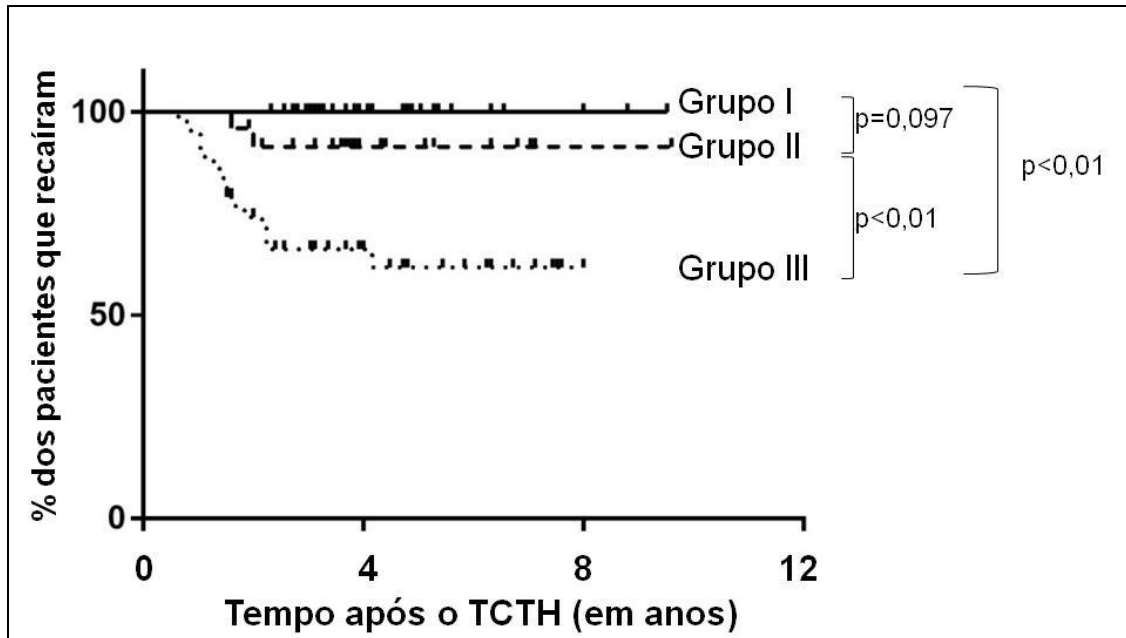


Figura 3.13: Porcentagem de pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao TCTH (transplante de células-tronco hematopoiética) classificados por grupos.

Visto que a presença de mais de amostra positiva foi associada a uma recaída ao TCTH, foi avaliado se havia um valor de %*BCR-ABL*^{1E1} que fosse preditivo da recaída. Para isso os valores positivos de %*BCR-ABL*^{1E1} foram utilizados como índice de Youden da curva ROC associados à recaída ao transplante e >0,06% de *BCR-ABL*^{1E1} foi o valor que apresentou a maior sensibilidade e especificidade, 100% e 96,4%, respectivamente (Figura 3.14). O valor da AUC para 0,06% foi 0,994 (0,973 a 1,000).

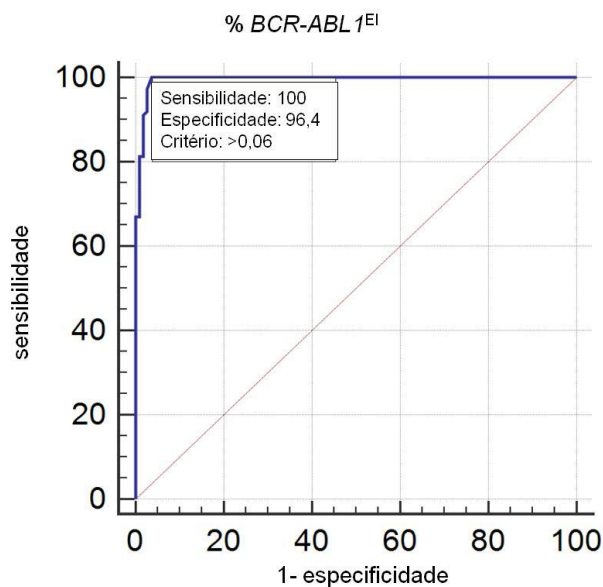


Figura 3.14: Curva ROC com índice de Youden para avaliar recaída ao transplante de células tronco hematopoiéticas em pacientes com leucemia mieloide crônica.

Ao analisarmos todos os pacientes, de acordo com o valor de amostras: $\leq 0,06\%$ *BCR-ABL1^{EI}* e $>0,06\%$ *BCR-ABL1^{EI}* foi possível observar que a maior porcentagem de pacientes que recaíram ao TCTH estavam no grupo com valores $>0,06\%$ *BCR-ABL1^{EI}* quando comparado ao grupo $\leq 0,06\%$ *BCR-ABL1^{EI}* ($p < 0,05$) (Figura 3.15)

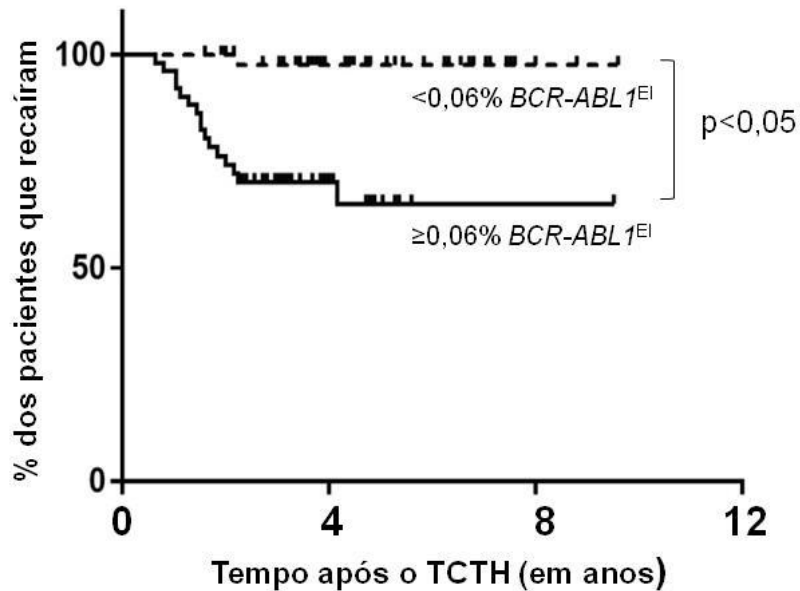


Figura 3.15: Porcentagem de pacientes com leucemia mieloide crônica que recaíram ao transplante de células – tronco hematopoiéticas classificados de acordo com o valores de $0,06\%$ *BCR-ABL1^{EI}*.

Dado os resultados anteriores em relação à associação entre ausência de $\%BCR-ABL1^{EI}$ e ausência de recaída comparamos a metodologia ddPCR com a RT-qPCR a fim de avaliar a mais indicada para identificar os verdadeiros negativos, visto que esses possuem baixíssima probabilidade de recaírem ao TCTH.

3.4) DISCUSSÃO

3.4.1) *Pacientes adultos com LMC*

Em menos de 10 anos o desfecho da LMC mudou, transformou-se de uma doença fatal a uma doença crônica apenas com o uso de uma medicação oral, possibilitando que os pacientes apresentem uma vida útil próxima a da população normal. A LMC foi a primeira neoplasia tratada com uma droga alvo específica tornando-se um modelo de estudo para o câncer (APPERLEY, 2015).

Parâmetros baseados em respostas moleculares que discriminam um respondedor ótimo e uma falha a terapia são bem definidos na literatura. Sendo as respostas precoces (logo aos 3 meses após o início da terapia) e classificação quanto a profundidade da resposta, marcadores de SLP e interrupção da terapia, respectivamente. Apesar de haver diferenças quando comparados os resultados de ensaios clínicos controlados com os da "vida real", também largamente relatados (GOLDBERG, 2015), esses marcos são aplicáveis. Os dados obtidos no presente trabalho são provenientes de resultados prospectivos de pacientes com LMC tratados no Serviço de Hematologia e molecularmente monitorados pelo Laboratório de Biologia Molecular, por isso, os dados são mais semelhantes ao de "vida real" reportados na literatura. A mediana da idade ao diagnóstico foi 52,2 anos, um pouco maior se comparada a ensaios clínicos, na qual esta variou de 42 a 46,3 anos (BRANFORD et al., 2014; HANFSTEIN et al., 2012; MARIN et al., 2012), mas semelhante aos observados na "vida real" que variam de 44 a 52 anos (DI BELLA et al., 2015; BEE et al., 2017). Rohrbacher e colaboradores mostram que a idade é subestimada nos ensaios clínicos e a justificativa da não inclusão de pacientes idosos seria a maior comorbidade e piores escores prognósticos (ROHRBACHER et al., 2009).

Em adultos, a LMC é mais prevalente em homens do que em mulheres, e no nosso estudo não diferente, sendo observada uma razão de 1,3:1, corroborando os dados da literatura que mostram uma variação de 1,2 a 1,7:1 (ROHRBACHER; HASFORD, 2009; VISSER et al., 2012; HOGLUND et al., 2013), sendo esta diferença menos acentuada na infância e jovens adultos. Um estudo epidemiológico sugere que a diferença entre os sexos pode ser pelo

homem apresentar um maior risco de desenvolver a doença ou por uma latência menor entre o início da doença e o diagnóstico quando comparado com as mulheres (RADIVOYEVITCH et al., 2014).

Dos pacientes adultos com LMC analisados 69% atingiram a RMM aos 12 meses, esse número é um pouco inferior aos observados nos ensaios clínicos controlados (HOCHHAUS et al., 2009; HUGHES et al., 2010; HOCHHAUS et al., 2017b), mas próximo aos resultados da “vida real” (DI BELLA et al., 2015; GOLDBERG, 2015).

O valor prognóstico aos 3 meses após início da terapia já é bem consolidado em adultos e inclusive foi incorporado nas recomendações internacionais para o monitoramento de pacientes com LMC (BACCARANI et al., 2015, 2013). Os pacientes que possuem níveis $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses possuem um melhor prognóstico sendo classificados como respondedores ótimos e apresentam uma maior probabilidade de atingir a RMM aos 12 meses, uma maior SLP e SG. 30,8% dos pacientes deste estudo tiveram níveis $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses após o início do imatinibe, um pouco superior quando comparado a resultados de ensaios clínicos, na qual essa foi de: 24,2%; 28% 23% (MARIN et al., 2012; HANFSTEIN et al., 2012; BRANFORD et al., 2014). O que talvez explique a nossa menor porcentagem de pacientes com RMM aos 12 meses.

Nesse trabalho, foi observada uma particularidade, alguns pacientes alcançaram a RMM até os 18 meses, podendo ser classificados como respondedores tardios, uma vez que esta RMM foi mantida ao longo do tratamento. Treze pacientes que não tinham atingido a RMM aos 12 meses atingiram aos 18 meses e 69% (9/13) deles estavam no grupo com níveis de *BCR-ABL1* $>10\%$ aos 3 meses. A RMM alcançada tardiamente desses pacientes foi mantida até o último seguimento. Reforçando dados que mostram que o grupo com níveis de *BCR-ABL1* $>10\%$ aos 3 meses pode evoluir de maneira heterogênea em relação ao alcance de respostas futuras (BRANFORD et al., 2014). Di Bella e colaboradores também avaliaram o alcance de RMM aos 18 meses, mas não observaram associação com os valores de transcritos aos 3 meses após o início do tratamento (DI BELLA et al., 2015).

A resposta molecular $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses parece ser mais heterogênea quando comparada a $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*. Dessa maneira, a

importância dos níveis de redução dos transcritos em contraposição a um valor de resposta em um ponto do tratamento foi ressaltada e o conceito de *halving time* (= redução da carga leucêmica pela metade) introduzido na LMC (BRANFORD et al., 2014).

3.4.2) Estudo do *halving time* em pacientes em uso do 2ITK

Esse trabalho é o primeiro a avaliar o valor prognóstico da redução nos níveis de transcritos pela metade em pacientes com LMC que trocaram de inibidor, ou seja, em 2ª linha de tratamento. Até o momento só há valores de redução da carga leucêmica (*halving time*) para o uso de ITK em primeira linha, como o imatinibe (76 dias) (BRANFORD et al., 2014), dasatinibe (14 dias) (IRIYAMA et al., 2015) e nilotinibe (11 dias) (STEEGMANN et al., 2017), o tempo de redução dos dois últimos é esperadamente menor visto os dados *in vitro* e em pacientes que os descrevem como mais potentes quando comparado ao imatinibe. O valor de *halving time* encontrado para os pacientes que falharam ao uso de imatinibe e trocaram para 2ITK foi de 35 dias, intermediário ao observado nos estudos anteriores de primeira linha de tratamento.

Este valor foi independente do tempo de exposição prévio ao imatinibe e da % $BCR-ABL1^{EI}$ antes da troca de inibidor. Ainda, para os grupos que levaram >35 dias para reduzir os níveis de transcritos pela metade, os valores de % $BCR-ABL1^{EI}$ aos 3, 6 e 12 meses após a troca para 2ITK foram significativamente maiores quando comparada aos que levaram ≤35 dias. Para os pacientes com ≤35 dias para redução, pela metade, da carga leucêmica foi observada uma maior probabilidade de SLP e SLE. Sugerindo que o tempo estimado em nosso estudo foi capaz de identificar precocemente pacientes com uma maior probabilidade de falharem a terapia.

Visto que os atuais critérios de falha molecular aos 2ITKs recomendados pelo ELN são somente após 6 meses de início de terapia (>10% $BCR-ABL1^{EI}$), este resultado pode ser utilizado como um marcador precoce de falha. Logo, para os pacientes com >35 dias de redução da carga leucêmica um acompanhamento clínico, com solicitação de exames e visitas em intervalos mais curtos do que o habitual podem auxiliar precocemente estes pacientes, evitando assim nossas falhas à terapia.

3.4.3) Pacientes pediátricos com LMC

Estudos de LMC pediátrica são raros na literatura, por ser uma doença com maior incidência em idades avançadas. Dessa forma a caracterização clínica, de resposta molecular e desfecho foi parte importante desse trabalho. Foram analisados pacientes com LMC tratados com imatinibe como terapia de primeira ou segunda linha em uma coorte homogênea, tratada em um único centro. O uso prévio do IFN- α em alguns pacientes foi principalmente devido ao sistema de saúde público brasileiro não permitir o uso do imatinibe em pacientes pediátricos como terapia de primeira linha até 2008.

Na nossa série não foi observada preponderância em relação ao sexo dos pacientes (1,1:1), corroborando os estudos que indicam que em pacientes com <25 anos, a discrepância entre o sexo não é observada (FUNKE et al., 2005; RADIVOYEVITCH et al., 2014; KARALEXI et al., 2016). Apesar do gênero não possui um papel no prognóstico da doença.

A leucometria foi em média $288 \times 10^9/L$, superior ao observado em adultos em que foi, em média, $147,2 \times 10^9/L$. Essa diferença já foi observada em publicações anteriores e alguns sugerem que essa seja uma das explicações para a maior agressividade da doença em pacientes mais jovens (MILLOT, 2005; HIJIYA et al., 2016).

Neste estudo foi observado que após 5,1 anos de acompanhamento, 80,9% dos pacientes atingiram a RMM e dois progrediram para fases mais avançadas e um veio a óbito. Os dados na literatura são bem diversificados. Laksmaiah e colaboradores, em uma coorte de 43 pacientes, mostraram uma SG e SLP de 100%, com um alcance de RCgC em 58,1% dos pacientes (LAKSHMAIAH et al., 2012), enquanto que Champagne e colaboradores observou uma SG de 92%, SLP de 72% após 36 meses de acompanhamento e 72% (37/51) dos pacientes alcançaram a RCgC (CHAMPAGNE et al., 2011). Enquanto que Millot e colaboradores reportaram uma SLP de 98% após 36 meses de tratamento em uma coorte de 44 pacientes, sendo que 61% deles atingiu a RCgC (MILLOT et al., 2011). Ainda, Suttorp e colaboradores mostraram que em 42 pacientes, 85% deles atingiram a RMM (SUTTORP et al., 2010).

O gênero, idade ao diagnóstico, e o risco de Sokal não foram fatores prognósticos associados a um maior alcance de RMM aos 12 meses após o início do imatinibe. Enquanto que pacientes com uma menor SLE

apresentaram uma maior probabilidade de atingir RMM aos 18 meses. Já a SLP, apesar de todos os pacientes que progrediram não terem alcançado a RMM aos 12 meses ou aos 18 meses não foi observada diferença significativa quando comparado com o grupo que não atingiu essas respostas, provavelmente pelo baixo “n” amostral.

Os níveis de transcritos aos 3 meses após o início do imatinibe como discriminatório de futuras respostas a ITK e SG, parâmetro já estabelecido para adultos (MARIN et al., 2012) ainda não é consenso na LMC pediátrica, tendo poucos trabalhos publicados. Millot e colaboradores reportaram em uma coorte de 40 pacientes pediátricos o valor prognóstico da resposta molecular precoce. O grupo com valores $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses após início com imatinibe apresentou um maior de pacientes com RCgC e RMM aos 12 meses quando comparado ao grupo com $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses (MILLOT et al., 2014b). Em contrapartida, proposta similar em uma coorte italiana, analisou o valor prognóstico aos 3 meses após início da terapia com altas doses de imatinibe nos pacientes pediátricos e não foi observado diferença no alcance de RCgC ou RMM (GIONA et al., 2016). Em nosso estudo foi observado que os pacientes com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses após início com imatinibe possuíam uma leucometria menor e maiores taxas de RMM aos 18 meses quando comparado com o grupo com $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}*. Enquanto que não foi observada diferença significativa com relação ao tamanho médio do baço e alcance a RMM aos 12 meses. A SLP também não foi observada diferença entre os dois grupos, mas vale ressaltar que os dois pacientes que evoluíram para fases mais aceleradas possuíam valores $>10\%$ *BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses.

A frequência e o impacto clínico das isoformas já foi estudado, tanto em adultos como em crianças e adolescentes e os resultados são controversos. Nossos dados da subcoorte pediátrica mostrou uma maior frequência da isoforma e13a2 (11/21 pacientes), mas nenhum fator prognóstico foi associado ao tipo de transcrito. Dois trabalhos em coortes pediátricas mostraram uma resposta inferior nos pacientes com a isoforma e13a2 quando comparada com a e14a2 (LUCAS et al., 2009a), assim como uma mediana menor nos níveis de *%BCR-ABL1^{EI}* aos 3 meses após o início da terapia e uma redução mais rápida nos níveis dos transcritos quando comparado com o grupo e14a2 (SUTTROP et al., 2010). Na coorte de adulto, quando as diferenças são apontadas

demonstram uma prognóstico inferior nos pacientes com e13a2, assim como demonstrado na infância e maior leucometria, mas apesar de serem entidades diferentes, de acordo com os aspectos clínicos, sob o tratamento com imatinibe, não foi observado nenhum risco preditor aumentado associado a nenhuma isoforma (HANFSTEIN et al., 2014). Um enorme estudo abrangendo os cinco continentes vem sendo conduzido com o intuito de mapear a frequência das isoformas e se há relação geográfica e impacto na idade.

Surpreendentemente, estudos para avaliar a frequência de mutações na LMC pediátrica e jovem são raros. Neste estudo foram encontradas duas mutações nos aminoácidos 248 e 255. Um paciente portador de mutação (E255K) progrediu na doença. Os pacientes com mutação foram tratados preferencialmente com o 2ITK de escolha de acordo com o tipo de mutação apresentada.

A descontinuação de um ITK dentro de ensaios clínicos vem sendo discutida pelos diversos grupos, visando uma remissão livre de tratamento e esta foi avaliada em pacientes com mais de 2 anos de respostas moleculares sustentadas e profundas (níveis indetectáveis de %*BCR-ABL*^{1^{EI}}, RM^{4,5}) (MAHON et al., 2010; ROSS et al., 2013). Na LMC pediátrica, até onde temos conhecimento, somente dois estudos foram relatados e um estudo maior está sendo planejado. O primeiro incluiu 6 crianças que decidiram parar o imatinibe por conta própria, após períodos variáveis (<2 anos) de níveis indetectáveis do transcrito e foram monitorados a longo prazo. Após a interrupção do tratamento de imatinibe, observaram-se níveis significativos de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} em todos os seis pacientes (MILLOT et al., 2014a). No outro estudo, duas crianças que interromperam o imatinibe após 48 e 19 meses, após um período de 2 anos de níveis de *BCR-ABL*¹ indetectáveis, evoluíram com baixos níveis de transcrito após a interrupção da imatinibe (MOSER et al., 2014). Aqui, apenas um paciente seria elegível para interromper o tratamento com imatinibe, considerando como critério os já estabelecidos em adultos (dois ou mais anos com níveis de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} indetectáveis, RM^{4,5}). Levando em conta que os efeitos adversos graves com exposição prolongada ao imatinibe são ainda desconhecidos e que, em adultos, a reintrodução do medicamento após a descontinuação, acarretou na recuperação da resposta molecular, as crianças elegíveis poderiam se beneficiar de ensaios clínicos similares.

O tratamento de pacientes pediátricos com LMC é um desafio maior quando comparado aos adultos, principalmente devido à longa expectativa de vida esperada e os efeitos desconhecidos da exposição aos ITKs e as comorbidades associadas ao TCTH. Recomendações internacionais atuais para o gerenciamento de crianças e adultos jovens LMC sugerem o uso de imatinibe como terapia de primeira linha. Se este for bem tolerado, o uso é recomendado indefinidamente (DE LA FUENTE et al., 2014), por isso, estudos para entender melhor as particularidades da LMC na infância ainda são necessárias para apoiar a manutenção ou mudança de um ITK. As opções clínicas crescentes resultantes de uma mudança precoce de ITK, a experiência clínica ainda curta com 2ITK na LMC pediátrica fora de ensaios clínicos e não menos importantes, razões econômicas, apoiam essa preocupação.

3.4.4) Pacientes adultos submetidos ao TCTH

Devido ao sucesso dos ITKs nesta leucemia, o TCTH foi substituído no tratamento da linha de frente de pacientes em FC. Porém, ainda é a única terapia curativa e continua sendo uma opção para um grupo específico de pacientes, os que estão em FA e CB por exemplo (INNES; APPERLEY, 2014) ou ainda uma alternativa de tratamento para aqueles pacientes com falha ou respostas subótimas (*warning*) ao tratamento com ITKs. Em nosso estudo também foi observado uma redução no número de pacientes com LMC submetidos ao TCTH ao longo dos anos. Entretanto, ainda é significativo o número de pacientes acompanhados, sendo vasta a coorte de pacientes submetidos ao TCTH há mais de 5 anos, 10 anos.

A mediana da idade ao diagnóstico na subcoorte de pacientes com LMC submetidos ao TCTH foi de 44,3 anos, inferior quando comparada a subcoorte de adultos (52,2 anos) reportada anteriormente, provavelmente por que ao selecionarmos somente o grupo de pacientes submetidos ao transplante, os mais idosos que são menos elegíveis a esta terapia acabaram sendo excluídos. O número de pacientes diagnosticados em fases mais avançadas da doença foi maior na subcoorte dos pacientes pós TCTH quando comparado aos adultos com LMC, 32,6% vs 18%, respectivamente. A presença da mutação T315I na coorte estudada correspondeu a 8 casos.

Pacientes portadores da mutação T315I (mutação que confere resistência à maioria dos ITKs disponíveis, com exceção do ponatinibe) também são elegíveis para o transplante, principalmente em países em que o uso do ponatinibe não foi aprovado ainda. No Brasil, os ensaios clínicos para este inibidor estão em fase inicial. Em um estudo recente, Nicolini e colaboradores comparou pacientes portadores da mutação T315I em FC que receberam ou ponatinibe ou TCTH e observou que a SG foi significativamente maior no grupo que fez uso do ponatinibe quando comparado aos que foram submetidos ao TCTH (NICOLINI et al., 2017b).

Com o advento de metodologias mais sensíveis do que a RT-qPCR, como o ddPCR, surgiram trabalhos utilizando esta para o monitoramento molecular de pacientes com LMC em uso de ITK (ALIKIAN et al., 2017). A lógica é que quanto mais sensível for uma técnica, melhor será o acompanhamento destes pacientes, mas não há relatos até o momento do uso desta metodologia para o monitoramento em pacientes pós TCTH.

A metodologia de ddPCR tem a vantagem de não utilizar curva padrão para a quantificação absoluta dos transcritos, mas possui uma maior probabilidade de identificar falsos positivos. Logo, apesar de ser mais sensível, é menos específica quando comparada com a RT-qPCR e para o monitoramento molecular pós TCTH o objetivo principal é identificar as amostras verdadeiramente negativas, uma vez que os pacientes com amostras seguidamente negativas possuem uma menor probabilidade de recaída. Nosso estudo sugere que a técnica de RT-qPCR continua sendo a melhor opção para o monitoramento desses pacientes pós – TCTH.

