



**Programa de Pós-Graduação em Oncologia  
Instituto Nacional de Câncer (PPGO-INCA)**

**MECANISMOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS  
RELACIONADOS COM A RESPOSTA E A RESISTÊNCIA À  
TERAPIA COM INIBIDORES TIROSINA QUINASE NA  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

**VANESA SCHOLL**

**Orientador: Ilana Zalcborg Renault  
Co-orientador: Cláudia Rocio Hassan**

**Rio de Janeiro, 2012**

**VANESA SCHOLL**

**Mecanismos Genéticos e Epigenéticos Relacionados  
com a Resposta e a Resistência à Terapia com  
Inibidores Tirosina Quinase na Leucemia Mieloide Crônica**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Orientador: Ilana Zalcborg Renault

Co-orientador: Cláudia Rocio Hassan

Rio de Janeiro, 2012

S368m Scholl, Vanesa

Mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados com a resposta e a resistência à terapia com inibidores tirosina quinase na leucemia mielóide crônica. / Vanesa Scholl. – Rio de Janeiro, 2012.

xvii, 169 f.: il. graf. tab.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva, 2012.

Orientador: Ilana Zalberg Renault.

Cláudia Esther Alicia Rocio Hassan.

Referências Bibliográficas f. 140-158

1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Inibidores Tirosina Quinase. 3. Mutações no Domínio Quinase. 4. MicroRNAs. I. Zalberg, Ilana Renault (Orient.). II. Hassan, Cláudia Esther Alicia Rocio (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.9941906

**MECANISMOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS  
RELACIONADOS COM A RESPOSTA E A RESISTÊNCIA  
À TERAPIA COM INIBIDORES TIROSINA QUINASE NA  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Vanesa Scholl

Orientadores: Ilana Zalberg Renault  
Cláudia Rocio Hassan

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia,  
Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, 25 de Abril de 2012.

Aprovada por:

---

Prof. Dr Ângelo Maiolino

---

Prof. Dra Katia Borgia Barbosa Pagnano

---

Prof. Dr Gustavo Stefanoff

---

Prof. Dr Martin Bonamino

*À minha Família: Rubén, Eva,  
Constanza, Bárbara e Rodrigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Ilana Zalberg Renault, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e o apoio absoluto durante este caminho. Pelas oportunidades infinitas, a confiança e o carinho em todos os momentos. Muito obrigada.

A Rocío Hassan, pelas idéias, sugestões e ajuda constante em todo momento ao longo destes anos de trabalho compartilhado. Pelo carinho, os conselhos e a amizade sincera. Obrigada pela presença incondicional.

A Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer pela oportunidade e as pessoas da secretaria da PPGO, pela ajuda e disposição constante.

A todas as pessoas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO, os que fazem parte atualmente e aos que fizeram pelo dia a dia de trabalho e a diversão constante.

Ao Dr George Calin, MDACC, Houston. Por ter me recebido com tanto carinho no seu laboratório e pela oportunidade única das discussões científicas diárias.

A todas as pessoas do Laboratório de Terapia Experimental do MDACC, pelo carinho e ajuda diária no trabalho durante o período compartilhado.

Ao Dr Fernando Soares, Hospital AC Camargo, São Paulo. Pela colaboração na realização dos *arrays* de miRNAs.

Ao corpo clínico do CEMO e do serviço de Hematologia do INCA, pela disposição constante.

A Virginia Pires, pela amizade e o carinho permanente.

Aos meus amigos-família Rocio, Gustavo, Juan Batista e Julieta. Por todos os momentos compartilhados ao longo destes anos e o afeto constante. Obrigada de coração.

Aos meus pais, meu exemplo em todo sentido. Obrigado pela confiança sem limites, o amor diário à distancia e por estarem ao meu lado nas horas mais difíceis. Os amo profundamente.

A Constanza e Bárbara, por fazerem-me sentir seu carinho que me acompanha sempre, por compartilhar comigo cada momento.

A Rodrigo, pelo amor, os cuidados, o apoio, e a incondicionalidade de todos os dias. Por estar sempre tão perto e me cuidar tanto.