Visando avaliar a relação entre a presença de transcritos e recaída, a subcoorte de pacientes pós-transplante do presente estudo foi dividida em três grupos de acordo com o número de amostras positivas para *BCR-ABL1* após o TCTH: I) nenhuma amostra positiva; II) pelo menos uma amostra positiva; III) mais de uma amostra positiva; Foi possível observar que assim como demonstrado por outros grupos, a indetectabilidade do gene de fusão está diretamente relacionada com a ausência de recaída (ARPINATI et al., 2013; KAEDA, 2006). Nossos dados mostraram ainda que somente uma amostra positiva não foi correlacionada com a recaída, porém mais de uma amostra positiva foi correlacionado com recaída. 88% dos pacientes que recaíram

estavam no grupo III. A mediana de recaída foi de 18 meses, variando de 8 a 121 meses. Outros estudos publicados também mostraram que a recaída apesar de ser mais comuns durante o primeiro ano de tratamento, podem ocorrer algum tempo depois do transplante (WINGARD et al., 2011). Goldman e colaboradores reportaram um caso de recaída 18 anos após o transplante (GOLDMAN et al., 2010), o que justifica o monitoramento permanente, inclusive nos que já realizaram o transplante há anos.

A recaída e diferentemente definida em cada estudo, o presente trabalho considerou recaída baseado nos dados de prontuário de cada paciente, uso de DLI (do inglês *donor lymphocyte infusion*, infusão de linfócitos do doador) e/ou ITK. Outros consideraram recaída hematológica e citogenética (OLAVARRIA, 2001; OTAZÚ et al., 2002) e mostraram que a presença de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} a partir do 4º mês após o transplante foi associado a recaída hematológica e citogenética. Já Kaeda e colaboradores definiram recaída molecular sujeita a intervenção terapêutica como: $\geq 0,02\%$ de *BCR-ABL*^{1^{EI}} em três amostras consecutivas com intervalos mínimos de 4 semanas ou ainda $\geq 0,05\%$ em duas amostra consecutivas em um intervalo de 4 semanas (KAEDA, 2006).

O limite de %*BCR-ABL*^{1^{EI}} que pudesse ser considerado um preditor de recaída foi avaliado neste trabalho e pacientes com valores $> 0,06\%$ *BCR-ABL*^{1^{EI}} possuem uma maior probabilidade de recaída, independente do tempo entre elas, quando comparado com os valores $\leq 0,06\%$ *BCR-ABL*^{1^{EI}}. Este valor é maior do que previamente publicado por Kaeda e colaboradores, mas vale ressaltar os valores de $> 0,02\%$ *BCR-ABL*^{1^{EI}} ou $> 0,05\%$ *BCR-ABL*^{1^{EI}} sugeridos por eles eram em três e dois testes consecutivos em um espaço de 4 semanas.

A detecção precoce da recaída, em baixos níveis de carga leucêmica, permite uma terapia de resgate eficaz. As opções atuais incluem administração de DLI, ITK ou a combinação de ambos. A administração de doses escalonadas de DLI induz remissões duráveis na maioria dos pacientes com recaída molecular ou citogenética (probabilidade de 2 anos de remissão molecular 100% e 84%, respectivamente) (DAZZI et al., 2000). Com o potencial de uso do DLI e reintrodução do ITK faz-se necessário um marco para definição de recaída molecular, que possa ser utilizado para a tomada de decisões clínicas.

4) Parte II - Mecanismos de resistência *BCR-ABL1* dependentes

Foi mostrada na Parte I desta tese a frequência de pacientes que falharam a terapia com os inibidores tirosina quinase. Uma das causas conhecidas é a presença de mutação no domínio quinase da proteína híbrida na porção do ABL1. Porém, o impacto clínico da presença das múltiplas mutações ainda é pouco conhecido e ganhou importância após a introdução dos 3ITK na prática clínica. O estudo das mutações compostas será abordado na Parte II desta tese.

4.1) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a frequência de mutações compostas e policlonais na subcoorte de pacientes com LMC que falharam ao tratamento ou que foram diagnosticados em fases avançadas da doença;
- Avaliar o impacto da presença de mutações compostas e o alcance da resposta molecular desses pacientes;

4.2) METODOLOGIA

Os critérios de indicação para pesquisa de mutações no DQ de ABL1 utilizados nesse trabalho foram baseados nas recomendações internacionais (SOVERINI et al., 2011c), com algumas adequações como por exemplo a solicitação do médico responsável (Figura 4.1).

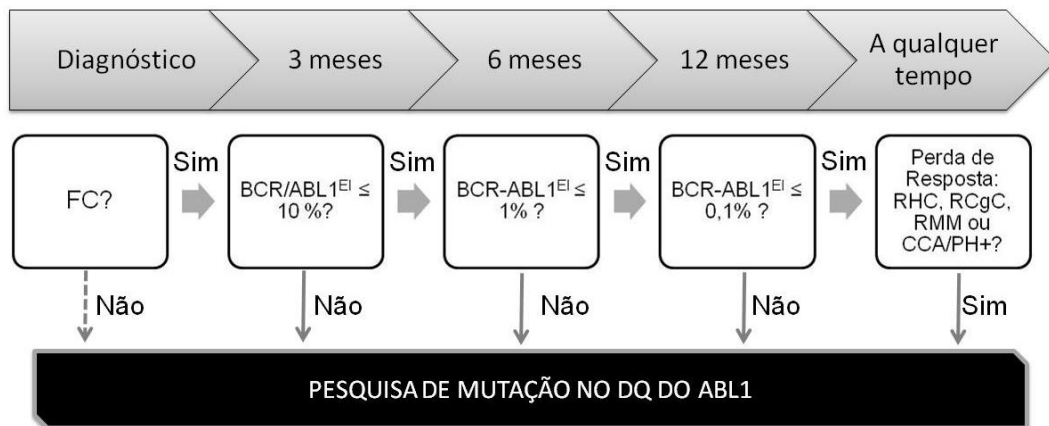


Figura 4.1: Critérios para solicitar a pesquisa de mutação no domínio quinase do ABL1 para pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores tirosina quinase. Na parte superior da figura pode ser observado o tempo ao longo do tratamento: do diagnóstico até os meses após o início do tratamento. Caso o paciente não atenda os critérios estabelecidos dentro de cada quadrado, a pesquisa de mutação é indicada.

Legenda: FC = fase crônica, RHC = resposta hematológica completa, RCgC = resposta citogenética completa, RMM = resposta molecular maior, CCA = do inglês, *clonal chromosome abnormality* DQ= domínio quinase

Fonte: Adaptado de Soverini e colaboradores (SOVERINI et al., 2011c).

4.2.1) Pacientes

A mesma coorte descrita na Parte I foi utilizada para a seleção das amostras para este estudo. Foram incluídas amostras do período de julho de 2011 a julho de 2017 com resultado positivo para mais de uma mutação no DQ de ABL1, pelo sequenciamento direto de Sanger. Essas amostras eram provenientes de pacientes com LMC que não haviam sido submetidos ao TCTH e possuíam mais de 12 meses de acompanhamento. Baseados nos critérios descritos anteriormente foram selecionados 12 pacientes com 17 amostras (Figura 4.2).

Esse estudo obedeceu às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res. nº 196/1996) de acordo com o projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA de número 129/10 (Anexo II).

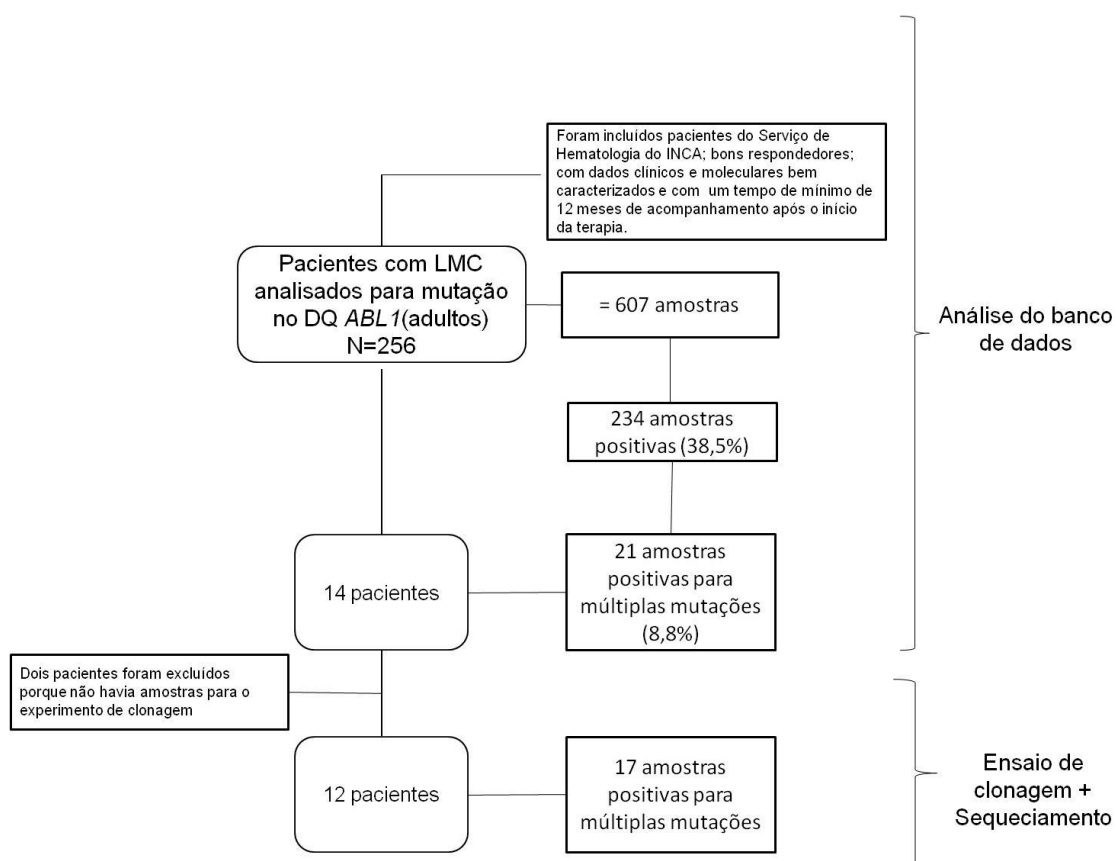


Figura 4.2: Desenho de estudo. Este quadro apresenta a seleção dos pacientes, sendo observado a coorte total de pacientes (n=1.401) cadastrados no laboratório de Biologia Molecular, da divisão de Laboratórios do CEMO, INCA. A partir desta foram analisados o resultado de mutação no DQ de ABL1 de 607 amostras provenientes de 252 pacientes com diagnosticados com LMC e molecularmente monitorados, foram selecionados os 12 pacientes com 17 amostras positivas para múltiplas mutações no DQ de ABL1.

4.2.2) Método

A extração do RNA (vide seção 3.2.3.1) proveniente do sangue periférico de pacientes com LMC em acompanhamento, síntese do cDNA e Nested PCR foram descritas na Parte I (vide seção 3.2.3.2 a 3.2.3.3).

O produto da reação do Nested PCR foi clonado no vetor comercial TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Figura 4.3) e introduzida em uma bactéria competente (Promega) por choque térmico. O antibiótico utilizado para seleção dos clones foi ampicilina. As colônias selecionadas foram selecionadas, de maneira aleatória, o mínimo de 10 clones por amostra. Em seguida foi realizada a extração do DNA pelo kit Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) conforme orientação do fabricante. A enzima de restrição para linearização foi SpeI.

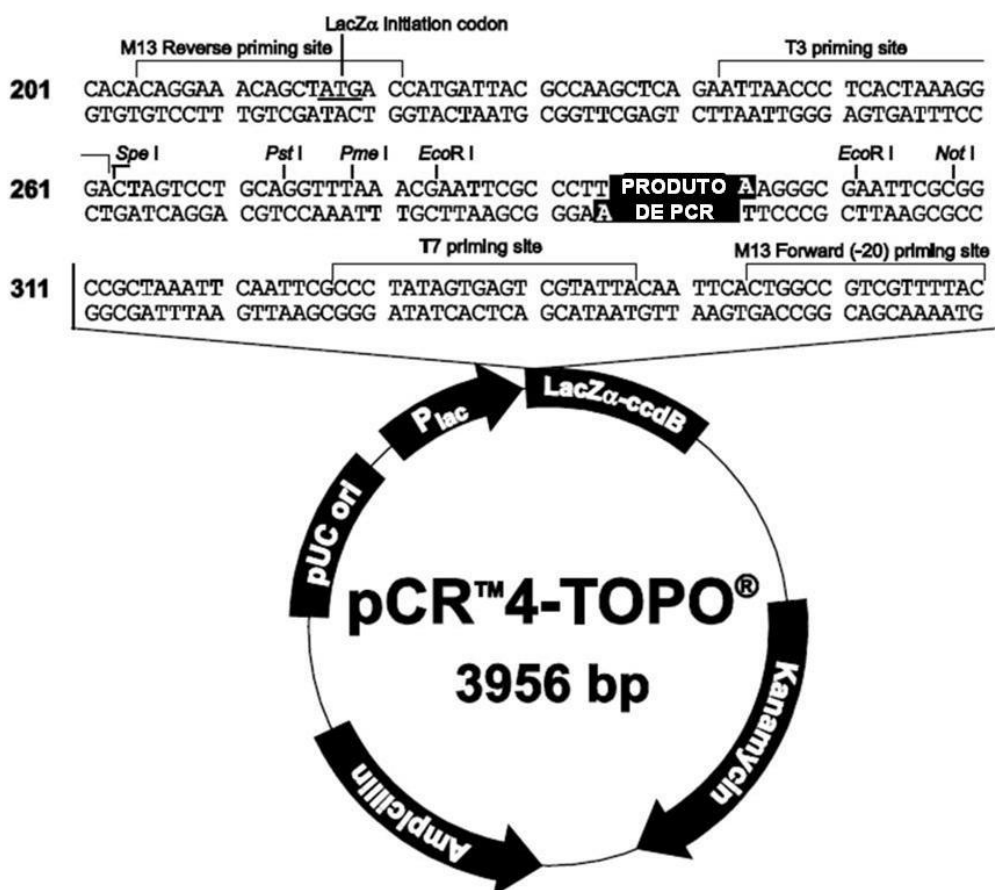


Figura 4.3: Representação do vetor pCR™4-TOPO. A sequência do domínio quinase do gene ABL1 foi inserida no vetor pCR™4-TOPO, e a resistência ao antibiótico ampicilina utilizado para seleção do clone.

4.2.2.1) Transformação bacteriana

Foram adicionados 3mL do meio Luria Bertani (LB) (composto por Triptona - 1g; Extrato de Levedura - 0,5g; NaCl - 1g) em um tubo de polipropileno cônico de 15mL e mantido em uma estufa a 37°C. Enquanto isso, 4µL do plasmídeo foi adicionado nas bactérias competentes (ThermoFisher®) descongelada e incubado em gelo por 10 minutos. Posteriormente, levadas ao banho maria por 90 segundos (choque térmico) e retornadas imediatamente ao gelo por mais 10 minutos. 800µL da bactéria com o plasmídeo foi adicionado no tubo de polipropileno cônico de 15mL com meio LB Agar sem ampicilina que estava armazenado na estufa a 37°C. Este meio voltou a estufa a 37°C por 60 minutos. A fim de precipitar as bactérias, o tubo foi centrifugado a 1.400 rpm, por 30 segundos. Após, descartar o sobrenadante, deixando pelo menos 100µL no tubo e ressuspender o que volume restante.

4.2.2.2) Plaquear

Para o plaqueamento, ou seja, transferência das bactérias em uma placa contendo ágar e ampicilina (nosso vetor contem resistência a este antibiótico) foram feitas duas diluições - 1:10 (90µL de meio + 10µL de bactéria) e todo o volume. O objetivo é evitar formar um tapete de bactérias, impedindo a individualização. Após as diluições, cada uma foi individualmente adicionada na placa e homogenizada até secar. Posteriormente foram armazenadas em uma estufa a 37°C e deixadas até o dia seguinte (*overnight*);

4.2.2.3) Extração de DNA plasmidial em pequena escala (MiniPrep)

A extração do DNA da bactéria foi realizado através do kit *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) conforme orientação do fabricante. O resultado foi observado em um gel de agarose 0,8%, uma vez que o tamanho do vetor TOPO era de 3,9Kb através de um marcador de peso molecular.

O produto da clonagem foi confirmado pela amplificação da segunda etapa do Nested PCR e o resultado visualizado em um gel de agarose a 2%. O resultado da clonagem foi então purificado e sequenciado por Sequenciamento direto de Sanger.

4.2.2.4) Sequenciamento direto de Sanger do DQ de ABL1

O produto da clonagem foi purificado com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Protocol* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Após esta etapa, a reação de PCR foi preparada em um volume final de 10µl, com: 1,5µl do 5x tampão de sequenciamento; 1,0µl do mix de reação BigDye Terminator® v3.1; 0,5µl de iniciador (foram utilizados 4 iniciadores para cobrir toda a região do domínio quinase, três *forward* e um reverso); 3,5µl do produto purificado e 3,5µl de água de injeção para PCR. Esta reação foi adicionada diretamente em uma placa (0,2mL) de 96 poços e levadas ao termociclador para a reação de sequenciamento, na qual foi seguido o seguinte programa: 40 ciclos (94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos) no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Após a reação de sequenciamento, foi realizada uma breve etapa de centrifugação e adicionado 30µL de Isopropanol 75% gelado em cada poço da placa contendo o produto purificado e homogeneizados por 10 segundo em um vortex. A placa foi mantida em repouso por 15 minutos, sob abrigo da luz. Em seguida foi centrifugada por 45 minutos, a 4.000rpm e o sobrenadante descartado, vertendo o volume da placa de uma única vez de cabeça para baixo. Após esta etapa, foi adicionado 50µL de etanol 75% gelado em cada poço da placa e centrifugada por 15 minutos, a 4.000rpm e novamente descartado o sobrenadante vertendo de uma única vez a placa de cabeça para baixo. Mantendo a placa virada para baixo, esta foi colocada na centrífuga apoiada com papel toalha na parte inferior e realizada uma breve centrifugação (*spin down*) deixando chegar até no máximo 600rpm. A placa foi retirada da centrífuga e incubada no termociclador a 60°C por 10 minutos, sob abrigo da luz. Ao final, a placa foi armazenada sob abrigo da luz, à -20°C até a etapa posterior (não ficou armazenada mais do 1 mês).

Posterior ao processo de precipitação da placa, os produtos de sequenciamentos foram submetidos à eletroforese no sequenciador. Para cada poço da placa contendo nosso produto precipitado, foi adicionado 10µL de formamida e foi realizada uma breve centrifugação, visando o preenchimento homogêneo em cada poço. A placa foi incubada sob abrigo de luz no termociclador a uma temperatura de 95°C por 3 minutos. Logo após ao término do aquecimento, a placa foi colocada num recipiente com gelo, temperatura próxima a 4°C, permaneceu por 7 minutos. Novamente foi realizada uma breve centrifugação para que os produtos aderidos às paredes dos tubos dos poços fossem concentrados no fundo. E por fim, levadas ao sequenciador AB310 (Applied BioSystem®).

O resultado do sequenciamento de cada clone foi analisado programa Mutation Surveyor (*Softgenetics*®) e comparado com a sequencia referência do *ABL1* (ENST0000318560) obtida no NCBI.

Cada amostra teve no mínimo 10 clones sequenciados, com algumas exceções. Para as amostras: #4 e #4.1 foram sequenciados mais de 10 clones visando um maior entendimento da evolução clonal uma vez que as amostras #4.2 e #4.3 foram negativas pelo sequenciamento de Sanger. Já para as amostras #7.3, #9 e #10 foram sequenciadas mais de 10 clones para uma maior compreensão da razão: mutação composta/policlonal (Tabela 4.1). Cada paciente foi identificado sequencialmente após a #, e as amostras de cada pacientes estão identificadas sequencialmente após o número do paciente, isto é: #4.1 (pacientes 4, amostra 1).

Tabela 4.1: Número de clones analisados para cada amostra com múltiplas mutações .

# identificação da amostra	número de clones sequenciados	# identificação da amostra	número de clones sequenciados
# 1	10	# 7	10
# 2	10	#7.1	10
# 3	10	# 7.2	10
# 4	20	# 7.3	15
# 4.1	20	# 8	10
# 4.2	10	# 9	12
# 4.3	10	# 10	12
# 5	10	# 11	10
# 6	10	# 12	10

4.2.3) Nomenclatura

Mutações compostas foram definidas como presença de mais de uma mutação presente no mesmo clone *BCR-ABL1*, enquanto que mutação policlonal foi definida como a presença de mais de uma mutação em clones individuais.

A nomenclatura utilizada para classificação dos diferentes clones positivos para uma ou mais mutação foi a sugerida por Khorashad e colaboradores (KHORASHAD et al., 2013), e pode ser vista na Figura 4.4. Dois grandes grupos podem ser discriminados:

a) **Mutação Predominante** – Mutação detectável por sequenciamento direto de Sanger;

a.1) Mutação única – mutação única com troca de sentido (*missense*) detectada por sequenciamento direto de Sanger;

a.2) Mutação dupla – mutação com troca de sentido detectada na mesma amostra por sequenciamento de Sanger;

b) **Mutação detectada em baixa sensibilidade** (*low-level mutation*) – mutações identificadas por sequenciamento direto de Sanger, mas após clonagem da região do DQ de ABL1

b.1) mutação adicional (*add – on mutation*) – Mutação com troca de sentido que emerge adicionalmente ao clone predominante identificadas por sequenciamento direto de Sanger, mas após clonagem do DQ de ABL1;

b.2) mutação independente de baixa sensibilidade (*independent low – level mutation*) – Mutação com troca de sentido presente em clones separados em relação aos clones que abrigam a mutação predominante mutações identificadas por sequenciamento direto de Sanger, mas após clonagem do DQ de ABL1.

As mutações compostas e policlonais, conceituadas na legenda da Figura 4.4, podem aparecer tanto nos clones predominantes quanto nos de baixa sensibilidade.

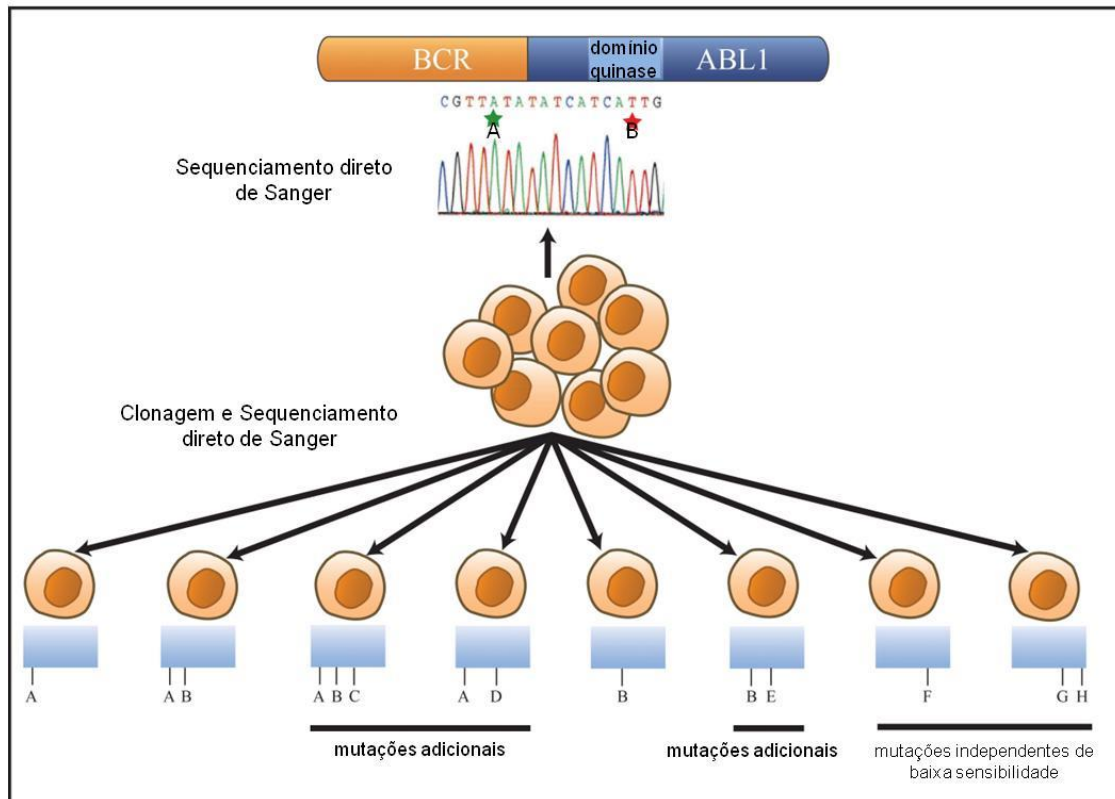


Figura 4.4: Perfil das possíveis mutações encontradas no domínio quinase do gene *ABL1* de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica após o sequenciamento de cada clone. Exemplo de uma amostra selecionada para identificação da localização individual de cada mutação. A figura representa gene de fusão *BCR-ABL1*, destacando a região do domínio quinase, onde são observadas duas mutações pontuais (estrelas verde e vermelha), identificadas pelo sequenciamento direto. Porém, o sequenciamento direto por si só não permite a distinção da localização dessas mutações, se estão no mesmo clone (composta) ou em clones separados (policlonal). Amostras como essa foram selecionadas para serem melhor avaliadas pela técnica de clonagem seguida de sequenciamento direto. As mutações hipotéticas são designadas de A a H. Este modelo abrange todos os possíveis padrões que podem ser observados entre as amostras com duas mutações evidenciadas por sequenciamento direto. Da esquerda para direita: A – mutação predominante policlonal; A/B – mutação predominante composta; A/B/C – A e B mutação predominante composta e C mutação adicional de baixa sensibilidade presente junto ao clone predominante composto; A/D – A mutação policlonal e D mutação adicional de baixa sensibilidade presente junto ao clone predominante policlonal; B – mutação policlonal predominante; B/E - mutação policlonal e E mutação adicional de baixa sensibilidade presente junto ao clone predominante policlonal; F , G/H– mutação independente de baixa sensibilidade; Fonte: adaptado de Khorashad e colaboradores (KHORASHAD et al., 2013).