## RESUMO

O tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC) foi radicalmente modificado com a introdução dos inibidores de tirosina quinase (ITK) na prática clínica. Entretanto, a resistência aos ITK é um problema clínico crescente que acomete 35% dos pacientes com LMC em fase crônica (FC). Dentre os mecanismos envolvidos na resistência, se destaca a presença de mutações no domínio quinase (DQ) da proteína BCR-ABL. Porém, estas mutações ocorrem em 30–60% dos pacientes resistentes, evidenciando a heterogeneidade dos mecanismos subjacentes ao aparecimento da resistência. Processos epigenéticos, como a metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de microRNAs (miRNAs) ainda não foram amplamente estudados em relação à resistência na LMC. Os miRNAs, pequenos RNAs que regulam a expressão gênica, têm surgido recentemente como um mecanismo epigenético importante na fisiologia do câncer. O objetivo principal deste trabalho foi analisar os padrões de resposta de um grupo de pacientes com LMC submetidos à terapia com Imatinibe (IM), visando identificar mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados com a resposta e a resistência aos ITK. Para isto, foram estudados 264 pacientes com LMC tratados com IM por um tempo médio de 30 meses (6-123), com 70% dos casos utilizando o inibidor por >12 meses. As taxas de resposta foram de 76% de resposta citogenética completa (RCgC), 63% de resposta molecular maior (RMM) e 29% de resposta molecular completa (RMC) nos pacientes com LMC-FC. Foi identificado um grupo de respondedores tardios, que representam ~30% dos pacientes que não alcançaram uma RCgC e/ou RMM nos tempos ótimos após início do IM. Um grupo de 126 pacientes foi selecionado para pesquisa de mutações no DQ. A presença de mutações foi avaliada por sequenciamento direto, por um ensaio de PCR alelo específico (PCR-AS) para detecção da mutação T315I e a quantificação dos clones mutados foi realizada por piro-sequenciamento. Dos casos analisados, 23% apresentaram mutações no DQ. As mutações mais frequentes foram T315I (20%) e F359I/V (11,4%). A quantificação realizada por piro-sequenciamento forneceu informações complementares relevantes sobre o papel do tamanho do clone mutado na resposta ou resistência. Em um grupo de 17 pacientes, selecionados de acordo à resposta obtida com IM, foi realizada uma análise do perfil de expressão de miRNAs maduros através de *arrays* de TLDA (do inglês *TaqMan Low Density Array*). Foi identificado um grupo de 4 miRNAs diferencialmente expressos ao diagnóstico quando comparados os grupos de pacientes com resposta ao IM vs resistentes ao IM: miR-155, -451, -18b, -125a-5p. Um grupo de 29 miRNAs apresentou um padrão similar de variação da expressão durante o tratamento. Os níveis de expressão dos miR-451 e miR-148a mostraram uma correlação inversa com a carga tumoral aferida pelos níveis do transcrito BCR-ABL. Esta correlação foi mais consistente para o miR-148a. As análises *in silico* para predição de alvos para o miR148a indicaram 6 alvos potencialmente relacionados com a LMC: os genes E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip e SHP-2. Foi comprovado que a expressão do miR-148a em linhagens celulares de LMC está regulada por metilação do DNA.



## ABSTRACT

Introduction of tyrosine kinase inhibitors (ITK) dramatically modify the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). However, resistance to ITK is an increasing clinical problem, affecting 35% of patients with CML in chronic phase (FC). Among the mechanisms involved in resistance, mutations in the kinase domain (KD) of BCR-ABL protein is the best described. However, these mutations occur in 30-60% of resistant patients, indicating the heterogeneity of resistance. Epigenetic processes such as DNA methylation, histone modification and microRNA (miRNA) expression have not been fully described in the resistance setting. MicroRNAs (miRNAs), small RNAs that regulate gene expression, have recently emerged as another epigenetic mechanism acting on the physiology of cancer. The main objective of this study was to analyze the response patterns of a group of CML patients undergoing imatinib (IM) therapy, to identify genetic and epigenetic mechanisms related to the response and resistance to ITK. For this, we studied 264 patients with CML treated with IM for 30 months (6-123), with 70% of cases using ITK for >12 months. Response rates were 76% of complete cytogenetic response (RCgC), 63% of major molecular response (MMR) and 29% of complete molecular response (CMR) in patients with CML-CP. We identified a group of late responders, representing ~30% of patients who did not achieve a RCgC and/or MMR in the optimal time-points after IM initiation. A group of 126 patients were selected for mutations analysis in the KD. Presence of mutations was assessed by direct sequencing, allele-specific PCR assay (AS-PCR) for T315I detection and quantification of the mutated clones was performed by pyro-sequencing. Of the analyzed cases, 23% had mutations in the KD. The more frequent mutations were T315I (20%) and F359I/V (11.4%). Quantification performed by pyro-sequencing provided additional relevant information about the role of the mutated clone size in the response or resistance. According to the response obtained with IM, a group of 17 patients was selected. In this group, we performed an expression profile analysis of mature miRNAs through TLDA arrays (TaqMan Low Density Array). We identified a group of 4 miRNAs differentially expressed at diagnosis compared groups of patients who respond to IM vs. IM-resistant: miR-155, -451, -18b-125-5p. A group of 29 miRNAs showed a similar expression variation pattern during treatment. Expression levels of miR-451 and miR-148a showed an inverse correlation with tumor burden as measured by levels of BCR-ABL transcript. This correlation was more consistent for the miR-148a. *In silico* analysis for target prediction of miR148a showed 6 potential targets related to the CML: E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip and SHP-2. It has been shown that expression of miR-148a in CML cell lines is regulated by DNA methylation.

<b>INDICE</b>		
		Pág.
RESUMO		vii
ABSTRACT		viii
LISTA DE TABELAS		xiii
LISTA DE FIGURAS		xiv
LISTA DE ABREVIATURAS		xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b>		<b>1</b>
1.1	A LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA NA ERA DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE	1
1.2	A HETEROGENEIDADE DOS MECANISMOS SUBJACENTES À RESISTÊNCIA AOS ITK	10
1.3	MECANISMOS EPIGENÉTICOS NAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: O PAPEL DOS MICRO-RNAS NA LMC	15
<b>2 OBJETIVOS</b>		<b>23</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>		<b>24</b>
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAS ESTUDADAS	24
3.2	CULTURA DE LINHAGENS CELULARES	25
3.3	MÉTODO DE ISOLAMENTO DE RNA TOTAL	27
3.4	MÉTODO DE SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (CDNA)	28
3.5	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS BCR-ABL	28
3.5.1	PCR Qualitativos para BCR-ABL	28
3.5.2	Padronização do ensaio de quantificação de transcritos BCR-ABL por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	29
3.6	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE BCR-ABL	29
3.6.1	RT-PCR para amplificação do DQ e sequenciamento direto	29
3.6.2	Desenho e padronização de um PCR-Alelo Específico (AS) para detecção da mutação T315I	30
3.6.3	Quantificação de mutações do gene BCR-ABL por piro-sequenciamento	32

## INDICE (continuação)

	Pág.
3.7 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MIRNAS MADUROS	33
3.7.1 Análise de expressão por <i>arrays</i> de TLDA	33
3.7.2 Análise de expressão por ensaios <i>singles</i>	35
3.8 ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO DE MIRNAS GERADOS POR RT-qPCR	36
3.9 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> PARA PREDIÇÃO DE ALVOS DE MIRNAS	37
3.10 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIRNAS	37
3.10.1 Ensaio de demetilacão do DNA	37
3.10.2 Ensaio de transfecção com precursores pre-miRNAs	38
3.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E WESTERN-BLOT	39
3.12 DEFINIÇÕES E REGISTRO DAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-DEMOGRÁFICAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>4 ANÁLISE DAS RESPOSTAS OBTIDAS EM PACIENTES COM LMC TRATADOS COM IM</b>	<b>43</b>
4.1 RESULTADOS	43
4.1.1 Ensaio de RT-qPCR para aferição da resposta molecular	43
4.1.2 Principais Características Clínico-demográficas do Grupo Estudado e Definição dos Critérios de Resposta	46
4.1.3 Análise Descritiva das Respostas Citogenéticas Obtidas com IM	47
4.1.4 Resultados dos Estudos Moleculares e Análise das Respostas	50
4.1.5 Análise de SG e SLP	55
4.2 DISCUSSÃO	57
<b>5 MECANISMOS GENÉTICOS: ANÁLISE DE PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO DOMÍNIO QUINASE DO GENE BCR-ABL</b>	<b>64</b>
5.1 RESULTADOS	64
5.1.1 Seleção de casos e amostras	64
5.1.2 Pesquisa de mutações no DQ do gene BCR-ABL	65