4.3) RESULTADOS

A mediana da idade ao diagnóstico dos 12 pacientes selecionados foi de 48,3 anos. Dentre os pacientes, 33,3% (4/12) foram diagnosticados em fase mais avançada da doença. Somente quatro pacientes desse grupo de estudo alcançaram a RMM ($\leq 0,1\%$ *BCR-ABL*^{1E1}) aos 12 meses após o início do tratamento, marco para discriminação de um bom respondedor para ITK. Os motivos que levaram a solicitação do exame de mutação foram: a) ausência de resposta molecular (RM) ao longo do tratamento (n=4); b) diagnóstico em FA ou CB (n=4), c) antes da troca de ITK (n=2), a mudança de medicamento foi por intolerância ao imatinibe (*rach* cutâneo), e d) por perda de RMM previamente adquirida (n=2).

A mediana do tempo de terapia com imatinibe foi de 47,9 meses (intervalo: 8,8 – 71,3). Somente um paciente não descontinuou a terapia com o imatinibe, os outros 11 foram submetidos ao tratamento em segunda linha, sendo oito para 2ITK; dois para o IFN- α e um submetido ao TCTH. Entre os oito que utilizaram o 2ITK: quatro foram para o dasatinibe e quatro para o nilotinibe; e ainda, cinco foram submetidos à terceira linha de tratamento, sendo: dois trocaram para o dasatinibe, dois para IFN- α e um foi submetido ao TCTH. Três pacientes vieram a óbito, sendo dois em decorrência do agravamento da doença e um por complicações após o transplante (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Características clínicas de pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de múltiplas mutações no domínio quinase do ABL1.

Paciente	Gênero	Idade ao diagnóstico (em anos)	Fase ao diagnóstico	RMM aos 12 meses?	Motivo da pesquisa de mutação	Tempo com imatinibe (meses)	2ª terapia (meses)	3ª terapia (meses)	Tempo da amostra analisada	Progrediu?	Faleceu?
#1	Masculino	51	FC	Não	Ausência de RM	19,5	dasatinibe: 12,3	Não	9 meses após início do dasatinibe	Não	Sim
#2	Masculino	37	FC	Não	Ausência de RM	120	Não	Não	32,4 meses após início da terapia com imatinibe	Não	Não
#3	Masculino	48	FA	Não	Diagnosticado em FA	42,8	nilotinibe: 8,0	dasatinibe: 53,9	Logo após o início da terapia com dasatinibe	Não	Não
#4									24,1 meses após o início da terapia com imatinibe		
#4.1	Masculino	30,7	FA	Sim	Diagnosticado em FA	53,7	IFN-alfa	Não	27,5 meses após o início da terapia com imatinibe	Não	Não
#4.2									37,9 meses após o início da terapia com imatinibe		
#4.3									42,0 meses após o início da terapia com imatinibe		
#5	Masculino	24,2	FC	Não	Ausência de RM	39,6	dasatinibe: 3,3	IFN- α	21,4 meses após o início da terapia com IFN- α	Sim	Não
#6	Feminino	32,7	FC	Sim	Troca de ITK - intolerância	71,3	nilotinibe: 7,0	TCTH	143,7 meses após o início da terapia com imatinibe	Não	Não
#7									23,26 meses após o início da terapia com imatinibe		
#7.1									27,30 meses após o início da terapia com imatinibe		
#7.2	Masculino	28,7	FA	Não	Diagnosticado em FA	53,0	TCTH	Não	29,31 meses após o início da terapia com imatinibe	Não	Sim
#7.3									33,03 meses após o início da terapia com imatinibe		
#7.4									39,12 meses após o início da terapia com imatinibe		
#8	Feminino	54,9	FC	Sim	Antes da troca de ITK - Perda de RM	66,0	nilotinibe: 58,7	dasatinibe: 40,2	56,38 meses após o início da terapia com nilotinibe	Não	Não
#9	Masculino	57,2	FC	Não	Antes da troca de ITK - Ausência de RM	13,1	dasatinibe: 36,0	IFN-alfa	12,9 meses após o início da terapia com imatinibe	Não	Não
#10	Masculino	53,4	FC	Não	Ausência de RM	62,1	IFN-alfa	Não	6 meses após descontinuar o imatinibe	Sim	Não
#11	Masculino	48,5	CB	Não	Diagnosticado em CB	8,8	dasatinibe: 32,8	Não	2 meses após o diagnóstico	Não	Sim
#12	Masculino	73,6	FC	Sim	Perda de RM	27,3	nilotinibe: 24,0	Não	25,0 meses após o início do tratamento com imatinibe	Não	Não

Legenda: FC = fase crônica, FA = fase acelerada, CB= crise blástica; RMM = resposta molecular maior; RM= resposta molecular, , ITK = inibidor tirosina quinase; IFN-alfa = interferon-alfa, TCTH = transplante de célula-tronco hematopoiética.

Foi sequenciado o total de 149 colônias dos 12 pacientes e foram identificadas 84 mutações, sendo 32 mutações predominantes; 50 as classificadas como mutações adicionais e duas foram mutações independentes de baixa sensibilidade. A alteração mais frequente encontrada nas mutações compostas foi a T351I, presente em 5/12 (41,6%) pacientes, seguida da G250E (3/12 – 25%) F317L e F317L (2/12 – 16,6%).

Surpreendentemente, foi observada uma heterogeneidade com relação a presença de clones com mutações compostas ou policlonais na mesma amostra, com exceção dos pacientes # 1, # 2 e # 6, na qual os clones foram majoritariamente composto, policlonal e composto, respectivamente (Tabela 4.3). As mutações compostas provavelmente se originaram do clone *BCR-ABL1* que já carregava uma mutação predominante.

Entre os cinco pacientes diagnosticados em fase avançada (FA/CB), quatro possuíam, em sua maioria, mutações policlonais (80%), nos pacientes em FC o percentual foi 71,4%. No entanto, as amostras disponíveis para este estudo não permitiram uma análise detalhada da correlação entre a fase da doença e a presença de mutações múltiplas.

Tabela 4.3: Descrição das mutações identificadas nos pacientes com leucemia mieloide crônica / resultado de cada amostra por clones sequenciados.

Id do paciente	resultado da amostra detectada por Seq de Sanger	quant de mutações novas mutações adicionais		clone 1	clone 2	clone 3	clone 4	clone 5	clone 6
		missense	silenciosa						
#1	26197 (T315I / A397P)	Q252R V260A	V280V V289V K294K D363D	T315I / A397P	T315I / A397P	V280V / T315I / A397P	V280V / T315I / A397P	V260A / V289V / T315I / A397P	V280V
#2	20373 (V268M / E355G)	V260A L341P	R362R E373E Y353Y	V260A / V268M	V268M	E255G / E373E	V268M / R362R / E373E	E255G	E255G / L341P
#3	20561 (E275K / F317L)	I360V T406I	A337A	E275K / F317L	E275K / T406I	E275K / I360V	F317L	E275K / F317L	E2575K
#4	19852 (T315I / F359V)	M351T	Y353Y K404K	F359V	F359V	T315I	T315I / Y353Y	F359V	T315I / F359V
#4.1	20452 (T315I / F359V)	E355G H490R	V289V Y353Y G422G	E355G / T315I	T315I / G442G	T315I	F359V	F359V	T315I / Y353Y
#4.2	22558	-	INS35	NEG	INS35	T315I	T315I	T315I	T315I / F359V
#4.3	22605	-	-	T315I	T315I	T315I	NEG	T315I	NEG
#5	30245 (L248V / T315I)	-	-	L248V / T315I	L248V / T315I	T315I	L248V / T315I	T315I	L248V / T315I
#6	35448 (G250E / M351T)	W261R	D444D	M351T	M351T	G250E / W261R	M351T	G250E / D444D	G250E / D444D
#7	19381 (E450G)	V280G	V289V	F359I	E450G	E450G	E450G	F359I / E450G	V280G / V289V
#7.1	20137 (F359I/E450G)	T315A E355G	K467K	E450G	F359I	E450G	E450G	E450G	E355G / E450G / K467K
#7.2	20683 (F359I / E450G)	Q252R V260A V280G A337V	V289V K404K	V260A / A337V / K404K / E450G	F359I	F359I / E450G	Q252R / V280G / F359I / E450G	F359I / E450G	V260A / A337V / E450G
#7.3	21362 (F359I / E450G)	H490R	I360I 1423_1424insACT V338V V280V V289V V422V	I360I / F359I / E450G / 1423_1424insACT	F359I / E450G / V422V	I360I / E450G / 1423_1424insACT	V338V / E450G	I360I / E450G	F359I / H490R
#7.4	21751 (F359I)	H490R	-	F359I	F359I / H490R	F359I	F359I	F359I / E450G	NEG
#8	37557 (F359V / H369R)	V299L	D363D K294K A337A	F359V / H369R	F359V / D363D	F359V / H369R	F359V / H369R / K294K	F359V / H369R	F359V
#9	28191 (G250E/E255K)	V299L F317L	A433A INS35	E255K / INS35	G250E/E255K / A433A	E255K / INS35	G250E / A433A	G250E	G250E / E255K / F317L
#10	41207 (G250E/T315I)	E255K S438P	V338V D444D R362R	G250E / T315I / V338V	G250E / T315I	G250E / T315I / D444D / R362R	T315I / S438P	G250E / T315I	G250E / T315I
#11	40514 (T315I / F317L)	G303R	T394T Y353Y	T315I / F317L	T315I / F317L / G303R	T315I / F317L	T315I / F317L	T315I / F317L	T315I
#12	42692 (F359I / E450K)	-	-	F359I / E450K	E450K	F359I	F359I / E450K	F359I / E450K	F359I / E450K

Continuação da Tabela 4.3:

Id do paciente	resultado da amostra detectada por Seq de Sanger	clone 7	clone 8	clone 9	clone 10	clone 11	clone 12	clone 13	clone 14
#1	26197 (T315I / A397P)	K294K / A397P / T315I	V280V / T315I / A397P	Q252R / T315I / A397P	K294K / T315I / D363D / A397P	-	-	-	-
#2	20373 (V268M / E355G)	E255G	E255G / Y353Y	V268M	V268M	-	-	-	-
#3	20561 (E275K / F317L)	A337A / F317L	F317L	E2575K	F317L	-	-	-	-
#4	19852 (T315I / F359V)	T315I / M351T	T351I / F359V / Y353Y / K404K	T315I	T315I	F359V	T351I / F359V	T351I / F359V	F359V
#4.1	20452 (T315I / F359V)	F359V	T315I	T315I / Y353Y / H490R	T351I / F359V	V289V / T351I / F359V	F359V	F359V	T351I / F359V
#4.2	22558	INS35	T315I	T315I	NEG	-	-	-	-
#4.3	22605	T315I	T315I	T315I	NEG	-	-	-	-
#5	30245 (L248V / T315I)	L248V / T315I	L248V / T315I	L248V / T315I	T315I	-	-	-	-
#6	35448 (G250E / M351T)	M351T	M351T	M351T	G250E	-	-	-	-
#7	19381 (E450G)	NEG	E450G	E450G	E450G	F359I	-	-	-
#7.1	20137 (F359I/E450G)	T315A / F359I	E450G	E450G	E450G	-	-	-	-
#7.2	20683 (F359I / E450G)	E450G	E450G	F359I / E450G	V280G / V289V / F359I / E450G	-	-	-	-
#7.3	21362 (F359I / E450G)	E450G	V280V / V289V / F359I / E450G	E450G	F359I / E450G	F359I / V280V	F359I / E450G	E450G	F359I / E450G / H490R
#7.4	21751 (F359I)	E450G	F359I	F359I	F359I	-	-	-	-
#8	37557 (F359V / H396R)	F359V / A337A	F359V / H369R	F359V / V299L	F359V / H369R	-	-	-	-
#9	28191 (G250E/E255K)	E255K / F317L	G250E / E255K / V299L	G250E	E255K / F317L	E255K	G250E	-	-
#10	41207 (G250E/T315I)	T315I	G250E / T315I	G250E / T315I	T315I / E255K	G250E / T315I / D444D	T315I / S438P	-	-
#11	40514 (T315I / F317L)	T315I / F317L / T394T	T315I / T394T	T315I / Y353Y	F317L	-	-	-	-
#12	42692 (F359I / E450K)	F359I / E450K	F359I / E450K	F359I / E450K	F359I	-	-	-	-

Legenda: negrito – mutação predominante; retângulo em azul - mutação composta; retângulo em cinza mutação policlonal; mutação *independent level mutation*; *add-on mutation*: em vermelho – alteração *missense*; em roxo – mutação silenciosa;

As alterações mais frequentes de acordo com a alteração funcional foram: 56,4% de mutações sinônimas, V289V (n=5) e Y353Y (n=4); e 43,6% de mutações de sentido trocado, sendo as mais frequentes: V260A (n=3); H490R (n=3), Q252R (n=2), V280G (n=2) e E355G (n=2); (Tabela 4.4).

As mutações adicionais adquiridas ocorreram tanto no clone predominante composto quanto no policlonal, em algumas amostras foi observada três alterações em um mesmo clone (#7.2 - V260A / A337V / K404K / E450G). A maioria das mutações adquiridas do tipo troca de sentido, ocorreram em resíduos não previamente associados à resistência e não foram recorrentes. Foi observado também um maior número de mutações sinônimas em comparação as mutações de troca de sentido (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Número absoluto das mutações identificadas em pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de mutações múltiplas em cada clone sequenciado.

MUTAÇÃO PREDOMINANTE			MUTAÇÃO ADICIONAL				
Variante	troca	N	ALTERAÇÕES <i>MISSENSE</i>			ALTERAÇÕES SINÔNIMAS	
			Variante	troca	N	Variante	N
T315I	C>T	6	V260A	T>C	3	V289V	5
F359I	T>A	5	Q252R	A>G	2	Y353Y	4
E450G	A>G	4	E355G	A>G	2	1423_1424insACT	2
F359V	T>G	3	A337V	C>T	1	A337A	2
G250E	G>A	3	E255K	G>A	1	D363D	2
F317L	T>C	2	F317L	T>C	1	D444D	2
L248V	C>G	1	G303R	G>A	1	K294K	2
V268M	G>A	1	I360V	A>G	1	R362R	2
E255K	G>A	1	L341P	T>C	1	V280V	2
E275K	G>A	1	M351T	T>C	1	V338V	2
M351T	T>C	1	S438P	T>C	1	A433A	1
E355G	A>G	1	T315A	A>G	1	E373E	1
H396R	A>G	1	T406I	C>T	1	I360I	1
A397P	C>T	1	V280G	T>G	2	INS35	1
E450K	G>A	1	V299L	G>C	1	K467K	1
TOTAL		32	W261R	T>C	1	T394T	1
			TOTAL		21		31

Legenda: as cores representam o nucleotídeo que foi substituído, verde – citosina; azul – guanina; laranja – timina e rosa – adenina.

As mutações predominantes detectadas pelo sequenciamento direto de Sanger foram, em sua maioria, associadas à resistência aos inibidores de segunda geração, com exceção da mutação M351T, que embora frequente, não confere resistência nem ao dasatinibe, nem ao nilotinibe. 77,4% das mutações foram transições (substituição de purina por purina ou de uma pirimidina por pirimidina), sendo as trocas mais comuns entre A→G e T→C (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Percentual de nucleotídeo envolvido mutações pontuais com troca de sentido observadas nos clones da região do domínio quinase do ABL1 de pacientes com leucemia mieloide crônica portadores de mutações múltiplas.

NUCLEOTÍDEO ENVOLVIDO NA SUBSTITUIÇÃO	MUTAÇÃO N (%)	SUBSTITUIÇÃO	NÚMERO ABSOLUTO	% DA SUBSTITUIÇÃO
A	16 (29,2%)	A→C	0	0,0
		A→G	13	24,5
		A→T	0	0,0
C	10 (18,2%)	C→A	0	0,0
		C→G	1	1,9
		C→T	9	17,0
G	10 (18,2%)	G→A	9	17,0
		G→C	1	1,9
		G→T	0	0,0
T	19 (34,4%)	T→A	5	9,4
		T→C	10	18,9
		T→G	5	9,4

Dois pacientes tinham amostras sequenciais, por isso foi possível construir a cronologia do surgimento das mutações. O paciente #4 foi diagnosticado em 2007, em FA, com 30 anos de idade. Começou o tratamento com imatinibe três meses após o diagnóstico e utilizou o IFN- α previamente ao inibidor. Ainda com o IFN- α , chegou a atingir a RCgC aos 12 meses, mas não a RMM. Durante a terapia com imatinibe, a RMM foi alcançada após 10 meses, mas perdeu 14 meses depois, com níveis de *BCR-ABL1*^{EI} de 1,8%. A primeira amostra utilizada foi coletada no momento da perda de resposta e foram identificadas as mutações predominantes T315I e F359V por sequenciamento direto de Sanger, levando a investigação destas amostras e as subsequentes pela metodologia de clonagem seguida de sequenciamento direto de Sanger. Foi observado após a clonagem a presença das mutações policlonais T315I (n=5) e F359V (n=9) e compostas (T315I e F359V, n=3), as mutações adicionais identificadas foram: M351T, Y353Y e Y353Y/K404K, sendo as duas primeiras identificadas no clone policlonal predominante da mutação T315I, enquanto que as mutações adicionais sinônimas Y353Y e K404K foram identificadas no clone composto predominante. Na amostra seguinte, coletada três meses depois, também foram observadas as mesmas mutações predominante policlonal T315I (n=3) e F359V (n=7) e três clones compostos (T315I/F359V), por sequenciamento de Sanger, além das mutações adicionais Y353Y, G422G e E355G junto ao clone predominante policlonal T315I, a V289V junto ao clone predominante policlonal T315I/F359V e a H490V detectada junto ao clone T315I/F359V. Por conta da presença da mutação T315I, o paciente descontinuou a terapia com imatinibe e voltou ao IFN- α , durante esta terapia foi observado a média de 2,89% *BCR-ABL1*^{EI} (variando de 1,67 – 15,02). Durante este período, o resultado do *status* mutacional somente pela metodologia de Sanger deu resultado negativo. Após a clonagem foi possível observar que os clones policlonais portadores da T315I ainda estavam presentes e um clone policlonal foi também detectado e dois clones com a INS35 (inserção de 35pb). Até o último acompanhamento o paciente encontrava-se na fila do TCTH (Figura 4.5).

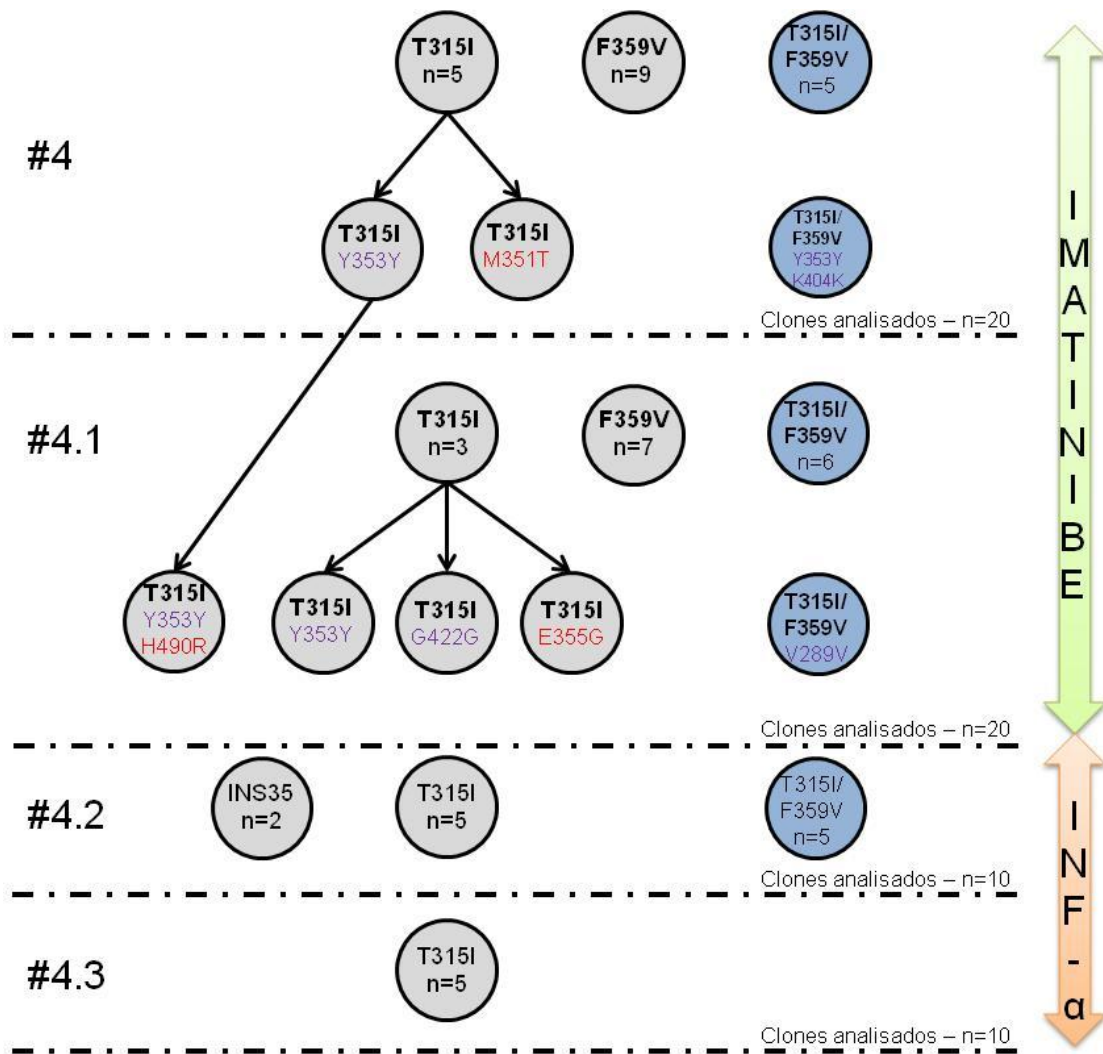


Figura 4.5: Resultado dos clones com mutações múltiplas no domínio quinase do ABL1 de um único paciente com leucemia mieloide crônica. Quatro amostras sequenciais de um paciente com LMC resistente ao imatinibe estão representadas na figura. As mutações são resultado do estudo de clonagem seguido de sequenciamento direto de Sanger. Cada clone está representado por um círculo, sendo o círculo cinza corresponde à mutação policlonal e o círculo azul correspondente à mutação composta. Em negrito estão às mutações predominantes identificadas somente pelo sequenciamento de Sanger, em roxo são as mutações adicionais sinônimas identificadas somente após a clonagem e em vermelho são as mutações adicionais do tipo *missense*. O “n” embaixo dentro de cada círculo corresponde ao número absoluto de clones identificados com aquela variante, a ausência de “n” significa que somente um clone foi identificado com aquela alteração. Na lateral direita está representado o tratamento realizado.

Já o segundo paciente (# 7), foi diagnosticado aos 28,7 anos em FA, a primeira solicitação médica para pesquisa de mutação foi feita ao diagnóstico, mas o resultado foi negativo, o segundo exame para mutação foi realizado após 27,3 meses de tratamento com imatinibe por ausência de RMM e o resultado do sequenciamento direto de Sanger foi positivo para a mutação F359I / E450G (Figura 4.6). O próximo resultado do sequenciamento de Sanger deste paciente foi seis meses depois, também positivo para as duas mutações. Como havia amostra antes, durante e depois desses resultados, realizamos o ensaio de clonagem e sequenciamento de Sanger em todas elas, totalizando cinco amostras sequenciais deste paciente. Não havia a amostra do diagnóstico.