## INDICE (continuação)

	Pág.	
5.1.3	Padronização de ensaios de piro-sequenciamento para quantificação de mutações do DQ do gene BCR-ABL	73
5.1.3.1	Paciente portador da mutação F317L	76
5.1.3.2	Paciente portador da mutação T315I	78
5.1.4	Padronização e utilização de uma reação de PCR-AS para detecção da mutação T315I	80
5.2	DISCUSSÃO	83
<b>6</b>	<b>ANALISE DE MECANISMOS EPIGENETICOS: MICRO-RNAS</b>	93
6.1	RESULTADOS	93
6.1.1	Análise do perfil de expressão de miRNAs maduros por <i>arrays</i> de TLDA	93
6.1.1.1	Seleção de pacientes e amostras	93
6.1.1.2	Escolha do controle de expressão endógeno	95
6.1.1.3	Expressão de miRNAs maduros: análise do seu papel como marcador preditivo	96
6.1.1.4	Análise da variação do perfil de miRNAs durante o tratamento da LMC com ITKs	100
6.1.2	Análise do padrão de expressão do miR-451	105
6.1.2.1	Análise do padrão de expressão do miR-451 em pacientes individuais	105
6.1.2.2	Análise da expressão do miR-451 em pacientes portadores de	107
6.1.3	Análise do padrão de expressão do miR-148a em pacientes individuais	110
6.1.4	Análise <i>in silico</i> para determinação de possíveis alvos do miR-148a	113
6.1.5	Ensaio funcionais para o miR-148a	115
6.1.5.1	Ensaio de transfecção com precursores pre-miR	115
6.1.5.2	Ensaio com o agente demetilante 5-aza-2'deoxyctidina (5-Aza)	118
6.2	DISCUSSÃO	120

**INDICE** (*continuação*)

	Pág.
<b>7 CONCLUSÕES</b>	136
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	138
<b>9 REFERÊNCIAS</b>	140
<b>Anexo I</b>	159
<b>Anexo II</b>	162
<b>Anexo III</b>	167
<b>Anexo IV</b>	169

## LISTA DE TABELAS

		Pág.
<b>Tabela 1.1</b>	Definição de respostas e parâmetros operacionais para pacientes com LMC recém diagnosticados tratados com IM em primeira linha segundo a LeukemiaNet 2006 e 2009	6
<b>Tabela 3.1</b>	Características das linhagens celulares estudadas	27
<b>Tabela 4.1</b>	Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados (n=204)	47
<b>Tabela 4.2</b>	Melhores respostas citogenéticas observadas (n=172)	48
<b>Tabela 4.3</b>	Melhores respostas moleculares observadas (n=182)	51
<b>Tabela 4.4</b>	Respostas obtidas em pacientes com LMC-FCT descritas em series anteriores	59
<b>Tabela 5.1</b>	Crítérios de seleção de amostras para pesquisa de mutações no DQ do gene BCR-ABL	65
<b>Tabela 5.2</b>	Principais características dos pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL (n=29)	66
<b>Tabela 5.3</b>	Mutações no DQ do gene BCR-ABL identificadas neste estudo (n=35)	68
<b>Tabela 6.1</b>	Principais características dos pacientes selecionados para análise de perfil de expressão de miRNAs (n=21)	94
<b>Tabela 6.2</b>	miRNAs diferencialmente expressos em amostras diagnóstico de Resp-IM e Resist-IM	99
<b>Tabela 6.3</b>	Valores de FC dos miRNAs -451, -155, -125a-5p e -18b nas 17 amostras ao diagnóstico	100
<b>Tabela 6.4</b>	Pacientes e amostras selecionadas para análise da variação da expressão de miRNAs durante o tratamento da LMC com ITKs	101
<b>Tabela 6.5</b>	Valores de significância dos 29 miRNAs com padrão de expressão similar durante o curso da LMC em tratamento com ITKs	103
<b>Tabela 6.6</b>	Expressão do miR-451 durante o acompanhamento de pacientes portadores de mutações	110
<b>Tabela 6.7</b>	Função dos genes preditos como alvos do miR-148a com importância na LMC	114