O padrão de mutações observados nessas amostras mostrou-se complexo. Na primeira amostra (#7) é possível observar a presença das mutações predominante F359I/E450G em clones individuais (mutação policlonal) e uma no mesmo clone (mutação composta). Ao realizarmos somente o sequenciamento direto de Sanger, a mutação F359I estava ausente. Foi observada ainda a presença de um clone com mutação independente de baixa sensibilidade, ou seja, detectadas somente após a clonagem, como V280G / V289V. Vale observar que estas alterações ocorreram em aminoácidos bem próximos. Na amostra #7.1, ambas as mutações foram identificadas por sequenciamento de Sanger e no ensaio de clonagem seguido de sequenciamento foram identificadas somente as mutações predominantes policlonais e no clone que continha a E450G foram identificados ainda mutações adicionais (E355G / K467K). Enquanto que na amostra #7.2 foi observado a volta da mutação predominante composta, em três clones, como ganho de mutações adicionais (Q252R/V280G e V280G/V289V) e nos clones com as mutações predominantes policlonais só foi observada a presença de mutações adicionais no clone portador da alteração E450G: V260A/A337V/K404K e V260A/A337V. Na amostra seguinte (#7.3) novamente foi observado a presença de clones policlonais e compostos com ganho de mutações adicionais de baixa sensibilidade. Por fim, na última analisada (#7.4) foram observados clones policlonais e composto portando as mutações predominantes, mas por sequenciamento de Sanger foi identificada somente a

mutação F359I. Quase cinco anos após o diagnóstico, o paciente foi submetido ao TCHT e veio a óbito meses depois.

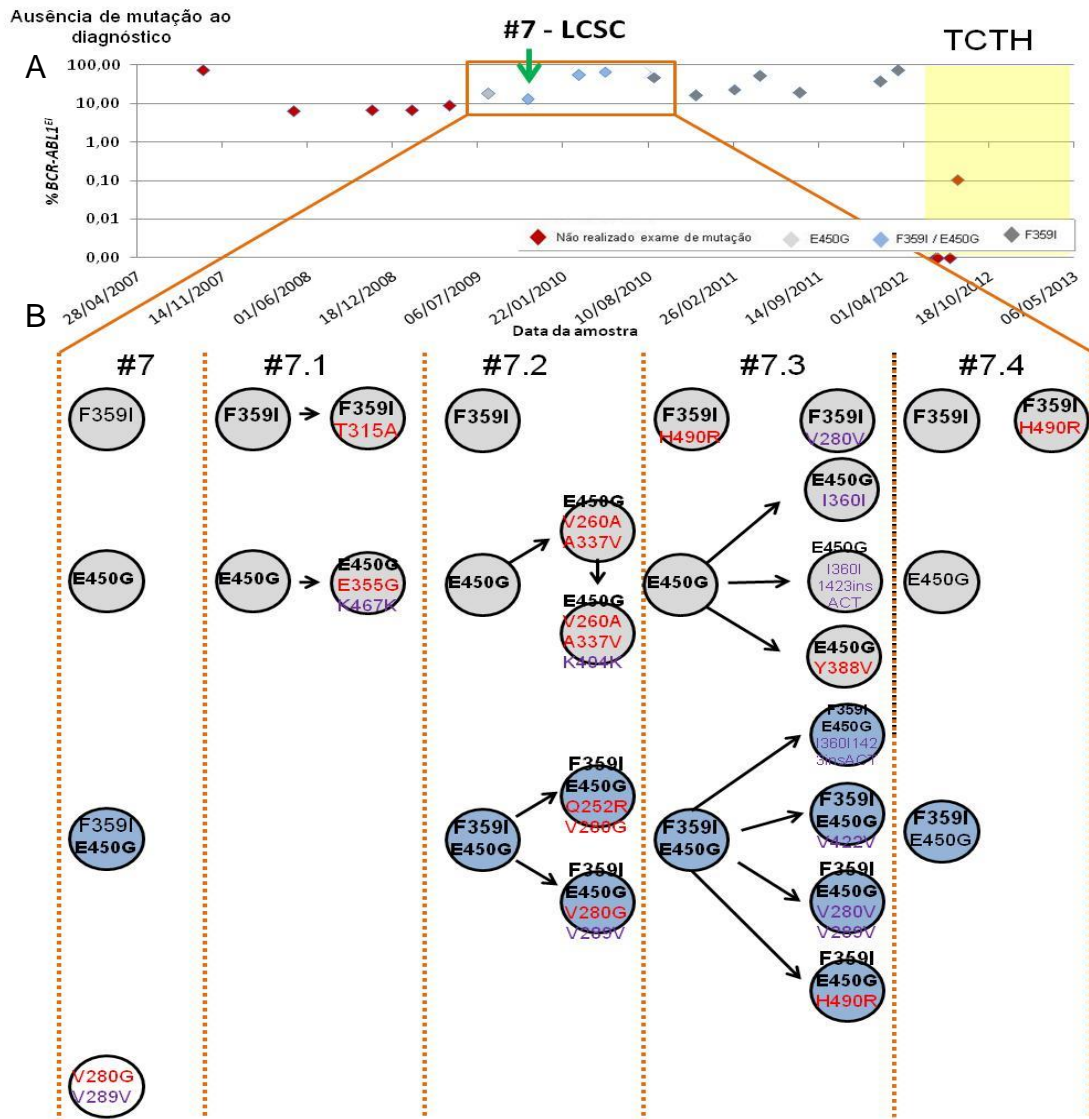


Figura 4.6: Resultado da análise de mutação após clonagem da região do domínio quinase (DQ) ABL1 e sequenciamento de Sanger de cinco amostras sequenciais. A) perfil de níveis de %BCR-ABL1^{EI} de um paciente (#7) com LMC em uso de imatinibe ao longo do tratamento, na qual cada losango representa uma amostra analisada por RT-qPCR para quantificação absoluta do transcrito, e a cor interna do losango refere-se à avaliação do *status* mutacional daquela amostra, sendo vermelho a não realização do exame, cinza claro a mutação E450G, azul as mutações F359I / E450G e cinza escuro a mutação F359I; a seta verde a primeira amostra analisada para avaliar a presença de mutação no DQ de ABL1. Em amarelo ao final do gráfico é observado o período pós transplante. B) Resultado do ensaio de clonagem da região do DQ de ABL1 seguido de sequenciamento de Sanger para as cinco amostras do paciente #7. Cada clone está representado por um círculo, sendo o círculo cinza corresponde à mutação policlonal e o círculo azul correspondente a mutação composta. Em negrito estão às mutações predominantes identificadas somente pelo sequenciamento de Sanger, em roxo são as mutações adicionais sinônimas identificadas somente após a clonagem e em vermelho são as mutações adicionais do tipo *missense*.

4.4) DISCUSSÃO

A presença de mutações compostas verdadeira vem sendo discutida, visto que esta pode ser fruto de recombinação mediada pela técnica de PCR, como mostrado por Parker e colaboradores, através da clonagem individual de mutação, em plasmídeos independentes na qual foi observada uma taxa de recombinação considerável (PARKER et al., 2014). Em nossa coorte, a alta frequência de mutações compostas e a presença junto a mutações policlonais em uma mesma amostra fez com que avaliássemos se a presença destas poderiam ser falsos positivos, por isso, baseado no estudo de Deininger e colaboradores, a taxa de falso positivo das nossas amostras foi de 5%. Sendo a amostra #3 a que apresentou a frequência de mutação composta similar a de falso positivo, tendo então uma maior probabilidade de não ser verdadeira.

Ainda, a genuinidade da presença de mutações adicionais detectadas somente após a clonagem poderia ser artefatos de PCR ou da síntese de cDNA, porém evidências que suportam a hipótese de serem mutações verdadeira seria: (i) algumas dessas mutações, como a V260A, foram identificadas em mais de um paciente; e (ii) outras, como a E255K há vastos relatos da presença desta mutação na literatura como conferindo resistência ao ITKs, (iii) a taxa de mutações silenciosas foi menor do que a esperada (dado não mostrado). No entanto, o artefato técnico nunca pode ser descartado de resultados baseados em PCR, pois um erro de replicação no início da reação será perpetuado e expandido ao longo das ciclagem de amplificação.

A hierarquia de aparecimento ou mesmo o perfil mutacional em pacientes tratados sequencialmente com dasatinibe e nilotinibe ou ambos ITK após a falha ao imatinibe reflete a exposição a um determinado medicamento. Por exemplo, foi observado que pacientes tratados com dasatinibe, apresentaram a alteração F317L ou E255K, mutações conhecidas por conferirem resistência clínica a este inibidor (BRANFORD; MELO; HUGHES, 2009; O'HARE et al., 2005; REDAELLI et al., 2009). Embora haja controversa na literatura tanto sobre a resistência conferida pela mutação F317L (JABBOUR et al., 2008; ESKAZAN; SOYSAL, 2016), quanto pela E255K (HOCHHAUS et al., 2008a; MULLER et al., 2009). Para os pacientes tratados com nilotinibe, pelo menos um componente do perfil mutacional foi associado à resistência clínica ou *in vitro* (F359V/I) (BARAŃSKA et al., 2008; HUGHES et

al., 2009; O'HARE et al., 2005; REDAELLI et al., 2009; SERPA et al., 2012; SOVERINI et al., 2009). A presença da mutação F359V, além de ter sido mostrado que confere resistência ao nilotinibe, um estudo recente mostrou que pacientes portadores desta alteração, que falharam a terapia com imatinibe e nilotinibe, apresentaram uma maior probabilidade de desenvolver novas mutações que venham a conferir resistência ao dasatinibe quando comparado com pacientes com outras mutações (JIANG et al., 2015).

A mutação A397P é pouco descrita na literatura, esta alteração foi identificada em paciente diagnosticado em FA, após 25 meses de tratamento com imatinibe sem nunca alcançar a RCgC (QIN et al., 2011). Outro estudo reportou esta alteração em um paciente em FC que evoluiu para FA após 30 meses de terapia com imatinibe, porém vale ressaltar que a terapia foi iniciada tardiamente, 20 meses após o diagnóstico, um fator que pode ter agravado a doença e não associado diretamente a presença da mutação (GRUBER et al., 2012). Outro estudo com 125 pacientes com LMC da malásia que falharam a terapia ao imatinibe, a mutação A397P foi reportada em um único paciente (ELIAS et al., 2014). Assim como a anterior, a V268M também é pouco descrita na literatura, tendo sido reportada previamente pelo nosso grupo em pacientes que falharam ao imatinibe (BITENCOURT; ZALCBERG; LOURO, 2011).

As mutações L248M, G250E, E275K, M351T, E355G, H396R e E450G também já foram reportadas conferindo resistência ao imatinibe, por estudos tanto *in vitro*, como em pacientes (O'HARE et al., 2005; BRANFORD, 2003; HOCHHAUS et al., 2002; BRANFORD et al., 2003; CHAHARDOULI et al., 2013; SHERBENOU et al., 2010). As mutações G250E e E275K além de conferirem resistência ao imatinibe também já foram relatadas como insensíveis ao nilotinibe (HUGHES et al., 2009; SOVERINI et al., 2014). Estudos *in vitro* mostraram que a M351T possui um baixo nível de insensibilidade ao imatinibe (REDAELLI et al., 2008) e supõe-se que clones portadores dessa alteração são selecionados pela exposição ao fármaco. Baseado nisso, um estudo asiático mostrou que na nesta população a mutação M351T é incomum e provavelmente, segundo os autores, a explicação seria porque a concentração do imatinibe em asiáticos é mais alta do que em caucasianos, o que levaria a supressão dessa mutação insensível a níveis baixos ao inibidor, mas não a de mutações insensíveis, a níveis mais altos da

droga (ANG et al., 2008). No estudo com uma coorte da Malásia, essa baixa frequência foi corroborada, sendo reportada em 1,6% dos pacientes (2/125) (ELIAS et al., 2012). Estudos brasileiros esta foi reportada em um paciente que falhou ao imatinibe que progrediu para uma fase acelerada (RIBEIRO et al., 2015) e em um estudo da América Latina, a M351T, foi identificada em 6% (8/144) dos pacientes que falharam ao imatinibe, 2,3% (1/44) dos pacientes que falharam ao dasatinibe e em 4,7% (1/21) dos pacientes ao nilotinibe (PAGNANO et al., 2015).

A maioria das mutações adicionais de troca de sentido detectadas junto as mutações predominantes e estavam localizadas em resíduos não associados anteriormente à resistência, sugerindo que estas são mutações *passengers* (passageiras) que não conferiram nenhuma vantagem ou aumento de resistência a ITKs, fruto talvez da instabilidade genética. A quantidade desproporcional de mutações sinônimas no estudo de Khorashad aumentou em um número significativamente além da expectativa calculada, sugerindo que mutações *missense* adicionais sejam mal toleradas pela quinase (APPERLEY, 2007a; BRADEEN, 2006; BRANFORD et al., 2003). A mesma relação não foi observada neste estudo, talvez devido a uma menor quantidade de mutações sinônimas identificadas.

Apesar da complexidade mutacional observada neste estudo, devido ao limitado número de amostras sequenciais, não foi possível fazer uma associação direta entre a presença de mutação e evolução clínica. Um ponto importante seria poder avaliar se a presença de múltiplas mutações estaria correlacionada a um maior risco de desenvolver novas mutações, só detectadas com técnicas de alta sensibilidade (somente após a clonagem). Khorashad e colaboradores (KHORASHAD et al., 2013) concluíram em estudo similar que não foi identificada diferença estatisticamente significativa na prevalência de mutações únicas ou múltiplas de baixo nível em pacientes com uma única predominante mutação (3/12; 25%) em relação ao grupo de pacientes com duas ou mais mutações predominantes detectáveis por sequenciamento direto (15/47; 32%; $p = 0,74$).

A associação entre a importância clínica dessas alterações e a presença de mutações detectadas em baixo nível foi avaliada em alguns estudos, como Parker e colaboradores que demonstraram uma clara associação entre a

presença de mutações múltiplas não identificadas pelas metodologias padrão de *screening* (no estudo DHPLC) e um pior prognóstico clínico (PARKER et al., 2012). Soverini e colaboradores corroboram os dados, utilizando o sequenciamento de próxima geração (NGS), mostrando a complexidade das mutações no DQ em níveis não detectados pelas metodologias usuais (SOVERINI et al., 2013). Outro estudo mais recente mostrou que a detecção precoce de mutações em baixos níveis por NGS antecipou em 3 meses, em 45% dos pacientes analisados, quando comparado com os resultados de sequenciamento de Sanger. Foi sugerido que o uso de técnicas como o NGS poderiam conferir uma janela terapêutica para o tratamento de pacientes resistentes (SOVERINI et al., 2016). Mas, o uso destas metodologias mais sensíveis e sua importância clínica ainda não são unânime (MULLER, 2013) sendo o sequenciamento de Sanger ainda a metodologia de escolha, nesse momento (BACCARANI; SOVERINI; DE BENEDITTIS, 2014).

5) Parte III – Mecanismos de resistência *BCR-ABL1* independente e progressão da doença

A presença de mutação no domínio quinase do gene *ABL1* abordada na Parte II é um mecanismo *BCR-ABL1* dependente, que não explica todos os casos de resistência ou progressão na doença. Na Parte III, será abordada a pesquisa de mutações em outros genes que não *BCR-ABL1* (esse conceito será chamado ao longo dessa seção de mutações *BCR-ABL1* independentes), e o impacto dessas mutações na progressão da doença.

5.1) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a presença de mutações *BCR-ABL1* independentes em pacientes com LMC que progrediram para fase acelerada ou crise blástica e que não possuem mutação no domínio quinase do gene *ABL1* através de sequenciamento de próxima geração (NGS) alvo dirigido .

5.2) METODOLOGIA

5.2.1) Pacientes

A mesma coorte descrita na Parte I foi utilizada como ponto de partida para a elaboração desse estudo. Foram incluídas amostras do período de julho de 2011 a julho de 2017 provenientes do Serviço de Hematologia do INCA, de pacientes com LMC que progrediram para FA ou CB. Os critérios para inclusão foram: mais de 12 meses de acompanhamento após o início da terapia e ausência de mutação no DQ de ABL1. Duas abordagens foram realizadas, na primeira foram utilizadas amostras pareadas pré (FC) e pós-progressão (FA/CB). Na segunda somente as amostras da FA ou CB foram analisadas (Figura 5.1).

Esse estudo obedeceu às diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Res. nº 196/1996) de acordo com o projeto no Comitê de Ética em Pesquisa do INCA de número 129/12 (Anexo II).

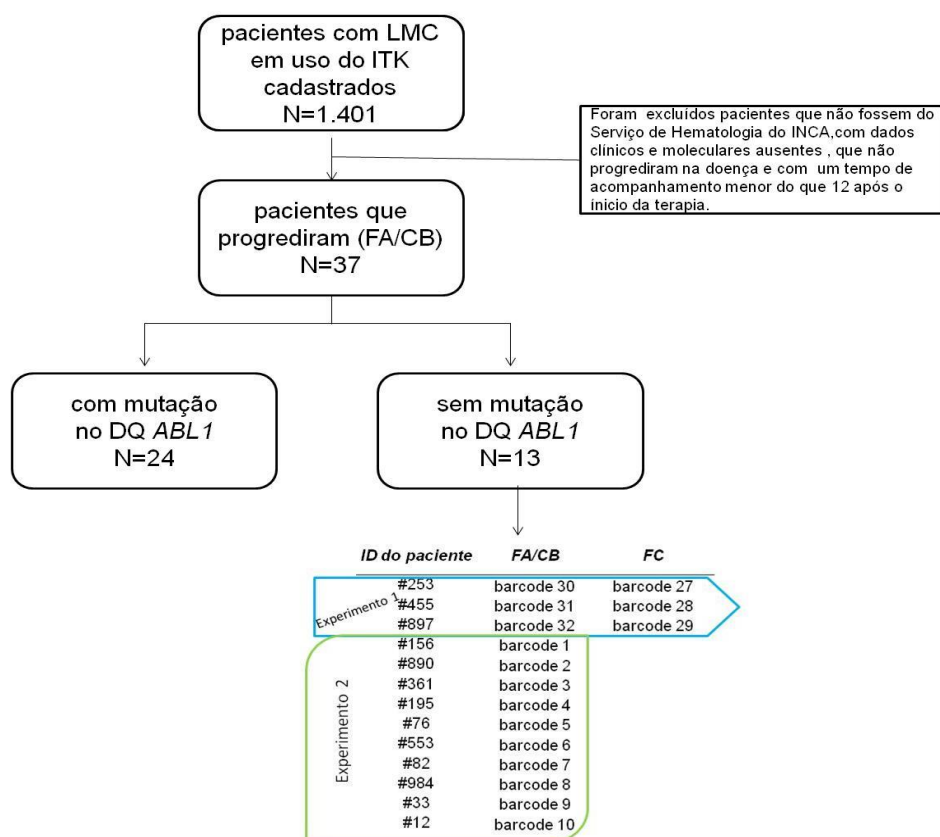


Figura 5.1: Desenho de estudo. Esse quadro representa o critério de exclusão dos pacientes e as amostras selecionadas em cada experimento foram: (i) ausência de seguimento clínico; (ii) ausência de progressão; (iii) seguimento menor de 12 meses. Entre as 37 amostras de pacientes que progrediram para uma fase acelerada (FA) ou crise blástica (CB) foram analisadas somente as amostras sem mutação no DQ de ABL1.

5.2.2) Método

Para a realização do NGS as seguintes etapas foram realizadas: (1) extração do DNA; (2) construção da biblioteca a partir do DNA alvo; (3) imobilização dos fragmentos de DNA em uma esfera magnética; (4) amplificação do produto imobilizado pela técnica de PCR em emulsão e enriquecimento do produto de PCR em emulsão; (5) carregamento das esferas enriquecidas no chip semiconductor; (6) sequenciamento do DNA e processamento dos dados da corrida no servidor IonTorrent Browser; e (7) análise dos dados de sequenciamento, através da chamada de variante, avaliação das variantes e interpretação biológica no programa IonReporter (Figura 5.2).

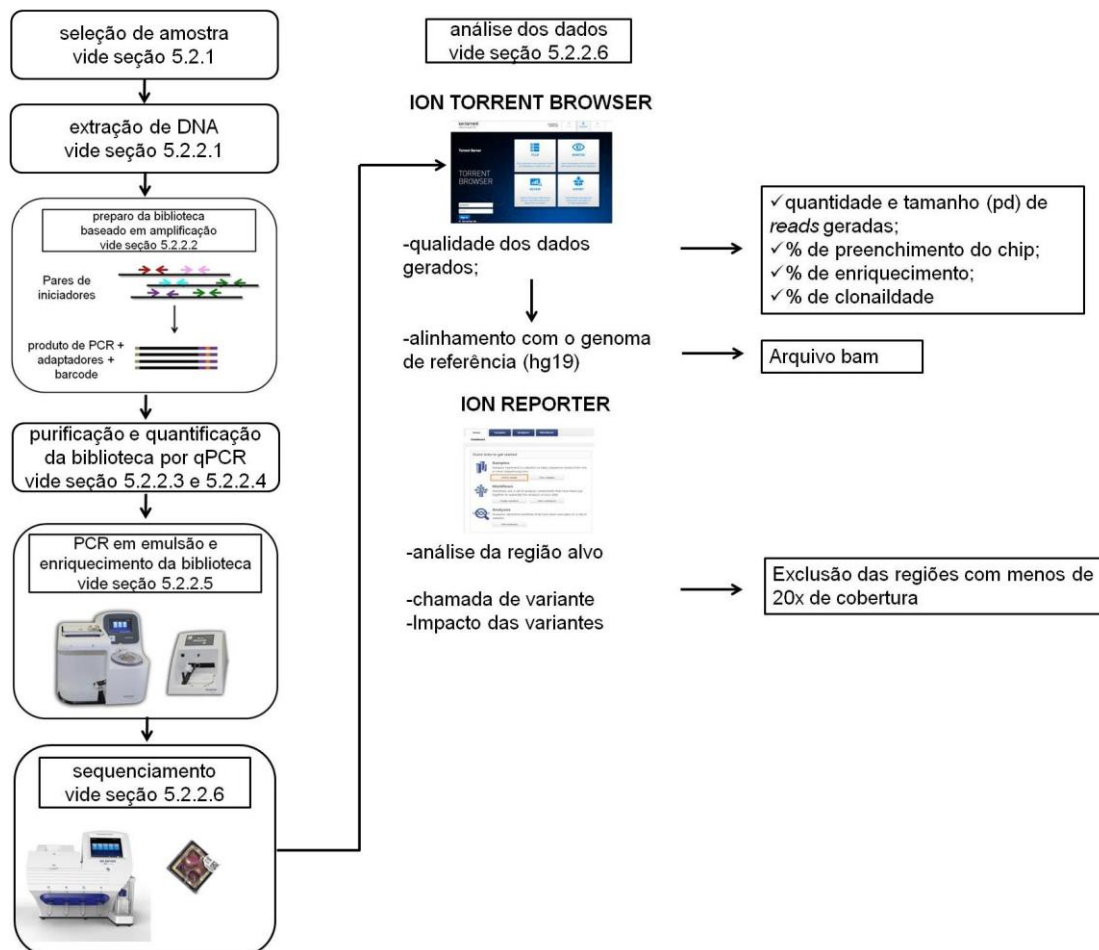


Figura 5.2: Desenho experimental. Fluxograma das metodologias utilizadas desde a seleção das amostras até o sequenciamento em um painel alvo dirigido pela técnica de sequenciamento de próxima geração (lado esquerdo da figura); e a análise do resultado gerado (lado direito da figura) através de ferramentas de bioinformática. Processamento dos dados brutos até a interpretação biológica das variantes identificadas.

5.2.2.1) Extração de DNA a partir do Trizol®

Para cada 250µL de amostra foi adicionado 750µL de Trizol (8×10^6 células). Após centrifugação a 14.000rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, eliminando assim o RNA da solução e preservando a fase de interfase, onde está o DNA. O DNA foi precipitado com 300µL (para cada 1mL de fase aquosa) de etanol absoluto gelado por inversão durante 3 minutos e a solução foi centrifugada a 14.000rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado por três vezes com 1mL de citrato de sódio a 0,1M. Entre cada lavagem foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos e novamente centrifugado a 12.000rpm por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado e lavado com 1mL de etanol 75% e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida centrifugado a 12.000rpm por 5 minutos a 4°C e o precipitado foi incubado até secar e solubilizado em 8mM de NaOH (normalmente, 300-600µL de NaOH 8mM por $1,0 \times 10^7$ células) e após 24h, neutralizado com HEPES 1M (4,2µL HEPES a cada 100µL de NaOH 8mM). A pureza do DNA extraído foi avaliado no Nanodrop® e quantificado no Qubit® através do kit Qubit dsDNA HS Assay® (0,2-100ng) de acordo com as recomendações do fabricante e armazenado a uma temperatura de -20°C.