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
<b>Figura 1.1</b>	Formação do gene de fusão BCR-ABL e sua atividade quinase constitutiva.	3
<b>Figura 1.2</b>	Mecanismos propostos relacionados à resistência aos ITKs.	11
<b>Figura 1.3</b>	Mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL.	12
<b>Figura 1.4</b>	Biogênese dos miRNAs.	18
<b>Figura 1.5</b>	Expressão de miRNAs na Hematopoiese.	20
<b>Figura 3.1</b>	Desenho do Estudo.	26
<b>Figura 3.2</b>	Pesquisa de mutações no Domínio Quinase: A: reação de sequenciamento direto. B: Reação de PCR-AS para detecção da mutação T315I.	31
<b>Figura 3.3</b>	Esquema do domínio quinase do gene ABL.	33
<b>Figura 3.4</b>	Esquema de trabalho com <i>arrays</i> de TLDA para miRNAs.	35
<b>Figura 4.1</b>	Padronização e validação do monitoramento molecular para LMC por RT-qPCR.	45
<b>Figura 4.2</b>	Distribuição dos tempos de obtenção da RCgC	49
<b>Figura 4.3</b>	Análise da Perda da RCgC.	53
<b>Figura 4.4</b>	Probabilidade de alcançar uma RMM.	53
<b>Figura 4.5</b>	Probabilidade da sobrevida livre de evento com tratamento com IM.	54
<b>Figura 4.6</b>	Probabilidade de obtenção de uma RMC.	55
<b>Figura 4.7</b>	Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão.	56
<b>Figura 5.1</b>	Distribuição de mutações detectadas segundo o critério de seleção.	67
<b>Figura 5.2</b>	Localização das mutações identificadas no presente estudo.	69
<b>Figura 5.3</b>	Análise de mutações no DQ.	71
<b>Figura 5.4</b>	Pacientes portadores de 2 mutações.	72
<b>Figura 5.5</b>	Paciente portador das mutações E255K e T315I.	75
<b>Figura 5.6</b>	Paciente portador da mutação M244V.	76
<b>Figura 5.7</b>	Paciente portador da mutação F317L	78
<b>Figura 5.8</b>	Paciente portador da mutação T315I.	79

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

	Pág.
<b>Figura 5.9</b> Detecção da mutação T315I.	82
<b>Figura 6.1</b> Escolha do gene de referencia.	96
<b>Figura 6.2</b> Perfil de expressão de miRNAs maduros por placas de TLDA.	97
<b>Figura 6.3</b> Análise supervisionada de expressão de miRNAs entre Resp-IM e Resist-IM.	98
<b>Figura 6.4</b> Confirmação por ensaios singles das diferenças observadas.	100
<b>Figura 6.5</b> Padrão de expressão dos miR-155, -125a-5p, -18b e -451 durante o tratamento com ITKs.	103
<b>Figura 6.6</b> Padrão de expressão similar apresentado por 29 miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs.	104
<b>Figura 6.7</b> Expressão do miRNA-451 em amostras seriadas de LMC em tratamento com ITKs.	106
<b>Figura 6.8</b> Nível de expressão do miR-451 em amostras diagnóstico de pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL.	109
<b>Figura 6.9</b> Expressão do miRNA-148a em amostras seriadas de LMC em tratamento com ITKs.	112
<b>Figura 6.10</b> Sequencias semente preditas para reconhecimento do miR-148a.	114
<b>Figura 6.11</b> Ensaios de transfecção com o pre-miR-148a.	116
<b>Figura 6.12</b> Avaliação do número e viabilidade celular durante o ensaio de transfecção com o pre-miR-148a.	117
<b>Figura 6.13</b> Ensaios de demetilação com o agente 5-Aza.	119
<b>Figura 6.14</b> Modelo de ação proposto para o miR-148a na LMC.	133