5.2.2.2) Construção da biblioteca

O preparo da biblioteca foi baseado em amplificação, ou seja, os pares de iniciadores foram sintetizados comercialmente pela empresa ThermoFisher™, abrangendo horizontalmente todos os éxons, e regiões adjacentes (15-20 pb da região intrônica) dos 36 genes de interesse (Tabela 5.1). Esses oligos foram customizados durante a dissertação de mestrado do aluno Diego Coutinho (COUTINHO, 2014) e compreenderam dois *mix* de iniciadores, o primeiro com 555 pares de iniciadores e o segundo com 544, totalizando 1.099 iniciadores divididos em dois tubos.

Tabela 5.1: Representação dos 36 genes analisados no painel alvo dirigido por sequenciamento de próxima geração discriminado por suas atividades biológicas.

Atividade biológica	Genes
Regulação epigenética	<i>ASXL1 / IDH1 / IDH2 / EZH2 / DNMT3A / TET2 / SUZ12 / MLL / UTX</i>
Transdutores e reguladores de vias de sinalização	<i>CBL / AKT1 / JAK2 / MPL / KIT / FLT3 / NPM1 / BAP1 / PTEN / TP53 / KRAS / NRAS / HRAS / PTPN11 / NOTCH1</i>
Spliceosoma	<i>U2AF1 / ZRSR2 / SRSF2 / SF3B1</i>
Fatores transcricionais	<i>ATRX / RUNX1 / BCOR / CEBPA / WT1 / ETV6 / CUX1 / PHF6</i>

As amostras de DNA quantificadas pelo Qubit foram normalizadas a 12ng em um volume final de 3µL para a obtenção da concentração desejada (4ng de DNA/µL). Como havia dois mix de iniciadores, os reagentes a seguir foram adicionados para cada mix de iniciadores individualmente: 2µL do 5x *IonAmpliSeq™ HiFi mix*; 5µL do 2x *IonAmpliSeq™ Primer Pool* (A ou B); 3µL do DNA (a 12ng/µL). A reação foi repetidamente homogeneizada com a pipeta e levada ao termociclador submetida ao seguinte perfil térmico: 99°C por 2 minutos; 16 ciclos de 99°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, e extensão final de 60°C por 4 minutos com incubação final de 10°C até 12 horas, e posterior incubação até o uso a -20°C.

Após a ciclagem, a solução foi brevemente centrifugada para que o volume não ficasse aderido na parede ou na tampa dos tubos. Em seguida, os

mix de iniciadores A e B foram misturados em um único tubo de 0,2mL (volume final = 20 μ L) e a solução foi homogeneizada com a pipeta. Posteriormente, foi adicionado 2 μ L (10% do volume final do tubo) da enzima FuPa e a reação foi incubada a uma temperatura de 50°C por 10 minutos; 55°C por 10 minutos e 60°C por 20 minutos. A incubação final foi de 10°C até 1 hora.

Os adaptadores e barcodes foram ligados individualmente para cada amostra, sendo adicionados: 0,5 μ L do *IonP1 Adapter*; 4 μ L da *Switch Solution*; 2 μ L da DNA ligase; 1 μ L de água sem nuclease e 0,5 μ L do *Ion Xpress Barcode X* (x = refere-se ao número do *barcode*, este é específico para cada amostra); (volume final da reação: 30 μ L). Homogeneizar a solução com a pipeta e levar ao termociclador com o seguinte programa: 22°C por 30 minutos, 72°C por 10 minutos e incubação final de 10°C por até 12 horas, mais do que isso, manter a uma temperatura de -20°C.

5.2.2.3) Purificação da biblioteca genômica

O volume da reação (30 μ L) da etapa anterior foi transferido para um tubo do tipo LoBind™ devidamente identificado e foi adicionado 45 μ L do reagente Agencourt® AMPure® XP à temperatura ambiente (=1,5x o volume da reação inicial) em cada biblioteca. A reação foi repetidamente homogeneizada até a cor da solução ficasse homogênea e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram colocados em uma estante magnética e incubados por 2 minutos (até que a solução ficasse transparente). Cuidadosamente, sem que o tubo fosse retirado da estante, o sobrenadante foi descartado com a pipeta, preservando o precipitado preso à parede do tubo. Foi adicionado 150 μ L de uma solução recém-preparada de etanol a 70% (230 μ L de etanol absoluto + 100 μ L de água sem nuclease / amostra) na direção do precipitado preso à parede do tubo. Sem que o tubo fosse retirado da estante e com muito cuidado, este foi girado a 180°C de maneira que o precipitado passasse pelo meio da solução de etanol 70% sendo atraído magneticamente, ficando preso no lado contrário ao tubo. Este passo repetido mais uma vez. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com a pipeta, sem encostar no precipitado e a etapa de lavagem com o etanol a 70% descrita anteriormente foi repetida. Após a retirada completa do etanol 70% com a

pipeta, os tubos foram mantidos abertos na estante magnética por 3 minutos, até que o precipitado estivesse totalmente seco, mas não ressecado. Finalmente, o tubo foi retirado da estante magnética e o precipitado foi efluído com 50µL de LowTE. Este foi adicionado na direção do precipitado e a solução foi repetidamente homogeneizada com a pipeta e incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Novamente os tubos foram levados a estante magnética, incubados por 2 minutos e com a solução límpida, sem encostar no precipitado, o sobrenadante foi transferido para um tubo (1,5mL) devidamente identificado.

5.2.2.4) Quantificação da biblioteca purificada por PCR em tempo real (qPCR)

Para a etapa de quantificação por qPCR foi utilizado o *IonLibrary Quantification kit*. O DNA controle (*Escherichia coli* DH10B), com valor de massa conhecido, para a construção da curva de padrão vem em uma concentração estoque de 68 pM. Este foi diluído em três concentrações de 1:10 a partir do DNA estoque: 1:10 (6,8 pM), sendo 3µL do DNA a 68pM + 27µL de água sem nuclease; 1:10 (0,68pM), sendo 3µL do DNA a 0,68pM + 27µL de água sem nuclease e 1:10 (0,068pM), sendo 3µL do DNA a 0,68pM + 27µL de água sem nuclease. Enquanto que as bibliotecas purificadas foram diluídas em uma razão de: 1:100 (2µL da biblioteca + 198µL de água sem nuclease) e 1:200 (1µL da biblioteca + 198µL de água sem nuclease).

Os controles da curva padrão e as amostras foram analisados em duplicata e desvio padrões maiores do que 0,5 entre o C_q de cada duplicata foram descartados e a amostra repetida, assim como os valores fora da curva padrão.

A solução foi preparada, para cada controle ou amostra (já incluindo a duplicata) com 10µL 2x TaqMan Master mix; 1µL de 20x IonTaqMan Assay (iniciadores e sondas); 9µL do DNA diluído (controle ou amostra). O volume final de 20µL foi aplicado em poços individuais de uma placa com 96 poços. Após uma breve centrifugação a placa foi levada ao termociclador (Vii7, ThermoFisher) e foi seguido o programa no módulo FAST de 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 20 segundos. Os fluoróforos utilizados foram: ROX como referência passiva e FAM/MGB para repórter/quencher da sonda.

Ao final foi considerado o valor médio das replicatas nas duas diluições e todas as bibliotecas foram diluídas a uma concentração de 100pM (volume final de 10 μ L) para serem utilizadas na próxima etapa.

5.2.2.5) Reação de PCR em emulsão e enriquecimento da biblioteca

Foi utilizado o *IonPGM Hi-Q OT2 kit*. O *IonPGM Hi-Q Reagent mix* foi totalmente descongelado antes do uso, enquanto que a enzima (*Ion PGM Hi-Q Enzyme mix*) foi mantida no gelo até o uso e o *IonPGM Hi-Q ISP* foi vortexado por 1 minuto em velocidade máxima e antes do uso brevemente vortexado, para que as esferas estivessem em suspensão na solução no momento do uso. Em um único tubo LoBind foram adicionados 5 μ L das bibliotecas diluídas a 100pM e repetidamente homogeneizados; desse tubo, foi transferido 2 μ L para um novo tubo e adicionado 23 μ L de água sem nuclease que vem junto ao kit (volume final 25 μ L). Dentro do tubo O *IonPGM Hi-Q Reagent mix* totalmente descongelado foram adicionados os seguintes reagentes na ordem: 25 μ L de água sem nuclease; 50 μ L da *Ion PGM Hi-Q Enzyme mix*; 25 μ L da solução recém diluídas (2 μ L de todas as bibliotecas + 23 μ L de água sem nuclease) e 100 μ L do *IonPGM Hi-Q ISP*. Esta solução (1000 μ L de volume final) foi vigorosamente homogeneizada e transferida para o *Ion OneTouch Reaction Filter* e posteriormente, neste mesmo filtro foram adicionados 850 μ L do *Ion OneTouch Reaction Oil*, descartada a pipeta utilizada e foram adicionados mais 850 μ L do *Ion OneTouch Reaction Oil*. As etapas seguintes foram seguidas conforme recomendações do fabricante. Ao final da reação de PCR em emulsão, as amostras foram e enriquecidas no equipamento *Ion OneTouch2 ES*, também conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. O volume ao final desta reação foi 100 μ L.

5.2.2.6) Reação de Sequenciamento

Foi utilizado o *IonPGM Hi-Q Sequencing kit* e toda a etapa de inicialização do equipamento foi seguida conforme orientação do fabricante. Após a de enriquecimento foram adicionados (neste mesmo tubo com a biblioteca enriquecida) 5 μ L do *Control Ion Sphere Particles* (vortexado antes do uso) e a solução foi repetidamente homogeneizada e centrifugada a 15.500 g

por 2 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado (com a utilização de uma pipeta), restando aproximadamente 15µL do volume no tubo (um tubo como referência foi utilizado). Em seguida, foram adicionados 12µL do *Sequencing Primer* na solução (volume final = 27µL) e a solução foi repetidamente homogeneizada e levada ao termociclador e seguinte programa foi seguido: 95°C por 2 minutos e 37°C por 2 minutos. Ao final do termociclador a etapa de *ChipCheck* foi realizada conforme orientação do fabricante. Com o chip pronto foram adicionados 3µL da *Ion PGM HiQ Sequencing Polymerase* na solução de anteriormente preparada (biblioteca enriquecida + iniciadores). O volume final foi de 30µL. Como foi utilizado o Ion 316 chip para os dois ensaios, o volume total foi adicionado no chip, novamente conforme orientação do fabricante. A corrida foi planejada no *Torrent Browser* dentro do *Torrent Server*.

5.2.2.6) Análise dos dados

Em um primeiro momento a qualidade dos dados gerados foi avaliada levando-se em consideração:

- tamando dos fragmentos de DNA (*reads*) gerados - para o desenho proposto, o tamanho médio esperado dos fragmentos é de 146pb (64 – 190pb);
- escore de alinhamento - AQ Score / Alignment Quality Score – é definido pela acurácia quando comparada a sequência referência. A discrepância observada pode ser biológica (uma variante real) ou técnica (erro de sequência). Os AQ20 representam 1% de erro de alinhamento quando comparado à sequência referência.
- % clonalidade - sendo esta definida como a porcentagem de esferas carregadas com mais de uma molécula de DNA, estas não são consideradas na análise (% policlonal aceitável deve variar de 15 a 30%);
- profundidade média de cobertura – cobertura vertical refere-se ao número de vezes, em média, que o fragmento do DNA (*read*) foi sequenciado e alinhado ao fragmento alvo (valor mínimo aceitável 100x);
- uniformidade da amostra – espera-se que esta seja o mais perto de 100%, para este estudo, consideramos somente as amostras com valores >90%. Refere-se a uma cobertura horizontal da região genômica de interesse.

Uma vez a qualidade dos dados foi satisfatória, as próximas etapas foram: (1) alinhamento de leitura (*read alignment*); (2) chamada de variante (*base calling*); (3) identificação de variante (*variant identification*) e (4) anotação de variante (*variant annotation*). O número absoluto total de variantes foi identificado e estas foram primeiramente classificadas quanto à localização: *íntron*, *éxon*, *splice*, UTR – regiões não traduzidas, do inglês, *untranslated region*. Sendo as variantes intrônicas não incluídas na análise. Em seguida, as variantes localizadas nos éxon, em regiões de *splice* e em UTR, foram classificadas por tipo: SNVs (alterações únicas do nucleotídeo; do inglês *single nucleotide variants*), indels (pequenas inserções e deleções), segundo as recomendações internacionais para interpretar e reportar variantes em câncer (LI et al., 2017). Para este estudo, além das variantes SNV e indels, algumas variantes foram classificadas como MNVs (variantes envolvendo múltiplos nucleotídeos, do inglês *multiple-nucleotide variants*), que são variantes que envolvem mais de um nucleotídeo. Entre as variantes exônicas, estas foram classificadas por tipo e consequência funcional (sinônima, *missense* e *nonsense* e *frameshift*) (Figura 5.3).

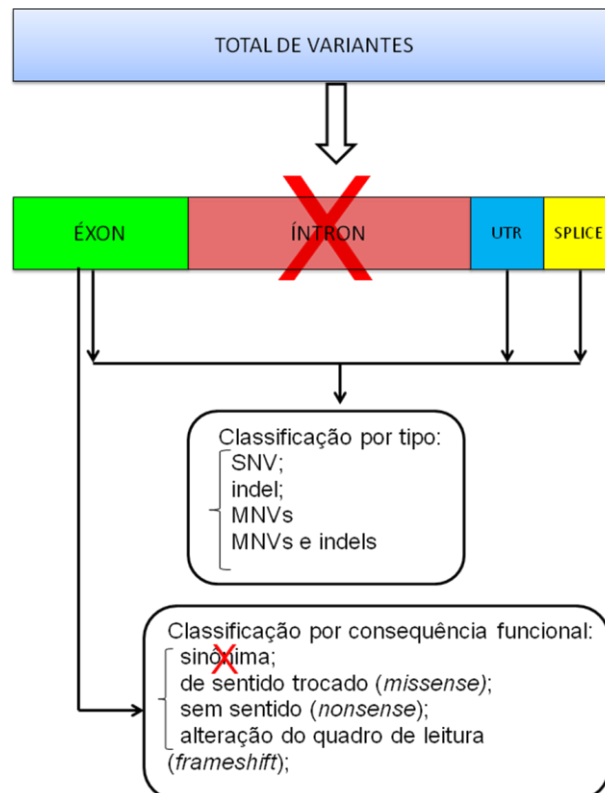


Figura 5.3: Critérios de exclusão de variantes para posterior avaliação do impacto biológico.

Após excluirmos as variantes intrônicas e sinônimas, foram utilizados os critérios a seguir para avaliar o impacto biológico e considerar uma variante como mutação com efeito deletério na função gênica (ON BEHALF OF THE ACMG LABORATORY QUALITY ASSURANCE COMMITTEE et al., 2015; THE NGS IN PPGL (NGSNPPGL) STUDY GROUP et al., 2017).

a) Tipo da variante – variantes que acarretam em alteração na função proteica possuem uma maior probabilidade de causarem dano, como variantes que gerem um códon de parada prematuro, deleção de éxons inteiros, regiões de *splicing*, entre outros.

b) Presença nas bases populacionais - A frequência populacional de uma variante pode ser encontrada em bases de dados do tipo: dbSNP, *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), *Exome Variant Server* e *1000 Genomes*. Sendo que variantes raras, com frequências <1% possuem maior probabilidade de serem mutações, enquanto que $\geq 1\%$ é o limiar estabelecido para que uma variante seja considerada polimorfismo. Vale ressaltar que estas bases não incluem somente indivíduos saudáveis, por isso, a presença de variantes patogênicas não está totalmente excluída.

c) Descrição da variante em bases doença ou gene específicas – as bases utilizadas foram: *ClinVar*, *COSMIC*, *Ensembl*, *GeneCard*, NCBI e a comparação com os resultados de amostras sequenciadas em nosso laboratório, para outras neoplasias, pelo mesmo painel. Visto que nem todas as bases são curadas a simples presença da variante em uma dessas bases não deve ser o único critério para considerá-la como mutação.

d) Dados da literatura – identificação desta variante em artigos publicados em revistas conceituadas que as associem ou a doença a indivíduos saudáveis.

e) Dados funcionais na literatura e programas com predições *in silico* da variante – foram avaliados os programas SIFT, PolyPhen2 e MutationTaster para variantes *missense* e Splice Site Finder Like para predições de *splicing*.

5.2.3) Análise estatística

O teste t bicaudal foi utilizado para comparar a idade ao diagnóstico dos pacientes que permaneceram na FC e dos que progrediram para FA ou CB.

O teste de exato de Fisher foi utilizado para avaliar o valor prognóstico da % de transcritos aos 3 e 12 meses, sendo $p < 0,05$ considerado significativo. A curva de Kaplan Meier foi utilizada para avaliar sobrevida livre de progressão e sobrevida global. O programa utilizado foi o GraphPad Prism v5.0.

5.3) RESULTADOS

A primeira análise foi o desempenho da corrida e a qualidade dos dados gerados na plataforma de sequenciamento Ion Torrent (PGM). Os experimentos foram realizados em chip de 316 (este gera aproximadamente 2-3 milhões de fragmentos/corrída). A porcentagem de esferas policlonais de: 19% e 29% foi obtido com um rendimento de: 2.955.426 e 1.082639 de fragmentos de DNA, nos dois experimentos lançados. O tamanho médio dos fragmentos gerados foi de 147 e 152pb.

A análise por amostra mostrou que a média dos fragmentos mapeados no genoma de referência foi de 145.834, sendo que a média dos que foram alinhados dentro do gene esperado (*on target*) foi de 94,2% (variando de 74,30 a 96,95%). A profundidade média observada foi de 119,4, variando de 102,3 a 177,9 e a uniformidade foi de 95,7% (variando de 91,2 a 97,0%) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Parâmetros da qualidade dos dados gerados por amostra em cada sequenciamento de próxima geração.

	Barcode ID	ID da amostra	Fragmentos mapeados	No alvo on target	Profundidade média	Uniformidade
Experimento1	27	#253 – FC	177.756	95,0%	142,6	93,1%
	28	#253 – FA	163.038	94,8%	133,0	96,4%
	29	#455 – FC	233.867	90,0%	110,3	92,9%
	30	#455 - FA	218.093	94,0%	177,9	95,9%
	31	#897 – FC	255.179	74,3%	156,1	91,2%
	32	#897 – CB	230.433	93,0%	131,5	95,0%
Experimento2	1	#156	117.938	97,3%	109,9	96,9%
	2	#890	126.738	96,5%	106,4	96,3%
	3	#361	121.322	97,0%	102,9	97,0%
	4	#195	121.251	96,5%	102,3	96,7%
	5	#76	115.147	96,6%	106,9	96,3%
	6	#553	92.808	96,2%	108,5	96,1%
	7	#82	98.865	96,8%	103,5	96,9%
	8	#984	79.599	96,5%	107,1	96,6%
	9	#33	81.419	96,6%	108,6	96,6%
	10	#12	99.893	96,6%	104,3	96,8%
		Média	145.834	94,2%	119,4	95,7%

Cobertura das regiões alvo

A metodologia por amplificação possui um viés de sequenciamento heterogêneo dos fragmentos, visando uma compreensão do painel estudado e conhecimento das regiões sequenciadas, a cobertura horizontal de cada região amplificada (*amplicon*) foi analisada levando em conta a profundidade de cobertura (cobertura vertical) de cada fragmento que compõe o gene de interesse. Foi observado que entre os 1.099 fragmentos gerados pelo painel alvo específico, para cobrir os 36 genes desejados, apenas cinco fragmentos não foram sequenciados em nenhuma amostra: região genômica 44.732.703 a 44.732.859 do cromossomo X, gene *UTX*; 101.460.857 a 101.460.968 do cromossomo 7, gene *CUX1*; 33.793.059 a 33.793.219 do cromossomo 19, gene *CEBPA*; 90.628.459 a 90.628.630, cromossomo 15, gene *IDH2* e região 101.923.278 a 101.923.449 do cromossomo 7, gene *CUX1*. Enquanto que as regiões de baixa cobertura foram: *BAP1*, *HRAS*, *SRSF2*, *ATRX* e *KIT*, variando de 10 a 19 a cobertura vertical desses fragmentos. Foram observadas regiões com excelentes coberturas, como as: regiões genômicas: 118.369.162 a 118.369.239, do cromossomo 11, do gene *MLL*; 28.610.081 a 28.610.184, do cromossomo 13, do gene *FLT3*; 139.404.316 a 139.404.423, do cromossomo 9, do gene *NOTCH1*; 118.380.659 a 118.380.731, cromossomo 11 do gene *MLL*; 115.252.147 a 115.252.222 do cromossomo 1 do gene *NRAS* (Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Identificação dos fragmentos com menor e maior cobertura vertical do painel alvo específico sequenciados.

Cromossomo	Início do fragmento	Final do fragmento	Tamanho (pb)	Gene	%GC
<i>Fragmentos com menor cobertura</i>					
chrX	44.732.703	44.732.859	156	<i>UTX</i>	68,6
chr7	101.460.857	101.460.968	111	<i>CUX1</i>	66,7
chr19	33.793.059	33.793.219	160	<i>CEBPA</i>	68,2
chr15	90.628.459	90.628.630	171	<i>IDH2</i>	65,8
chr7	101.923.278	101.923.449	171	<i>CUX1</i>	68,3
chr3	52.436.287	52.436.456	169	<i>BAP1</i>	66,9
chr11	533.253	533.425	172	<i>HRAS</i>	62,1
chr17	74.732.880	74.733.061	181	<i>SRSF2</i>	66,3
chrX	76.814.285	76.814.409	124	<i>ATRX</i>	61,4
chr4	55.524.139	55.524.283	144	<i>KIT</i>	69,3
MÉDIA			156		66,4

continua

continuação

Cromossomo	Início do fragmento	Final do fragmento	Tamanho (pb)	Gene	%GC
<i>Fragmentos com maior cobertura</i>					
chr11	118.369.162	118.369.239	77	<i>MLL</i>	42,9
chr13	28.610.081	28.610.184	103	<i>FLT3</i>	43,5
chr9	139.404.316	139.404.423	107	<i>NOTCH1</i>	44,7
chr11	118.380.659	118.380.731	72	<i>MLL</i>	42,1
chr1	115.252.147	115.252.222	75	<i>NRAS</i>	47,6
chr3	524.37.673	52.437.775	102	<i>BAP1</i>	41,9
chr2	25.459.765	25.459.913	148	<i>DNMT3A</i>	42,1
chr11	118.344.622	118.344.696	74	<i>MLL</i>	39,8
chr11	119.149.216	119.149.290	74	<i>CBL</i>	42,3
chr3	52.437.232	52.437.332	100	<i>BAP1</i>	40,1
MÉDIA			93		42,7

Uma hipótese para a diferença observada entre a cobertura vertical dos fragmentos foi o tamanho dos fragmentos e a porcentagem do conteúdo GC. Foi observado que os 10 fragmentos com menor cobertura para todas as amostras, possuíam em média o tamanho de 156pb em comparação ao tamanho de 93pb dos 10 fragmentos com maior cobertura ($p < 0,01$). Já a %GC foi de 66,4% e 42,7%, em média, nos fragmentos com menor e maior cobertura, respectivamente ($p = 0,11$).

Entre todos os 1.099 fragmentos de DNA esperados para a amplificação dos 36 genes foi observado que 61% (670/1.099) tiveram, em média, uma cobertura $>200x$ para todas as amostras analisadas; 36,6% (403/1.099) uma cobertura de 21 a 199x; 1,9% (21/1.099) uma cobertura entre 1 a 19x e em 5 fragmentos de DNA (0,5%) não foi observada amplificação (Figura 5.4). Só foram analisadas variantes com cobertura com mais de 20x de leitura.

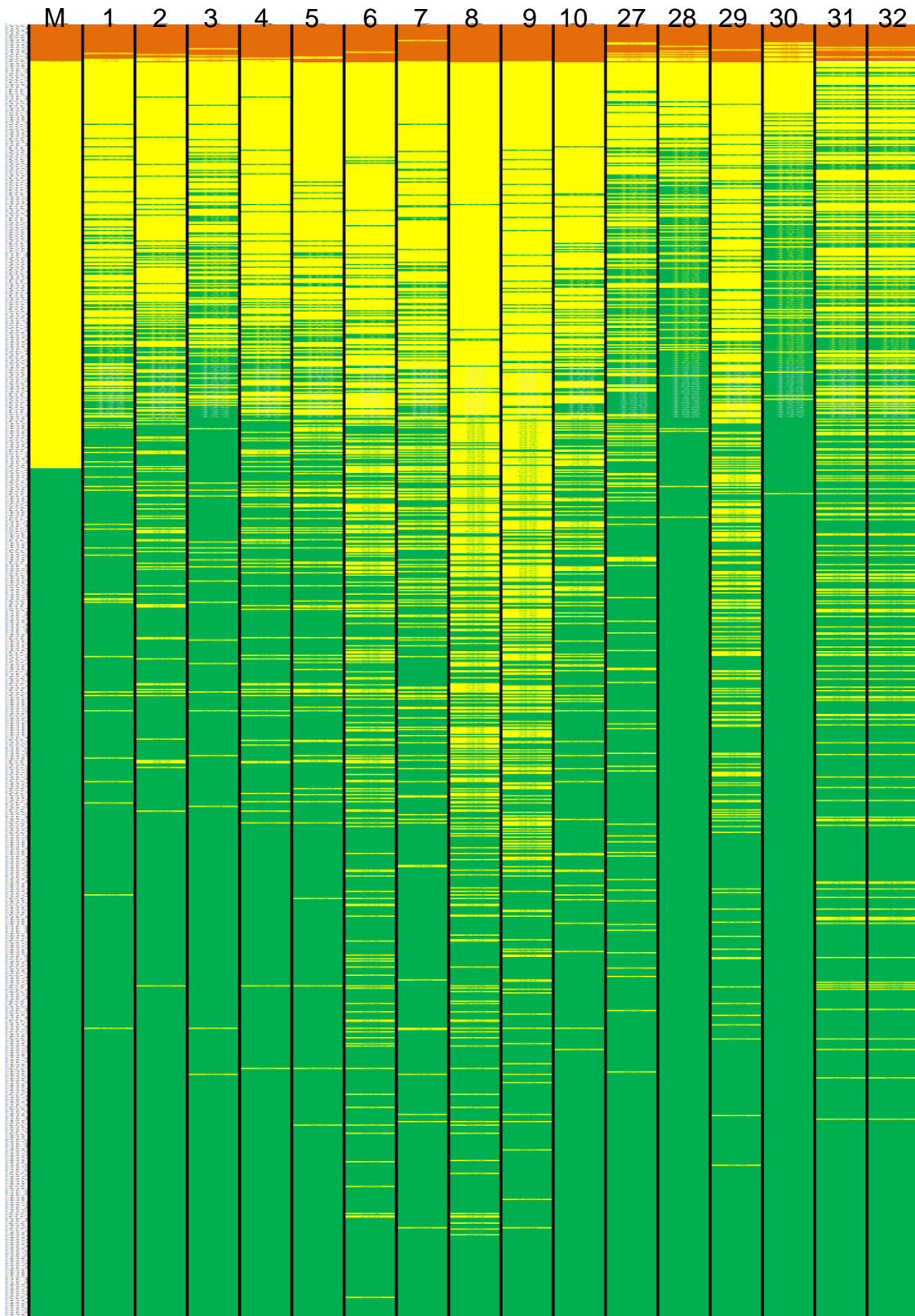


Figura 5.4: Cobertura vertical de fragmento para cada amostra. Os fragmentos, representados na figura em linhas, foram ordenados dos com menor para os de maior cobertura de acordo com a média entre as amostras em cada fragmento. Cada coluna esta representada uma amostra, sendo a primeira da esquerda para a direita a média. Legenda: M = média das coberturas dos fragmentos para cada amostra; os números representam os barcodes de cada amostra.

Análise das variantes

Após as análises da qualidade da corrida do sequenciamento e das amostras individualmente foi realizada a chamada de variantes. Ou seja, o número de variantes que diferiram da sequencia referência (hg19, Ch37). O número total de variantes identificadas pelo programa IonReporter para cada amostra variou de 40 a 167 variantes (retângulo verde escuro da figura 5.5). Em relação a classificação quanto ao tipo de variantes foram encontradas, SNV (75%), indels (21%) , MNVs (3%) MNVs + indels (1%).

Para a seleção das mutações relevantes, aquelas com maior probabilidade de ter um impacto biológico na célula, os critérios de exclusão foram seguidos sequencialmente (vide figura 5.3 da metodologia). O número total de variantes foi reduzindo após a exclusão das variantes intrônicas, restando de 21 a 68 variantes dependendo da amostra analisada (retângulo verde claro da figura 5.5). Por fim, as variantes foram classificadas pela função biológica e as sinônimas foram excluídas ficando as classificadas em: variante de sentido trocado (*missense*), variante com perda de função (*nonsense*) e variante com alteração no quadro de leitura (*frameshift*), que variaram de 12 a 36 variantes (Figura 5.5). Estas variantes foram individualmente analisadas nas bases de dados anteriormente mencionadas.

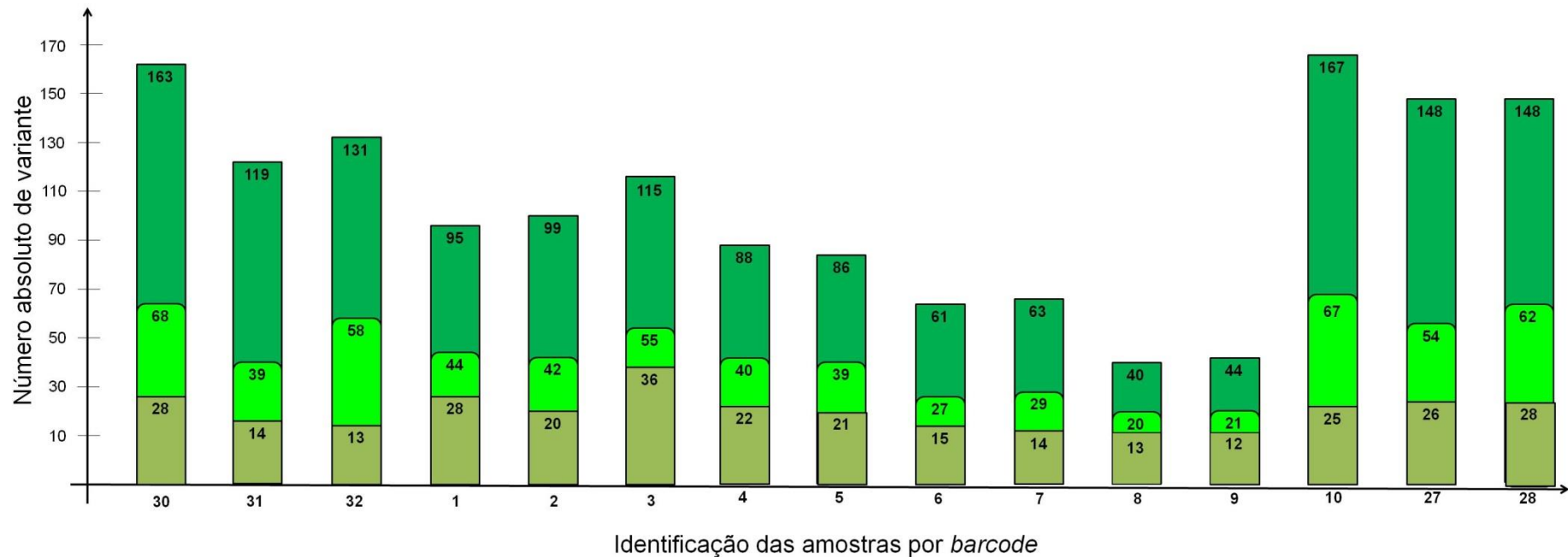


Figura 5.5: Número absoluto de variante por amostra. Todas as variantes identificadas em cada amostra esta representada no retângulo maior (verde escuro) e dentro do retângulo representa o número absoluto da variante. Após o primeiro filtro de análise foram excluídas as variantes intrônicas, sobrando as variantes exônicas, em região de *splice* e 5'UTR que correspondem ao retângulo verde claro, enquanto que o último retângulo (verde musgo) corresponde ao número total de variantes exônicas classificadas por sua consequência funcional, sendo excluídas as amostras sinônimas, restando as variante com sentido trocado (*missense*), variante com perda de função (*nonsense*) e variante com alteração no quadro de leitura (*frameshift*).

Após a aplicação do algoritmo de análise, restaram quatro variantes (mutações) em quatro pacientes diferentes, três delas identificadas em pacientes em fase acelerada. Entre as mutações observadas, três foram variantes de troca de sentido, com alteração no aminoácido e uma alterando a pauta de leitura (*frameshift*).

A mutação p.R140Q em *IDH2* foi observada em uma frequência alélica de 13% na amostra em FC e não foi detectada na amostra pós – progressão. O desfecho clínico, como óbito ou resposta a terapia com ITK foram avaliados nos 13 pacientes e foi observado que entre os três que vieram a óbito, um apresentou mutação em *ASXL1* (p.K618fs*1). Quatro pacientes retornaram a FC da doença e voltaram a responder a terapia com os 2ITK (dois fizeram uso do dasatinibe e dois do nilotinibe), voltando a alcançar a RMM, nenhum deles possuía mutação. Os outros seis pacientes continuaram a não responder a terapia e permaneceram na fase aguda da doença: dois possuíam mutação (*RUNX1*; p.R76H e *TET2*; p.S1556Y) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Identificação das mutações encontradas nas amostras pré pós – progressão para fases mais avançadas da leucemia mieloide crônica.

	Gene	alteração no nucleotídeo	alteração na proteína	
FC	<i>IDH2</i>	c.419G>A	p.Arg140Gln	p.R140Q
FA/CB	<i>RUNX1</i>	c.227 G>A	p.Arg76His	p.R76H
	<i>TET2</i>	c.4667C>A	p.Ser1556Tyr	p.S1556Y
	<i>ASXL1</i>	c.1849_1850insT	p.Lys618fs	p.K618fs*1

6) DISCUSSÃO

As metodologias de NGS são sensíveis, sendo possível a detecção de mutações em baixas sensibilidades, detectar uma célula mutada a cada 1.000 células normais. Mas o conhecimento acerca do painel utilizado é importante para que se tenha certeza de que todas as regiões de interesse estão sendo cobertas. Neste painel alvo específico, poucas (0,5%) foram as regiões gênicas não sequenciadas, logo os genes em sua maioria apresentaram uma cobertura horizontal de quase 100%, fazendo com os resultados negativos sejam apresentados com confiança de que foram analisados.

Com a utilização da plataforma NGS para 36 genes, foram observadas alterações em quatro amostras, a única mutação detectada na FC foi no gene *IDH2* e, neste mesmo paciente, na amostra em FA, não foi detectada mutação. Sugerindo que esta mutação seja passageira e não esteja diretamente relacionada a progressão da doença.

Os genes mutados foram: (i) *IDH2* que codifica uma enzima mitocondrial isocitrato desidrogenase que catalisa o isocitrato para 2-cetoglutarato via descarboxilação oxidativa no processo de redução NADPH; (ii) *RUNX1*, codificando um fator de transcrição envolvidos na geração de células-tronco hematopoiéticas e na diferenciação em linhagens mieloides e linfoides. Mutações em *RUNX1* estão associadas à perda de função gênica o que está associado à parada maturativa na diferenciação mielóide; (iii) *TET2*, a proteína codificada por este gene é uma metilcitosina dioxigenase que catalisa a conversão da metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina e está envolvida na mielopoiese, mutações do tipo perda de função em *TET2* desregulam as vias de metilação, alterações em *TET2* estão presentes em diferentes tipos de neoplasias mielóides; (iv) *AXL1* codifica uma proteína de ligação à cromatina necessária para a determinação normal da identidade do segmento no embrião em desenvolvimento. A presença desta proteína perturba a cromatina em áreas localizadas, aumentando a transcrição gênica enquanto reprime a transcrição de outros genes. As mutações neste gene estão associadas a síndromes mielodisplásicas e leucemia mielomonocítica crônica.

Os mecanismos moleculares subjacentes a progressão na LMC ainda são pouco entendidos. Alguns relatos associam a instabilidade genômica

decorrente de mecanismos insuficientes de reparo do DNA a presença de mutações adicionais, tanto no DQ da *ABL1* quanto em genes *BCR-ABL1* independentes. Estudos identificaram a presença de alterações em *ASXL1*, *TP53* e *IKZF3* em pacientes com LMC tanto na FC quanto na CB (MENEZES et al., 2013). Outros reportaram alterações em *CBL*, *TET2*, *IDH1/2* (MAKISHIMA et al., 2011). Mutações em genes associados a mecanismos epigenéticos de regulação, como *DNMT3A* e *ASXL1* também foram relatadas com papel importante para a progressão da LMC e para resistência aos ITK, independente das mutações no DQ da *ABL1* (KIM et al., 2017).

Um estudo, em camundongos, induziu coexpressão de *BCR-ABL1* com o mutante em *RUNX1*, e o resultado foi uma doença semelhante a LMC, com as características mieloblásticas que alteraram a diferenciação mielóide e induziram um fenótipo de CB nos camundongos. Os autores sugerem que mutações em *RUNX1* podem estar associadas a progressão da doença (ZHAO et al., 2012).

Soverini e colaboradores sugerem que mutações somáticas no gene *IDH2* são adquiridas no momento da progressão, pois em um estudo recente com 227 pacientes com LMC em diferentes fases da doença foi observado que mutações em *IDH2* estavam presentes somente na CB (4% dos pacientes com CB mielóide e 3,2% dos pacientes em CB linfóide) e ausente durante a FC e FA (SOVERINI et al., 2011a, p. 2).

Apesar de no presente trabalho as mutações em genes *BCR-ABL1* terem sido investigadas em uma pequena série de pacientes e em genes candidatos, os dados fornecem um maior conhecimento da frequência destas mutações em pacientes com LMC que progrediram na doença. Sendo possível observar que a maior frequência de mutações nas amostras pós-progressão quando comparada com amostras na FC, mas se estas são consequência de uma instabilidade genética ou causa de uma progressão ainda é uma questão a ser investigada.

7) CONCLUSÃO GERAL

- A padronização do ensaio de PCR em tempo real utilizado para o monitoramento molecular dos pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) em uso de inibidor tirosina quinase (ITK) mostrou-se 100% sensível e 85% específico para a detecção do *BCR-ABL1*;

- Os dados observados de resposta molecular dos pacientes com LMC em adultos em uso do ITK mostraram que uma boa parte dos pacientes (69%) atingiram uma resposta molecular compatível com respondedores ótimos;

- O valor preditivo da resposta molecular aos 3 meses após o início da terapia, assim como mostrado na literatura, também foi observado em nossa subcoorte de pacientes adultos. Pacientes com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1*^{EI} aos 3 meses após início de terapia apresentaram uma maior probabilidade de atingir RMM aos 12 meses e uma maior SLP e SG, quando comparada com pacientes com $>10\%$.

- O tempo de redução da carga leucêmica pela metade (halving time) em pacientes com LMC em uso de 2ITK que foi associado a melhores resultados de sobrevida foi de 35 dias. Pacientes com ≤ 35 dias de redução da carga leucêmica pela metade tiveram uma maior SLP, SLE e maiores probabilidades de alcance de RMM aos 12 meses, sendo este um importante marcador precoce de resposta dos pacientes que falharam ao imatinibe e trocaram para 2ITK.

- O estudo da LMC pediátrica contribuiu para a geração de conhecimento de uma doença rara na infância e adolescência. Nossos resultados na LMC pediátrica, foram concordantes aos encontrados nos adultos, mostraram o valor prognóstico dos níveis de transcritos aos 3 meses após o início do tratamento. Pacientes com $\leq 10\%$ *BCR-ABL1*^{EI} aos 3 meses tiveram uma maior probabilidade de alcançar a RCgC aos 12 meses e RMM aos 18 meses e tiveram uma maior SLE. Este valor aos 3 meses não foi correlacionado com SLP.

- Na LMC pediátrica o tipo de transcrito não teve impacto no prognóstico da doença.

- Pacientes com LMC submetidos ao TCTH com níveis indetectáveis de *BCR-ABL1*^{EI} após o transplante possuem uma maior probabilidade de não

recaírem, quando comparados aos pacientes que apresentaram mais de uma amostra positiva ao longo do acompanhamento pós TCTH. Visto que a metodologia de RT-qPCR foi a mais específica, enquanto que o ddPCR foi a mais sensível para o monitoramento desses pacientes e a maior probabilidade de falsos positivos gerados pelo ddPCR a técnica mais indicada para o acompanhamento pós TCTH seja o RT-qPCR.

- A flutuação de transcritos *BCR-ABL1* em baixos níveis (0,06% BCR-ABL1) não foi associada a recaída nos pacientes pós-transplante, mas pacientes com níveis superiores a 0,06% *BCR-ABL1*^{EI}, apresentaram uma maior probabilidade de recaída.

- O perfil identificado de mutações detectadas em baixa sensibilidade mostrou-se complexo e pode contribuir para um melhor entendimento da evolução clonal desta doença;

- Foram poucas as mutações identificadas em genes *BCR-ABL1* independentes em pacientes que progrediram na doença, por isso não foi possível uma correlação entre genótipo e fenótipo acelerado da doença.

REFERÊNCIAS

; ; ON BEHALF OF THE ACMG LABORATORY QUALITY ASSURANCE COMMITTEE et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–423, maio 2015.

AHUJA, H. G. et al. Abnormalities of the retinoblastoma gene in the pathogenesis of acute leukemia. **Blood**, v. 78, n. 12, p. 3259–3268, 15 dez. 1991.

ALIKIAN, M. et al. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 11, p. 4–20, mar. 2017.

ALWAN, A. F. et al. Prospective single-center study of chronic myeloid leukemia in chronic phase: switching from branded imatinib to a copy drug and back. **Leukemia & Lymphoma**, v. 55, n. 12, p. 2830–2834, dez. 2014.

APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **The lancet oncology**, v. 8, n. 11, p. 1018–1029, nov. 2007a.

APPERLEY, J. F. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **The lancet oncology**, v. 8, n. 12, p. 1116–1128, dez. 2007b.

APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447–1459, abr. 2015.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical Biochemist. Reviews**, v. 29 Suppl 1, p. S49-52, ago. 2008.

ARPINATI, M. et al. Molecular Monitoring of BCR-ABL Transcripts after Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 19, n. 5, p. 735–740, maio 2013.

ASFOUR, I. A.; ELSHAZLY, S. A. Changing therapy from Glivec® to a “copy” imatinib results in a worsening of chronic myeloid leukemia disease status: two case reports. **Cases Journal**, v. 2, n. 1, p. 9342, 2009.

BACCARANI, M. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1809–1820, 15 set. 2006.

- BACCARANI, M. et al. Response definitions and European LeukemiaNet Management recommendations. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 22, n. 3, p. 331–341, set. 2009a.
- BACCARANI, M. et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041–6051, 2 nov. 2009b.
- BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872–884, 8 ago. 2013.
- BACCARANI, M. et al. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 141–147, abr. 2015.
- BACCARANI, M.; SOVERINI, S.; DE BENEDITTIS, C. Molecular Monitoring and Mutations in Chronic Myeloid Leukemia: How to Get the Most out of Your Tyrosine Kinase Inhibitor. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 34, p. 167–175, 2014.
- BARAŃSKA, M. et al. Dasatinib treatment can overcome imatinib and nilotinib resistance in CML patient carrying F359I mutation of BCR-ABL oncogene. **Journal of Applied Genetics**, v. 49, n. 2, p. 201–203, jun. 2008.
- BECK, Z. et al. Alterations of *P53* and *RB* Genes and the Evolution of the Accelerated Phase of Chronic Myeloid Leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 38, n. 5–6, p. 587–597, jan. 2000.
- BENNETT, J. **Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood.** **Edinb Med Surg J.** [s.l: s.n.]. v. 64
- BENNOUR, A. et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, mar. 2013.
- BITENCOURT, R.; ZALCBERG, I.; LOURO, I. D. Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 6, p. 470–475, 2011.
- BOLTON-GILLESPIE, E. et al. Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 4175–4183, 16 maio 2013.
- BONECKER, S. et al. Is the BCR-ABL/GUSB transcript level at diagnosis an early predictive marker for chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 142–143, mar. 2015.
- BRADEEN, H. A. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis

screen: high efficacy of drug combinations. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2332–2338, 1 out. 2006.

BRANFORD, S. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 276–283, 20 mar. 2003.

BRANFORD, S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 276–283, 1 jul. 2003.

BRANFORD, S. et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1925–1930, nov. 2006.

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, 15 out. 2008.

BRANFORD, S. et al. Prognosis for patients with CML and $\geq 10\%$ BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. **Blood**, v. 124, n. 4, p. 511–518, 24 jul. 2014.

BRANFORD, S.; HUGHES, T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. **Methods in molecular medicine**, v. 125, p. 69–92, 2006.

BRANFORD, S.; MELO, J. V.; HUGHES, T. P. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5426–5435, 24 dez. 2009.

BURMEISTER, T.; REINHARDT, R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR-ABL fusion transcripts. **Leukemia Research**, v. 32, n. 4, p. 579–585, abr. 2008.

BURNS, M.; VALDIVIA, H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1513–1524, abr. 2008.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, abr. 2009.

CAMPBELL, L. J. et al. BCR/ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 139, n. 1, p. 30–33, nov. 2002.

CAMPIOTTI, L. et al. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. **European Journal of Cancer**, v. 77, p. 48–56, maio 2017.

CERVANTES, F. et al. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 76, n. 1, p. 27–32, set. 1990.

CHAHARDOULI, B. et al. Detection of BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on imatinib. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 18, n. 6, p. 328–333, nov. 2013.

CHAMPAGNE, M. A. et al. Higher dose imatinib for children with de novo chronic phase chronic myelogenous leukemia: A report from the Children's Oncology Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 57, n. 1, p. 56–62, 15 jul. 2011.

CHEN, C. T.; KESSELHEIM, A. S. Journey of Generic Imatinib: A Case Study in Oncology Drug Pricing. **Journal of Oncology Practice**, p. JOP.2016.019737, 26 abr. 2017.

CILLONI, D.; SAGLIO, G. Molecular Pathways: BCR-ABL. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 4, p. 930–937, 15 fev. 2012.

CORRÊA, S. et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, dez. 2012.

CORTES, J. et al. Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. **Leukemia**, v. 22, n. 12, p. 2176–2183, dez. 2008.

CORTES, J. E. et al. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 392–397, 20 jan. 2010.

CROSS, N. C. P. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 22, n. 3, p. 355–365, set. 2009.

CROSS, N. C. P. et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2172–2175, 16 abr. 2012.

CROSS, N. C. P. et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 999–1003, maio 2015.

CROSSMAN, L. C. hOCT 1 and resistance to imatinib. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 1133–1134, 12 abr. 2005.

DA CUNHA VASCONCELOS, F. et al. Low ABCB1 and high OCT1 levels play a favorable role in the molecular response to imatinib in CML patients in the community clinical practice. **Leukemia Research**, v. 51, p. 3–10, dez. 2016.

DALEY, G.; VAN ETTEN, R.; 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, 16 fev. 1990.

DAS, L. et al. The value of open access and a patient centric approach to oral oncolytic utilization in the treatment of Chronic Myelogenous Leukemia: A U.S. perspective. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 17, n. 2, p. 133–140, 4 mar. 2017.

DAZZI, F. et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2712–2716, 15 out. 2000.

DE LA FUENTE, J. et al. Managing children with chronic myeloid leukaemia (CML): Recommendations for the management of CML in children and young people up to the age of 18 years. **British Journal of Haematology**, p. n/a-n/a, jun. 2014.

DEININGER, M. W. et al. Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. **Blood**, v. 127, n. 6, p. 703–712, 11 fev. 2016.

DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343–3356, 15 nov. 2000.

DI BELLA, N. J. et al. The Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors and Molecular Monitoring Patterns in Newly Diagnosed Patients With Chronic Myeloid Leukemia in the Community Setting. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 15, n. 10, p. 599–605, out. 2015.

ELIAS, M. H. et al. Contribution of BCR-ABL kinase domain mutations to imatinib mesylate resistance in Philadelphia chromosome positive Malaysian chronic myeloid leukemia patients. **Hematology Reports**, v. 4, n. 4, 19 nov. 2012.

ELIAS, M. H. et al. BCR-ABL kinase domain mutations, including 2 novel mutations in imatinib resistant Malaysian chronic myeloid leukemia patients—Frequency and clinical outcome. **Leukemia Research**, v. 38, n. 4, p. 454–459, abr. 2014.

ESKAZAN, A. E.; SOYSAL, T. Generic imatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia: Cerrahpaşa experience. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 22, n. 2, p. 382–384, abr. 2016.

ETIENNE, G. et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 3, p. 298–305, 20 jan. 2017.

EXPERTS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. **Blood**, v. 121, n. 22, p. 4439–4442, 30 maio 2013.

- FADERL, S. et al. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164–172, 15 jul. 1999.
- FORONI, L. et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia: Guideline. **British Journal of Haematology**, v. 153, n. 2, p. 179–190, abr. 2011.
- FUNKE, V. A. M. et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, set. 2005.
- 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, dez. 2003.
- GIBBONS, D. L. et al. Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 9, p. 3550–3555, 4 mar. 2014.
- GIONA, F. et al. Can chronic myeloid leukaemia in children and adolescents be successfully treated without haematopoietic stem cell transplant? A single centre experience. **British Journal of Haematology**, v. 173, n. 5, p. 749–753, jun. 2016.
- GOLDBERG, S. L. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia in the Real World: Gaps and Opportunities. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 15, n. 12, p. 711–714, dez. 2015.
- GOLDMAN, J. M. et al. Relapse and Late Mortality in 5-Year Survivors of Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia in First Chronic Phase. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 11, p. 1888–1895, 10 abr. 2010.
- GORRE, M. E. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 876–880, 3 ago. 2001.
- GRATWOHL, A.; BALDOMERO, H.; PASSWEG, J. The role of hematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 177–186, abr. 2015.
- GRUBER, F. X. et al. BCR-ABL isoforms associated with intrinsic or acquired resistance to imatinib: more heterogeneous than just ABL kinase domain point mutations? **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 219–226, mar. 2012.
- GUILHOT, F. et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4143–4150, 15 maio 2007.