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABL	do inglês <i>Abelson Leukemia Virus</i>
ACA	alterações cromossômicas adicionais
aloTCTH	transplante de células tronco hematopoiéticas alogênicas
BCR	do inglês <i>Breakage Cluster Region</i>
BCR-ABL	Gene de fusão formado pelos genes BCR e ABL
CB	crise blástica
Cq	Ciclo de quantificação ou <i>threshold</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DO	unidade de densidade óptica
DQ	domínio quinase
DRM	Doença residual mínima
EI	escala internacional
FC	fase crônica
FCP	FC precoce
FCT	FC tardia
FA	fase acelerada
IFN- $\alpha$	interferon- $\alpha$
IM	Imatinibe
IRIS	do inglês <i>International Randomized Study of Interferon and STI571</i>
ITK	inibidores da actividade tirosina quinase
ITK-2G	inibidores da actividade tirosina quinase de segunda geração
LMC	leucemia mieloide crônica
LLA	leucemia linfocita aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
miRNAs	micro-RNAs
MO	Medula óssea
nt	nucleotídeos
NA	não aplicável

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

pb	pares de base
Ph	cromossomo <i>Philadelphia</i>
PCR	do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-AS	PCR alelo específica
RESP-IM	Respondedores ao imatinibe
RESIS-IM	Resistentes ao imatinibe
RH	resposta hematológica
RHC	resposta hematológica completa
RCg	resposta citogenética
RCgC	resposta citogenética completa
RCgP	resposta citogenética parcial
RCgM	resposta citogenética maior, considerada como a RCgC + RCgP
RCgMe	resposta citogenética menor
RCgMi	resposta citogenética mínima
RCgN	resposta citogenética nula
RM	resposta molecular
RMC	resposta molecular completa
RMM	resposta molecular maior
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RT	transcrição reversa
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SG	sobrevida global
SLE	sobrevida livre de evento
SLP	sobrevida livre de progressão
SP	sangue periférico
TLDA	do inglês <i>TaqMan Low Density Array</i>
TM	temperatura de melting

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA NA ERA DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica decorrente da expansão clonal de precursores hematopoiéticos primitivos [GREAVES, 1997], e constitui provavelmente a neoplasia hematológica mais extensamente estudada. O curso clínico da LMC é caracterizado por 3 estágios hematológicos e temporais diferentes. No estágio inicial chamado de fase crônica (FC), a doença tem um curso indolente e até pode ser assintomática. No entanto, se não tratada, este comportamento indolente muda drasticamente entre 1 e 4 anos após o diagnóstico, quando a doença evolui para uma fase acelerada (FA) e progride para uma fase aguda ou crise blástica (CB), caracterizada pela proliferação de células indiferenciadas que sofreram uma parada na maturação [HENDERSON *et al.*, 2002].

A alteração genética característica da LMC é uma translocação cromossômica recíproca entre a região q34 do cromossomo 9 e a região q11 do cromossomo 22, que em aproximadamente 95% dos casos resulta na presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph) [NOWELL & HUNGERFORD, 1960; ROWLEY, 1973]. Molecularmente, a t(9;22)(q34;q11) envolve os genes BCR (do inglês *Breakage Cluster Region*) e ABL (do inglês *Abelson Leukemia Virus*), gerando um gene de fusão que codifica uma proteína com atividade tirosina quinase constitutiva, cuja presença é condição necessária e suficiente para a transformação maligna [GROFFEN *et al.*, 1984; THIJSSEN *et al.*, 1999] (Fig. 1.1A).

Especificamente na LMC, as quebras dentro do gene BCR se localizam majoritariamente na região chamada *major-bcr* (M-bcr), conservando as sequências gênicas até o exon 13 ou 14 (anteriormente conhecido como b2 e b3). Contrariamente, as quebras no

gene ABL ocorrem em qualquer lugar *upstream* do exon Ib, *downstream* do exon Ia, ou entre estes 2 exons. Devido ao splicing alternativo do RNAm, a porção do BCR se funde quase que invariavelmente ao exon 2 do ABL, dando origem assim aos RNAm e13a2 ou e14a2 (b2a2 e b3a2, respectivamente) que levam à expressão de uma proteína de 210kD Bcr-Abl (p210<sup>Bcr-Abl</sup>) [MELO, 1996].

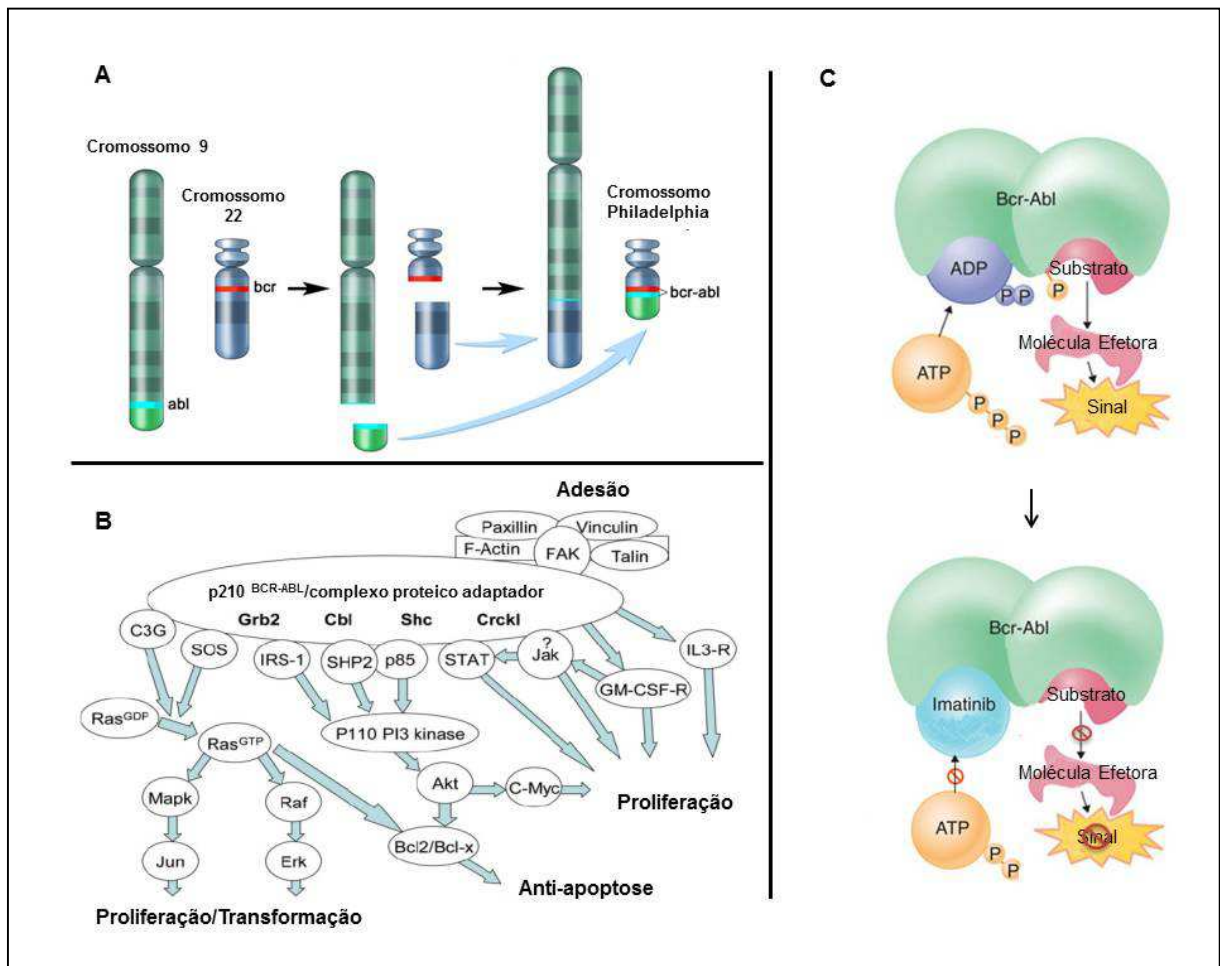
A atividade tirosina quinase constitutiva da proteína BCR-ABL desregula diversas vias de sinalização celular (Fig. 1.1B). Nas células BCR-ABL+, diversas proteínas são fosforiladas em resíduos de tirosina, por exemplo, proteínas adaptadoras do tipo Shc, proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição como STAT5, proteínas quinases como HCK (da família Src), e principalmente a própria BCR-ABL [DEININGER *et al.*, 2000]. A auto-fosforilação gera sítios de ancoragem em BCR-ABL que permitem a ligação de proteínas adaptadoras, como Grb2 e CrkL, que por sua vez, recrutam moléculas adicionais, tais como Gab2 e a subunidade reguladora p85 do fosfatidil inositol 3' quinase (PI3K).