GUILHOT, J. et al. Definitions, methodological and statistical issues for phase 3 clinical trials in chronic myeloid leukemia: a proposal by the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 119, n. 25, p. 5963–5971, 16 abr. 2012.

GURREA SALAS, D. et al. Can prognostic scoring systems for chronic myeloid leukemia as established in adults be applied to pediatric patients? **Annals of Hematology**, v. 94, n. 8, p. 1363–1371, ago. 2015.

HANFSTEIN, B. et al. 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, set. 2012.

HANFSTEIN, B. et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. **Haematologica**, v. 99, n. 9, p. 1441–1447, 1 set. 2014.

HASSERJIAN, R. P. Chronic Myelogenous Leukemia. In: JONES, D. (Ed.). . **Neoplastic Hematopathology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. p. 193–211.

HEGEDUS, T. et al. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1587, n. 2–3, p. 318–325, 18 jul. 2002.

HEHLMANN, R. et al. Interferon-alpha before allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome adversely, provided it is discontinued at least 90 days before the procedure. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3668–3677, 1 dez. 1999.

HEHLMANN, R. CML—where do we stand in 2015? **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 103–105, abr. 2015.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 370, n. 9584, p. 342–350, jul. 2007.

HIIJIYA, N. et al. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach. **Blood**, v. 127, n. 4, p. 392–399, 28 jan. 2016.

HOCHHAUS, A. et al. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 88, n. 6, p. 2236–2240, 15 set. 1996.

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

HOCHHAUS, A. et al. Dasatinib efficacy by dosing schedule across individual baseline BCR-ABL mutations in chronic phase chronic myelogenous leukemia (CML-CP) after imatinib failure. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 15_suppl, p. 7014–7014, 20 maio 2008a.

HOCHHAUS, A. et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. **Leukemia**, v. 22, n. 6, p. 1200–1206, jun. 2008b.

HOCHHAUS, A. et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K**, v. 23, n. 6, p. 1054–1061, jun. 2009.

HOCHHAUS, A. et al. Causes of resistance and treatment choices of second- and third-line treatment in chronic myelogenous leukemia patients. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 133–140, abr. 2015.

HOCHHAUS, A. et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. **Leukemia**, 20 fev. 2017a.

HOCHHAUS, A. et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 10, p. 917–927, 9 mar. 2017b.

HOGLUND, M. et al. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. **Blood**, v. 122, n. 7, p. 1284–1292, 15 ago. 2013.

HÖGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 241–247, abr. 2015.

HOKANSON, J. A. et al. Tumor growth patterns in multiple myeloma. **Cancer**, v. 39, n. 3, p. 1077–1084, mar. 1977.

HUGGETT, J. F. et al. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 1 jun. 2013.

HUGHES, T. et al. Impact of Baseline *BCR-ABL* Mutations on Response to Nilotinib in Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 25, p. 4204–4210, set. 2009.

HUGHES, T. P. et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 15, p. 1423–1432, 9 out. 2003.

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, 11 nov. 2010.

INNES, A. J.; APPERLEY, J. F. Chronic Myeloid Leukemia–Transplantation in the Tyrosine Kinase Era. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 6, p. 1037–1053, dez. 2014.

IRIYAMA, N. et al. Shorter halving time of *BCR-ABL1* transcripts is a novel predictor for achievement of molecular responses in newly diagnosed chronic-

phase chronic myeloid leukemia treated with dasatinib: Results of the D-first study of Kanto CML study group: Significance of BCR-ABL1 Decline in Prognosis of CML-CP. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 4, p. 282–287, abr. 2015.

ISLAMAGIC, E. et al. The Efficacy of Generic Imatinib as First- and Second-line Therapy: 3-Year Follow-up of Patients With Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 17, n. 4, p. 238–240, abr. 2017.

JABBOUR, E. et al. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4839–4842, 15 dez. 2008.

JIANG, Q. et al. Patients with Philadelphia-positive leukemia with Y253H or F359V mutation have a high risk of developing new mutations in the setting of dasatinib resistance. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 7, p. 2075–2081, 3 jul. 2015.

JONES, D. et al. BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of Philadelphia chromosome-positive leukemias. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 5190–5192, 15 dez. 2008.

KAEDA, J. Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: an attempt to define patients who may not require further therapy. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4171–4176, 15 maio 2006.

KANTARJIAN, H. et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. **Blood**, v. 119, n. 9, p. 1981–1987, 1 mar. 2012a.

KANTARJIAN, H. M. et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1141–1145, 27 jan. 2011.

KANTARJIAN, H. M. et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). **Blood**, v. 119, n. 5, p. 1123–1129, 2 fev. 2012b.

KARALEXI, M. A. et al. Survival trends in childhood chronic myeloid leukaemia in Southern-Eastern Europe and the United States of America. **European Journal of Cancer**, v. 67, p. 183–190, nov. 2016.

KHORASHAD, J. S. et al. BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. **Blood**, v. 121, n. 3, p. 489–498, 17 jan. 2013.

KIM, T. et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. **Leukemia Research**, v. 59, p. 142–148, ago. 2017.

- KRYJ, M. et al. Incidence and kinetics of distant metastases in patients with operable breast cancer. **Neoplasma**, v. 44, n. 1, p. 3–11, 1997.
- LAKSHMAIAH, K. C. et al. Chronic myeloid leukemia in children and adolescents: results of treatment with imatinib mesylate. **Leukemia & Lymphoma**, v. 53, n. 12, p. 2430–2433, dez. 2012.
- LARSON, R. A. et al. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2197–2203, 18 maio 2012.
- LI, M. M. et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 1, p. 4–23, jan. 2017.
- LUCAS, C. M. et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1362–1367, 27 ago. 2009a.
- LUCAS, C. M. et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1362–1367, 1 out. 2009b.
- MAHON, F. X. et al. Response at three months is a good predictive factor for newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated by recombinant interferon-alpha. **Blood**, v. 92, n. 11, p. 4059–4065, 1 dez. 1998.
- MAHON, F. X. et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 1070–1079, 1 ago. 2000.
- 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. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1029–1035, nov. 2010.
- MAHON, F.-X. Discontinuation of TKI therapy and ‘functional’ cure for CML. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 29, n. 3, p. 308–313, set. 2016.
- MAIA, R. et al. Towards Comprehension of the ABCB1/P-Glycoprotein Role in Chronic Myeloid Leukemia. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 119, 7 jan. 2018.
- MAKISHIMA, H. et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 117, n. 21, p. e198–e206, 26 maio 2011.
- MARIN, D. et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid

leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 3, p. 232–238, 20 jan. 2012.

MATTAR, M. Failure of copy Imatib (CIPLA, India) to maintain hematologic and cytogenetic responses in chronic myeloid leukemia in chronic phase. **International Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 104–106, jan. 2010.

MELO, J. V. BCR-ABL gene variants. **Baillière's clinical haematology**, v. 10, n. 2, p. 203–222, jun. 1997.

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

MENDIZABAL, A. M.; GARCIA-GONZALEZ, P.; LEVINE, P. H. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. **Cancer Epidemiology**, v. 37, n. 3, p. 247–254, jun. 2013.

MENEZES, J. et al. ASXL1, TP53 and IKZF3 mutations are present in the chronic phase and blast crisis of chronic myeloid leukemia. **Blood Cancer Journal**, v. 3, n. 11, p. e157–e157, nov. 2013.

MILLOT, F. Clinical and Biological Features at Diagnosis in 40 Children With Chronic Myeloid Leukemia. **PEDIATRICS**, v. 116, n. 1, p. 140–143, 1 jul. 2005.

MILLOT, F. et al. Imatinib Is Effective in Children With Previously Untreated Chronic Myelogenous Leukemia in Early Chronic Phase: Results of the French National Phase IV Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 20, p. 2827–2832, 10 jul. 2011.

MILLOT, F. et al. Imatinib cessation in children and adolescents with chronic myeloid leukemia in chronic phase: Imatinib Cessation in Children With CML. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 2, p. 355–357, fev. 2014a.

MILLOT, F. et al. Impact of early molecular response in children with chronic myeloid leukemia treated in the French Glivec phase 4 study. **Blood**, 28 ago. 2014b.

MILLOT, F. et al. Prognostic discrimination based on the EUTOS long-term survival score within the International Registry for Chronic Myeloid Leukemia in children and adolescents. **Haematologica**, v. 102, n. 10, p. 1704–1708, out. 2017.

MOREL, F. et al. Double minutes containing amplified bcr-abl fusion gene in a case of chronic myeloid leukemia treated by imatinib. **European Journal of Haematology**, v. 70, n. 4, p. 235–239, abr. 2003.

MORI, N. et al. Mutations of the p53 tumour suppressor gene in haematologic neoplasms. **British Journal of Haematology**, v. 81, n. 2, p. 235–240, jun. 1992.

MOSER, O. et al. Sustained complete molecular remission after imatinib discontinuation in children with chronic myeloid leukemia: Imatinib Discontinuation in Childhood CML. **Pediatric Blood & Cancer**, p. n/a-n/a, maio 2014.

MULLER, M. C. et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. **Blood**, v. 114, n. 24, p. 4944–4953, 3 dez. 2009.

MULLER, M. C. The ne plus ultra for deep BCR-ABL sequencing? **Blood**, v. 122, n. 9, p. 1536–1537, 29 ago. 2013.

NAKAYAMA, H. et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. **Cancer Research**, v. 59, n. 16, p. 3931–3934, 15 ago. 1999.

NICOLINI, F. E. et al. Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation: Ponatinib vs Allo-SCT in T315I Leukemias. **Cancer**, abr. 2017a.

NICOLINI, F. E. et al. Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation: Ponatinib vs Allo-SCT in T315I Leukemias. **Cancer**, v. 123, n. 15, p. 2875–2880, 1 ago. 2017b.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 25, p. 85–109, jul. 1960.

O'HARE, T. et al. *In vitro* Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4500–4505, 1 jun. 2005.

OLAVARRIA, E. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 97, n. 6, p. 1560–1565, 15 mar. 2001.

OTAZÚ, I. et al. Detection of *BCR-ABL* Transcripts by Multiplex and Nested PCR in Different Haematological Disorders. **Leukemia & Lymphoma**, v. 37, n. 1–2, p. 205–211, jan. 2000.

OTAZÚ, I. B. et al. Estimations of BCR-ABL/ABL transcripts by quantitative PCR in chronic myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation and donor lymphocyte infusion. **Leukemia Research**, v. 26, n. 2, p. 129–141, fev. 2002.

OYEKUNLE, A. A. et al. The predictive value of the Sokal and Hasford scoring systems in chronic myeloid leukaemia in the imatinib era. **Journal of Hematological Malignancies**, v. 2, n. 2, 7 jun. 2012.

PAGNANO, K. B. B. et al. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors and Impact on Survival. **Cancer Investigation**, v. 33, n. 9, p. 451–458, 21 out. 2015.

PARKER, W. T. et al. Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients with multiple low-level mutations, irrespective of their resistance profile. **Blood**, v. 119, n. 10, p. 2234–2238, 8 mar. 2012.

PARKER, W. T. et al. Many BCR-ABL1 compound mutations reported in chronic myeloid leukemia patients may actually be artifacts due to PCR-mediated recombination. **Blood**, v. 124, n. 1, p. 153–155, 3 jul. 2014.

PARKER, W. T. et al. The impact of multiple low-level BCR-ABL1 mutations on response to ponatinib. **Blood**, v. 127, n. 15, p. 1870–1880, 14 abr. 2016.

PAVLU, J. et al. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? **Blood**, v. 117, n. 3, p. 755–763, 20 jan. 2011.

PAVLU, J.; APPERLEY, J. F. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 8, n. 1, p. 43–51, mar. 2013.

PREUDHOMME, C. et al. Imatinib plus Peginterferon Alfa-2a in Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 26, p. 2511–2521, 23 dez. 2010.

QIN, Y. et al. Characteristics of BCR–ABL kinase domain point mutations in Chinese imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. **Annals of Hematology**, v. 90, n. 1, p. 47–52, jan. 2011.

RADIOYEVITCH, T. et al. Sex differences in the incidence of chronic myeloid leukemia. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 53, n. 1, p. 55–63, mar. 2014.

RAMARAJ, P. Effect of Mutational Inactivation of Tyrosine Kinase Activity on BCR/ABL-Induced Abnormalities in Cell Growth and Adhesion in Human Hematopoietic Progenitors. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5322–5331, 1 ago. 2004.

REDAELLI, S. et al. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 469–471, 15 dez. 2008.

REDAELLI, S. et al. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 3, p. 469–471, 20 jan. 2009.

RIBEIRO, B. et al. Treatment with dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia patients who failed to respond to two previously administered tyrosine kinase inhibitors – a single center experience. **Clinics**, v. 70, n. 8, p. 550–555, 5 ago. 2015.

ROCHE-LESTIENNE, C. et al. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3735–3741, 1 abr. 2008.

ROHRBACHER, M. et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. **Leukemia**, v. 23, n. 3, p. 602–604, mar. 2009.

ROHRBACHER, M.; HASFORD, J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 22, n. 3, p. 295–302, set. 2009.

ROSS, D. M. et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. **Blood**, v. 122, n. 4, p. 515–522, 25 jul. 2013.

ROWLEY, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290–293, 1 jun. 1973.

SACHA, T. et al. A multicenter prospective study on efficacy and safety of imatinib generics; a report from Polish Adult Leukemia Group imatinib generics registry. **American Journal of Hematology**, abr. 2017.

SAGLIO, G. et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 24, p. 2251–2259, 17 jun. 2010.

SAUßELE, S.; SILVER, R. T. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 159–165, abr. 2015.

SERPA, M. et al. Dasatinib Overrides Imatinib Resistance Mediated by the F359I Residue Mutation in Two Patients with Chronic Myeloid Leukemia. **Acta Haematologica**, v. 127, n. 1, p. 56–59, 2012.

SHAH, N. P. et al. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2562–2569, 4 set. 2007.

SHERBENOU, D. W. et al. BCR-ABL SH3-SH2 domain mutations in chronic myeloid leukemia patients on imatinib. **Blood**, v. 116, n. 17, p. 3278–3285, 28 out. 2010.

SILL, H.; GOLDMAN, J. M.; CROSS, N. C. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2013–2016, 15 abr. 1995.

SIMONSSON, B. et al. Combination of pegylated IFN- 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 118, n. 12, p. 3228–3235, 22 set. 2011.

SOVERINI, S. ABL Mutations in Late Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia Patients With Up-Front Cytogenetic Resistance to Imatinib Are Associated With a Greater Likelihood of Progression to Blast Crisis and Shorter Survival: A Study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 18, p. 4100–4109, 20 jun. 2005.

SOVERINI, S. et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2168–2171, 3 set. 2009.

SOVERINI, S. et al. IDH2 somatic mutations in chronic myeloid leukemia patients in blast crisis. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 178–181, jan. 2011a.

SOVERINI, S. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1208–1215, 11 maio 2011b.

SOVERINI, S. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. **Blood**, v. 118, n. 5, p. 1208–1215, 4 ago. 2011c.

SOVERINI, S. et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. **Blood**, v. 122, n. 9, p. 1634–1648, 29 ago. 2013.

SOVERINI, S. et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 38, n. 1, p. 10–20, jan. 2014.

SOVERINI, S. et al. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 15, p. S120–S128, jun. 2015.

SOVERINI, S. et al. Next-generation sequencing for sensitive detection of *BCR-ABL1* mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, 19 abr. 2016.

STEEGMANN, J. L. et al. An analysis of the kinetics of molecular response during the first trimester of treatment with nilotinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 10, p. 2059–2066, out. 2017.

STEINER, D. J.; THOMSON REUTERS ACCELUS. Pharmaceuticals and Medical Devices: Cost Savings. **Issue Brief (Health Policy Tracking Service)**, v. 2016, p. 1–31, 27 dez. 2016.

SUTTROP, M. et al. Impact of the type of the BCR-ABL fusion transcript on the molecular response in pediatric patients with chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 95, n. 5, p. 852–853, 1 maio 2010.

- TALPAZ, M.; MERCER, J.; HEHLMANN, R. The interferon-alpha revival in CML. **Annals of Hematology**, v. 94, n. S2, p. 195–207, abr. 2015.
- TARTAGLIA, M. et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Nature Genetics**, v. 34, n. 2, p. 148–150, jun. 2003.
- THE NGS IN PPGL (NGSNPPGL) STUDY GROUP et al. Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 233–247, abr. 2017.
- THOMAS, J. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3739–3745, 1 dez. 2004.
- VISSER, O. et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 17, p. 3257–3266, nov. 2012.
- WANG, L. et al. Expression of the Uptake Drug Transporter hOCT1 is an Important Clinical Determinant of the Response to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 2, p. 258–264, fev. 2008.
- WHITE, D. L. et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4064–4072, 1 dez. 2007.
- WHITE, D. L. et al. Functional Activity of the OCT-1 Protein Is Predictive of Long-Term Outcome in Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Treated With Imatinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2761–2767, 1 jun. 2010.
- WIDMER, N. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 1142–1142, 3 abr. 2003.
- WINGARD, J. R. et al. Long-Term Survival and Late Deaths After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 16, p. 2230–2239, jun. 2011.
- ZABRISKIE, M. S. et al. BCR-ABL1 Compound Mutations Combining Key Kinase Domain Positions Confer Clinical Resistance to Ponatinib in Ph Chromosome-Positive Leukemia. **Cancer Cell**, v. 26, n. 3, p. 428–442, set. 2014.
- ZHANG, W. W. et al. Predictors of Primary Imatinib Resistance in Chronic Myelogenous Leukemia Are Distinct From Those in Secondary Imatinib Resistance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 22, p. 3642–3649, ago. 2009.

ZHAO, L.-J. et al. Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia. **Blood**, v. 119, n. 12, p. 2873–2882, 22 mar. 2012.

ZHENG, Q. et al. ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 15, n. 2, p. 127–134, abr. 2015.

ANEXO 1

Aprovação do CEP/INCA: 100/04



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

ANEXO 2

Aprovação do CEP/INCA: 129/10

Rio de Janeiro, 15 de fevereiro de 2011.

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

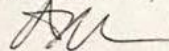
Registro CEP nº 129/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Abordagem molecular para avaliação dos mecanismos genéticos e epigenéticos subjacentes à resistência de pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos ao tratamento de inibidores tirosina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

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprova** 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

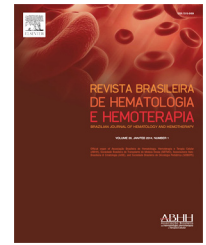
C/c – Dra. Eliana Abdelhay – Chefe do Serviço de Atividades Laboratoriais/CEMO
Dr. Luis Fernando Bouzas – Diretor do CEMO

ANEXO 3
ARTIGOS PUBLICADOS



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Letter to the Editor

Is the BCR-ABL/GUSB transcript level at diagnosis an early predictive marker for chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib?

Dear Editor,

The development of the first target-specific tyrosine kinase inhibitor (TKI) and its introduction in the clinical practice radically changed chronic myeloid leukemia (CML) treatment. Monitoring therapeutic response to TKIs is a critical step in the management of CML.¹

Recently, several follow-up studies upon which the European Leukemia Net 2013 (ELN) recommendations were based, pointed to the importance of early clearance of leukemic cells as demonstrated by molecular methods. Attaining a BCR-ABL^{IS} transcript level $\leq 10\%$ three months after initial imatinib mesylate (IM) treatment was found to be associated with a favorable outcome, including longer progression-free (PFS) and overall survival (OS), and higher probability of achieving complete cytogenetic response (CCyR) and major molecular response (MMR).¹

Quantification of the BCR-ABL transcript level reflects leukemic burden, and is carried out by quantitative real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR). Molecular response is based on the ratio of BCR-ABL transcript levels and a control gene. Results are expressed according to an international scale (IS) assigned to every patient at diagnosis, which is equal to 100% of BCR-ABL/control gene transcripts, regardless of the absolute amount of BCR-ABL transcripts. Thus, the actual leukemic burden of patients at diagnosis is not taken into account.²

An ideal control gene would be expected to be uniformly expressed in different cell types regardless of its proliferative status as well as be unaffected by therapeutic regimens, constant between individuals and expressed at a level similar to BCR-ABL. In fact, this control gene does not exist, and BCR and ABL are the most widely used control genes for quantifying BCR-ABL transcripts, mainly due to historical reasons. However, both BCR and ABL control genes do not show linearity with BCR-ABL transcript levels above 10% contrary to the GUSB gene that is not affected by high-level distortions which allow for better estimations of the BCR-ABL transcript level at diagnosis.³

In this study, the BCR-ABL transcript levels of 31 CML patients under IM treatment were analyzed by RQ-PCR in

respect to the ABL and GUSB control genes at diagnosis and after three months of therapy. These patients were followed up for at least 24 months. The median BCR-ABL1/ABL and BCR-ABL1/GUSB transcript levels at diagnosis were 87.84% (range: 16.24–184.4) and 29.8% (range: 5.76–216.9), respectively. At three months, the median BCR-ABL/ABL transcript level was 7.14 (range: 0.053–307) whereas the median BCR-ABL/GUS transcript level was 21.94 (range: 0.19–85.16). Patients were classified as optimal responders or non-responders (failure of response) according to a BCR-ABL1^{IS} transcript level $\leq 0.1\%$ and $>0.1\%$ at 12 months. In responders, the median BCR-ABL/ABL and BCR-ABL/GUS transcript levels at diagnosis were 68.13% (range: 26.8–99.29) and 23.77 (range: 8.2–62.97), respectively while in non-responders these levels were 86.10 (range: 30.87–96.11) and 40.92 (range: 17.21–96.85).

The median BCR-ABL/ABL of responders and non-responders at diagnosis was not significantly different (p -value = 0.89) while the median BCR-ABL/GUS between responders and non-responders at diagnosis was significantly different (p -value < 0.001) indicating that, unlike ABL, GUS levels are capable of discriminating responders from non-responders (Figure 1). The median transcript level of BCR-ABL/GUS of responders at diagnosis was 28.38% which might be considered a threshold for early discrimination as patients with levels under 28.38% were less likely to achieve MMR at 12 months (p -value < 0.05).

Comparisons of transcript levels three months after initiating IM treatment were also carried out considering a BCR-ABL/control gene^{IS} threshold of $\leq 10\%$ as discriminative of responders vs. non-responders. In patients considered to be optimal responders, the median of the transcripts estimated with any control gene was below 10%, as expected according to previous reports. We did not observe a statistically significant difference between ABL and GUS control genes (p -value = 0.19) in either responders or non-responders (p = 0.41), indicating that at the three month time point, both genes can be equally used as predictive biomarkers, showing significant differences between responders and non-responders (p -value = 0.003 for GUS and p -value = 0.01 for ABL; Figure 1).

The current availability of several therapeutic modalities for CML treatment requires early predictive parameters for

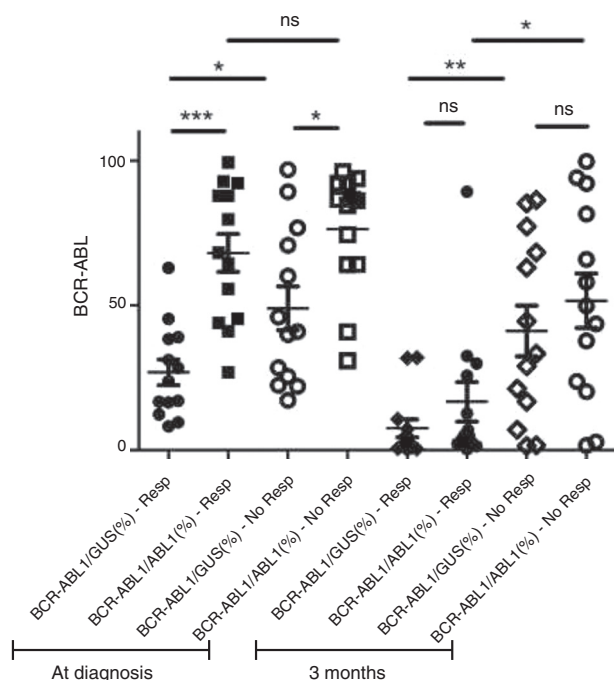


Figure 1 – The median levels of the transcripts considering both control genes (GUS and ABL) at diagnosis and after three months on imatinib (IM) as first line therapy. Patients are discriminated as responders or non-responders according to their response at 12 months according to the ELN guidelines. The medians of the transcripts were compared by Mann–Whitney unpaired two-tailed test. At diagnosis: * p -value < 0.001. At 3 months: * p -value = 0.01; ** p -value = 0.003. Resp = responders; No Resp = non-responders; ns = non-significant.

future response. In this study, we used parameters recommended for identifying optimal response (with BCR-ABL¹⁵ ≤10 at three months and ≤0.1 at 12 months after initiating treatment). However, BCR-ABL/ABL transcript levels cannot be used as predictive estimates due to the lack of linearity of the ABL gene in assessing leukemic burden at levels above 10% and actual levels of BCR-ABL transcripts at diagnosis can be accurately estimated with GUS as the control gene. We found that high levels of BCR-ABL/GUS at diagnosis were associated with a lower probability of achieving optimal response (p -value <0.001) and low rates of CyCR after 12 months of IM therapy (p -value <0.001). These findings coincided with Vigneri et al.⁴ who showed that high rates of BCR-ABL/GUS were associated with a low probability of event-free survival (p -value <0.001) and PFS (p -value = 0.01). As expected, the loss of ABL linearity resulting in transcript quantification with high levels of leukemic burden indicated that ABL, if used as the control gene at diagnosis, would not provide predictive estimates. Conversely, the use of GUS as the control gene allows for a

reliable prediction of therapeutic response based on BCR-ABL transcript levels at diagnosis.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872–84.
2. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, 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*. 2003;17(12):2318–57.
3. Cross NC. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):355–65.
4. Vigneri PG, Stagno F, Stella S, Cupri A, Forte S, Massimino M, et al. High BCR-ABL/GUSE1 Levels at diagnosis are associated with unfavorable responses to imatinib. *Blood*. 2013;122(21), abstract #1495.

Simone Bonecker

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Marina Magnago

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Jaspal Kaeda

Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Cristiana Solza

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Ilana Zalcborg Renault*

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* Corresponding author at: Praça Cruz Vermelha, 23, 6° andar, Laboratórios CEMO, Centro, 20230-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail address: zalcborg@inca.gov.br (I. Zalcborg Renault)

Received 14 July 2014

Accepted 27 August 2014

1516-8484/© 2015 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.08.003>

Available online xxx

Jacobs Journal of Genetics

Letter to Editor

Application of Deep Sequencing on Leukemia Clinical Practice: How to Use?

Diego F. Coutinho¹*, Simone T. Bonecker¹, Ilana R. Zalberg¹

¹Laboratory of Molecular Biology; Bone Marrow Transplantation Center (CEMO); National Institute of Cancer (INCA). Rio de Janeiro - RJ; Brazil

*Corresponding author: Dr. Diego Ferreira Coutinho, Laboratory of Molecular Biology – CEMO/INCA. Praça da Cruz Vermelha n°23, 6° andar, ala C, Centro. Rio de Janeiro-RJ. Brazil. Zip Code: 20230-130. Email: diego.coutinho@ymail.com

Received: 04-28-2015

Accepted: 04-29-2015

Published:

Copyright: © 2015 Diego

The Human Genome Project (HGP) was an international collaborative research with the goal to sequence and map the whole human DNA. It was believed that determining the sequence of the base pairs (A; T; C; and G) on human DNA would allow better understanding of the genetic basis of different diseases, including cancer. The draft of the human genome published in 2001 [1,2] did not ensure us the complete knowledge of diseases; however, it had started an important step to scientific research. The HGP was accomplished with first-generation sequencing (or Sanger sequencing), and this was one of the reasons it took more than 10 years to be completed and cost about \$3 billion. The delay and cost of the HGP stimulated the development of new laboratory strategies for genome studies beginning the high throughput DNA sequencing era. The next generation sequencing (NGS) comprises a set of different platforms able to generate large amount of data in short time with high throughput capacity. Currently, there are a number of commercially available NGS machines, each using a particular nucleotide detection system. There are many possibilities of applying NGS into scientific and clinical support, allowing from whole genome sequencing (WGS) or exome (WES) - subset of genome that is protein coding - to the mutational evaluation of target genes [3,4]. Here we will discuss the application of NGS and Sanger sequencing in hematological malignancies, focusing on Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Myelodysplastic Syndrome (MDS).

CML is a clonal proliferative disorder of hemopoietic stem cells characterized by a chromosomal translocation which is detectable cytogenetically as the Philadelphia (Ph) chromosome [5]. The translocation forms a novel gene by fusing the *BCR* gene on chromosome 22 with the *ABL* proto-oncogene

on chromosome 9 (t(9;22) / *BCR-ABL*). Ph chromosome discovery was the first consistent chromosome abnormality associated with a human cancer. So, either the presence of Ph chromosome identified by karyotype or *BCR-ABL* gene identified by PCR is sufficient to diagnostic this type of leukemia. CML has a unique place in oncology due to the fact that virtually all patients express the genetic rearrangement formed by reciprocal translocation. It makes *BCR-ABL* a perfect biomarker, where its presence could be translated to a clinical space. The understanding of CML molecular pathogenesis led to the development of a specific tyrosine-kinase inhibitor (TKI). TKI are small molecules that compete for ATP site on *BCR-ABL* protein in CML cells. When they are covalently linked in the protein they interrupt the intracellular signaling, leading to cell death by apoptosis [6].

In CML, the best-characterized mechanism of resistance is *BCR-ABL* kinase domain point mutations that impair or prevent TKI binding. There are more than hundreds of mutations described, but not all have clinical importance [7]. Of these, only seven mutated amino acid sites remained problematic for selecting effective “next-line” tyrosine kinase inhibitor for treating CML [8]. Thus, the mutation evaluation is important to guide the clinicians to choose the better second-line TKI available, individualizing the therapy and improving outcome. The international recommendation considered Sanger sequencing as standard methodology to evaluate these mutations, based on a wide availability and robustness [9,10]. However, it has been discussed if the low frequencies these mutation detected by NGS are clinically relevant changing the clinical decision algorithms [11,12]. The importance of this methodology to evaluate the presence of compound mutation is almost a consensus in the

area. Distinguish if ≥ 2 mutations are in the same BCR-ABL locus (compound mutation) or in separately clones (polyclonal or non-compound mutation) may influence on the selection of the TKI in order to avoid resistance. Unfortunately, Sanger sequencing cannot definitively distinguish frequencies and clonal relationships of those mutations. Several compound mutations have been shown to confer resistance to specific TKI, and this is likely to apply to other third-line TKIs as well. It has been suggested that sequential therapy with different TKI may inadvertently foster the development or selection of BCR-ABL compound mutations. While each of multiple mutant clones is expected to retain its individual sensitivity to a given TKI, compound mutations can dramatically affect TKI sensitivity and catalytic fitness of the tyrosine kinase [13].

In contrast to the unique biomarker in CML, MDS is a clonal disease with a variety of genetic damage. It is also arising from a malignant transformation of hematopoietic stem cell [14] and is characterized by ineffective hematopoiesis; cytopenias in peripheral blood; hypo- or hyperplasia in bone marrow; and increased risk of transformation into Acute Myeloid Leukemia (AML) [15].

Due to its clinically heterogeneity, MDS is classified into several different subtypes by French-American-British (FAB) cooperative group and World Health Organization (WHO). About 50% of patients have one or more cytogenetic abnormalities, generally chromosomal gain/loss, in those patients lacking cytogenetic markers establishment of a MDS diagnosis might be difficult [16]. In addition, cytogenetic is an important prognostic tool allowing stratification of patients into different risk groups [17].

Since 2008, few research groups discovered a series of mutations in different targets in patients with MDS, allowing the identification of new clonality markers in addition to cytogenetic [18–21]. In most studies, WES was used as the high throughput screening method, confirming the high capacity of this approach to discovery novel genetic markers. Currently, approximately 50 novel genes had been established, including epigenetic regulators; spliceosome proteins; transcriptional factor; cohesion proteins; and signaling pathway proteins. Epigenetic regulators and spliceosome genes are the gene category most frequently mutated in MDS, even though their clinical importance is still uncertain [22]. It has been shown that the same patient may have different mutations, and not necessarily mutations occur in the same clone, supporting the oligoclonal progression of the disease. Walter *et al.* demonstrated that the AML secondary from MDS may be due to increasing of a sub cloning [23]. Even if it is early to bring all novel markers into clinical practice, mutations in *ETV6*, *EZH2*, *ASXL1*, *RUNX1* and specially in *TP53*, are associated with an adverse prognosis. Besides, the identification of only one clonal mutation can discriminate MDS from a non-clonal disease. [24]. The

mutational analysis of several genes using Sanger sequencing is laborious and expensive, therefore NGS target sequencing will probably be the method of choice to handle molecular characterization. Furthermore, the high sensibility and coverage of NGS make this technique an important tool for evaluating MDS genomic landscape. Whether patients with the same genomic profile will behave in a clinical homogeneous way is to be seen.

In conclusion, currently either NGS or Sanger sequencing are relevant to predict clinical behavior and therapeutic response, the best methodology will mostly depend on laboratory expertise. For CML, the recommended methodology to identify point mutations is still Sanger sequencing and a positive finding can suggest therapeutic changes. Whether mutations detected at low level at diagnosis by NGS are to be considered clinically is still under discussion. In contrast, when two or more mutations are found in *BCR-ABL*, NGS can be a perfect tool to distinguish whether those mutations are on the same clone or not. The establishment of a polyclonal pattern is helpful to improve clinical management and overcome a resistant phenotype. For MDS, a more complex genetic disease, the picture is different and NGS seems to be essential to identify clinically relevant variants. The high sensitivity and multiple targets detection are already important for MDS clinical management. NGS is transforming the conduction of diagnostic investigation, prognostic stratification and therapeutic individualization. However, at this time point NGS creates new challenges, including the unwanted and unsought results, which should be carefully interpreted and managed while managing patients.

Acknowledge

The authors are supported by Brazilian funding agencies CNPq, FAPERJ and INCT para controle do câncer.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Reference

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291: 1304–1351.
3. Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep Sequencing in Cancer Research. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2013, 43(2): 110–115.
4. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation se-

quencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013, 340(2): 284–295.

5. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*. 2015, 94:107–121.

6. Druker BJ. Imatinib. In: Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2012, p. 1484–1486.

7. Ernst T, La Rosée P, Müller MC, Hochhaus A. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2011, 25(5): 997–1008.

8. Soverini S, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Abruzzese E et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2009, 114(10): 2168–2171.

9. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: *Blood* 2013, 122(6): 872–884.

10. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011, 118(5): 1208–1215.

11 Muller MC. The ne plus ultra for deep BCR-ABL sequencing? *Blood* 2013, 122(9): 1536–1537.

12. Soverini S, De Benedittis C, Machova Polakova K, Brouckova A, Horner D, et al. Unraveling the complexity of tyrosine kinase inhibitor-resistant populations by ultra-deep sequencing of the BCR-ABL kinase domain. *Blood*. 2013, 122(9): 1634–1648.

13. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J, et al. BCR- ABL1 Compound Mutations Combining Key Kinase Domain Positions Confer Clinical Resistance to Ponatinib in Ph Chromosome-Positive Leukemia. *Cancer Cell*. 2014, 26(3) :428–442.

14. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JCY, et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature Reviews. Cancer* 2007, 7(2): 118–129.

15. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic Syndromes. *New England Journal of Medicine* 2009, 361: 1872–1885.

16. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007, 392–7.

17. Schlegelberger B, Göhring G, Thol F, Heuser M. Update on cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*. 2012, 53(4): 525–36.

18. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature Genetics*. 2013, 45(10): 1232–7.

19. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011, 478: 64–69.

20. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010, 363(25): 2424–2433.

21. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009, 361(11) : 2289–2301.

22. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gündem G, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013, 122(22): 3616–3627.

23. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, et al. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012, 366:1090–1098.

24. Coutinho DF, Diniz C, Filgueiras RLD, Baptista RLR, Ayres-Silva JP et al. Case report: A novel TET2 mutation in a patient with refractory cytopenia with multilineage dysplasia. *Genet Mol Res*. 2013, 12(4): 5858–5862.

LETTER TO THE EDITOR

Differential expression of *SHP-1* in chronic myeloid leukemia

Jaspal Kaeda¹, Daniel Neuman¹, Simone Bonecker², Ken Mills³, Christian Oberender¹, Leila Amini¹, Frauke Ringel¹, Anna Serra⁴, Michaela Schwarz¹, Bernd Dörken¹, Ilana Zalcberg² & Philipp le Coutre¹

¹Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Medizinische Klinik m.S., Campus Virchow Klinikum, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, ²Bone Marrow Transplant Center (CEMO), INCA, Rio de Janeiro, Brazil, ³Haematology Research Group, CCRCB, Queens University Belfast, Belfast, UK and ⁴Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Italy

Despite the unprecedented success of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), the clinical management of 20–30% of patients with chronic myeloid leukemia (CML) experiencing primary or secondary resistance to imatinib mesylate (IM) continues to be challenging [1–3]. Early identification of these patients would indicate a more potent agent upfront, or alternative drug following the initial suboptimum response, or stem cell transplant (SCT) prior to the subject becoming refractory to further treatment. Therefore, a biomarker with proven clinical utility of predicting patients' response to IM would assist considerably in optimizing clinical management for such patients. Recently, investigators reported that Src homology 2 domain-containing phosphatase-1 (*SHP-1*) expression levels at diagnosis were prognostic and predictive of TKI response in patients with CML [4]. Previously, others suggested that down-regulation of *SHP-1* contributes to constitutive activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling and disrupts protein phosphatase 2A (PP2A) mediated *BCR-ABL1* elimination, thereby triggering CML transformation [5].

Therefore, we retrospectively studied 97 cDNA samples from patients with highly heterogeneous CML to assess the clinical utility of measuring *SHP-1* mRNA levels in patients with CML (Table I). The samples were collected at various time points, reflected by the overlap in *BCR-ABL1* transcript numbers for those who achieved a major molecular response (MMR) and those who did not (Table I). Of the 97 patients, 24 were had advanced disease (AD), i.e. accelerated phase (AP) $n = 6$ and blast crisis (BC) $n = 18$, and 73 patients were in highly heterogeneous chronic phase (CP) treated with different modalities. For 35 of the 73 patients in CP the MMR status was available for assessing the clinical utility of *SHP-1* levels. Among the 24 patients in AD, at least five archived serial mRNA samples were available for each of the five patients for longitudinal studies. Of these five patients, four had been treated with one or more TKIs and one had undergone allogeneic SCT. We also included a cohort control

of 77 diagnostic samples from a group of patients with heterogeneous acute myeloid leukemia (AML) and 18 normal control samples from adult volunteer blood donors, whose characteristics are detailed in Table I.

SHP-1, *BCR-ABL1* and endogenous control gene, *GUSβ*, transcripts were quantified by real time polymerase chain reaction (Q-PCR) as previously reported [6]. Standard curves were constructed for each assay using serial log dilutions of plasmid, ranging from 1×10^3 to 1×10^6 , with target gene specific insert. *BCR-ABL1* and *GUSβ* target sequences were included in one plasmid and the other included the *SHP-1* insert (a kind gift from Professor F. Pane, Naples, Italy). Only those samples with ≥ 5500 *GUSβ* transcripts were evaluated for this report. Non-parametric Mann-Whitney tests were performed using PRISM software.

Briefly, 38 of the 73 patients in CP were prescribed single agents: (interferon and cytarabine [$n = 1$]), IM ($n = 30$), nilotinib ($n = 6$) or dasatinib ($n = 1$). The remainder were treated with two or more agents, as were the 24 patients with AD. *SHP-1* mRNA was detectable in all samples screened by Q-PCR (Table I). However, a significant differential in mRNA expression ($p < 0.0001$) was observed between patients in CP and the normal control group. Furthermore, the *SHP-1* transcripts were significantly lower ($p = 0.0001$) in patients with AD, with a median of 14.0 (range 0.8–211.9), in comparison to patients in CP, median 35.7 (range 5.2–675.1). Similarly, we observed a significant difference between patients with CML with AD and normal control samples ($p < 0.0001$). However, we observed no significant difference in *SHP-1* levels between AML and normal control samples ($p = 0.801$). This is probably explained by the molecular heterogeneity among the patients with AML, in contrast to the single genetic lesion associated with CML, and that *SHP-1* is reported to bind to *BCR-ABL1*.

In contrast to published data [4] we found no significant difference ($p = 0.0966$) between patients who failed to achieve a MMR within 18 months ($n = 22$) and those

Table I. Summary of sample groups.

Subjects*	<i>n</i>	Sex, M/F	Age (years) (median)	<i>BCR-ABL1/GUSβ</i> (median)	<i>SHP-1/GUSβ</i> (median)
Normal controls	18	8/10	35–61 (44)	—	1.40–6.36 (3.66)
AML	77	42/35	8–85 (63)	—	0.56–13.29 (3.50)
CML: CP	73	44/29	19–75 (63)	0–1053 (18.38)	5.18–675.1 (35.69)
CML: AD [†]	24	16/8	34–74 (61)	0.40–1947 (182.7)	0.82–211.9 (14.0)
CML: MMR	13	8/5	20–66 (52)	0.24–140.30 (7.30)	15.46–318.9 (35.69)
CML: f-MMR	22	17/5	19–72 (32)	0.0–197.60 (62.33)	6.31–162.1 (26.72)

AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; CP, chronic phase; AD, advanced disease; MMR, major molecular response; f-MMR, failed MMR.

*From among the total 97 patients with CML, 13 were classified as having achieved MMR and 22 did not.

[†]Six accelerated phase, 18 blast crisis.

patients who did ($n = 13$). To exclude the possibility that the statistical value might have been influenced by either the highly variable collection time-points or the diverse therapeutic agents administered, a restricted analysis of 15 patients treated with IM alone and for whom we had samples collected at diagnosis was performed. Even within this group we found no significant difference ($p = 0.4527$), i.e. between those who did ($n = 6$) and failed to ($n = 9$) achieve MMR within 12 months. This did not change even when the criterion was extended to 18 months. This variance from published data may reflect differences in the timing of sample collection during the course of treatment in this study and that reported by Esposito *et al.* [4]. However, these data do not exclude the possibility that assessing SHP-1 activity at the protein level would be predictive. Nevertheless, protein analysis is too complex for a clinical laboratory to perform, in contrast to Q-PCR analysis, and therefore not within the scope of this assessment.

In addition we noted no significant difference in *SHP-1* mRNA levels between those patients in CP who had been prescribed one ($n = 37$), two ($n = 7$) or ≥ 3 TKIs ($n = 8$), which generally correlated with optimal, suboptimal and/or failed response.

The kinetics data were consistent with overall CP and AD results, showing that *SHP-1* levels decreased as the *BCR-ABL1* transcript numbers increased, i.e. an inverse relationship (Figure 1), implying that regulatory control of the two is directly or indirectly linked. We did note that for patient 4, including the period when the subject was in CP (Figure 1), this relationship was not observed. However, there was no difference of note in this patient's clinical history compared to the other four subjects. More importantly, *BCR-ABL1* transcripts in these five patients were not preceded by a decrease in *SHP-1*.

Given the relatively low levels of *SHP-1* in comparison to *BCR-ABL1* expression, we confirmed that our assay could

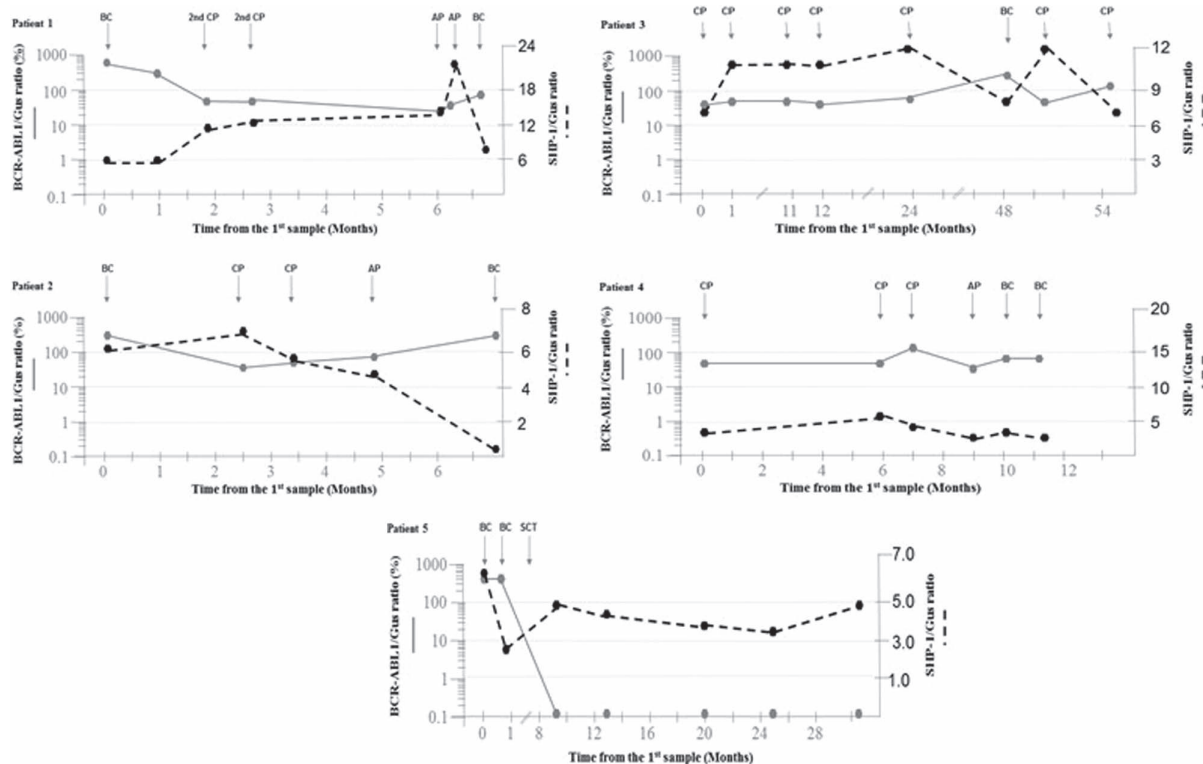


Figure 1. *SHP-1* and *BCR-ABL1* kinetics. Kinetics data for *SHP-1* (dashed lines) and *BCR-ABL1* (solid lines) are shown for five patients with CML included in the longitudinal study. Y-axis for *SHP-1* levels is on the right of each graph. *SHP-1* mRNA was detected in all samples tested for the five patients and reflected the *BCR-ABL1* kinetics. *SHP-1* levels did not predict a change in patients' disease status, such that an increase or decrease in its expression did not precede a change in *BCR-ABL1* transcript levels. Therefore, we conclude that its predictive value is not superior to that of the disease specific marker, *BCR-ABL1*.

reproducibly detect a five-fold change in *SHP-1* mRNA levels by titrating, in duplicate, the SU-DHL-1 cell line with the LAMA-87 hematopoietic cell line. This is consistent with the generally accepted view that Q-PCR assays have a dynamic range of 5-log, although up to an 8-log range is achievable.

Therefore, the kinetics and MMR data suggest that measuring the *SHP-1* mRNA level does not provide additional information for identifying patients at risk of disease progression or predicting response to TKIs beyond that gleaned from close regular monitoring by measurement of disease-specific *BCR-ABL1* transcripts. However, the differential expression of *SHP-1* between CP and AD observed in this study was consistent with earlier reports suggesting that phosphatase antagonizes *BCR-ABL1* ability to block differentiation [7,8]. Reduced expression of *SHP-1* might free *BCR-ABL1* to recruit and activate JAK2. Active JAK2 has been reported to enhance β -catenin activity and inactivate PP2A mediated degradation of *BCR-ABL1*, thus triggering BC [9].

In conclusion, our data imply that *SHP-1* levels fail to predict TKI response. However, in keeping with previous reports, our data provide further evidence to support the notion that *SHP-1* plays a role in CML disease progression.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

- [1] Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;349:1423-1432.
- [2] Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13:515-529.
- [3] Crews LA, Jamieson CH. Chronic myeloid leukemic stem cell biology. *Curr Haematol Malign Rep* 2012;7:125-132.
- [4] Esposito N, Colavita I, Quintarelli C, et al. SHP-1 expression accounts for resistance to imatinib treatment in Philadelphia chromosome-positive cells derived from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011;118:3634-3644.
- [5] Neviani P, Santhanam R, Trotta R, et al. The tumour suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL regulated SET protein. *Cancer Cell* 2005;8:355-368.
- [6] Kaeda J, O'Shea D, Szydlo RM, et al. Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplant for chronic myeloid leukemia. An attempt to define patients who may not require further therapy. *Blood* 2006;107:4171-4176.
- [7] Bruecher-Encke B, Griffin JD, Neel BG, et al. Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* 2001;15:1424-1432.
- [8] Amin HM, Hoshino K, Yang H, et al. Decreased expression level of SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-1 (Shp1) is associated with progression of chronic myeloid leukemia. *J Pathol* 2007;212:402-410.
- [9] Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest* 2013;123:4144-4157.