O resultado global é a formação de um complexo de sinalização multimérica que é essencialmente mantido mediante interações dependentes de fosforilação de tirosinas, o que implica que a atividade de BCR-ABL é fundamental. A sinalização gerada a partir deste complexo ativa múltiplas vias, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e PI3K/AKT/mTor [MELO & DEININGER, 2004]. O resultado final é a inibição da apoptose, um aumento da proliferação celular e modificação dos padrões de adesão celular.

O transplante de células tronco hematopoiéticas alogênicas (alloTCTH) foi utilizado como terapia de primeira linha no tratamento da LMC por muitos anos, e ainda é considerado como a única modalidade terapêutica capaz de erradicar completamente a doença [VELDEN *et al.*, 2003]. Excluindo-se a doença enxerto contra hospedeiro, a recaída representa a principal causa de falha do tratamento, podendo-se reinduzir segundas remissões duradouras

com estratégias terapêuticas distintas, que incluem interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), infusões de linfócitos do doador e mais recentemente os inibidores da actividade tirosina quinase (ITK).

O desenvolvimento da primeira droga alvo-específica inibidora da atividade quinase, o Imatinibe (IM), modificou radicalmente o tratamento da LMC. O sucesso do IM reside na sua capacidade de inibir seletivamente a atividade da proteína BCR-ABL ocupando o local de união do ATP no domínio quinase (DQ), impossibilitando assim a mudança conformacional necessária para a ativação proteica e levando a morte celular [APPERLEY, 2007] (Fig. 1.1C).



**Figura 1.1: Formação do gene de fusão BCR-ABL e sua atividade quinase constitutiva.** **A:** Esquema da translocação entre os cromossomos 9 e 22, resultando na formação do cromossomo Philadelphia. **B:** Esquema das vias transdutoras de sinais envolvidas na transformação maligna na LMC. De uma forma geral, a atividade do BCR-ABL leva a uma desregulação da proliferação celular, apoptose e moléculas de adesão celular. **C:** Mecanismo de ação do imatinibe. O ITK se une a forma inativa da proteína BCR-ABL, competindo pelo sítio de união do ATP, impedindo a fosforilação dos diferentes substratos e, consequentemente, a transdução de sinais. Adaptado e modificado de MARLEY & GORDON, 2005; <http://www.stfrancisicare.org> e <http://www.d.umn.edu>.

O alcance das respostas obtidas com o IM superou todas as modalidades terapêuticas anteriores, em especial naqueles pacientes em que o IM foi administrado em FC precoce (FCP). Os excelentes resultados obtidos pelo estudo IRIS (do inglês *International Randomized Study of Interferon and STI571*), possibilitaram que o IM seja atualmente o medicamento indicado como primeira linha de tratamento para pacientes com LMC. Aos 18 meses, a taxa de obtenção da resposta citogenética completa (RCgC) foi de 76% para pacientes tratados com IM, em comparação com o 15% para pacientes tratados com IFN- $\alpha$  + cytarabina ( $P < 0.001$ ) [O'BRIEN *et al.*, 2003]. Após 7 anos de acompanhamento, os pacientes randomizados no braço do IM no estudo IRIS, que continuaram em uso do ITK, ainda apresentaram respostas duradouras satisfatórias: 86% de sobrevida global (SG), 81% de sobrevida livre de evento (SLE) e 93% de sobrevida livre de transformação (SLT). Além disso, 82% alcançaram uma RCgC, dos quais 17% a perderam durante o tratamento [O'BRIEN *et al.*, 2008].

A resposta terapêutica na LMC pode ser estabelecida em diferentes níveis de sensibilidade: análise morfológica ( $1 \times 10^2$  – uma célula tumoral em cada 100 células normais), Citogenética ( $1 \times 10^2$  – uma célula tumoral em cada 100 células normais) e Molecular ( $1 \times 10^6$  – uma célula tumoral em cada 1 milhão de células normais). Assim, de acordo com níveis crescentes de sensibilidade, a resposta terapêutica pode ser estabelecida como Resposta Hematológica (RH), Resposta Citogenética (RCg) ou Resposta Molecular (RM). Entretanto, a introdução dos ITK no tratamento da LMC fez necessário o estabelecimento de novos parâmetros para definição de resposta terapêutica, devido ao grande número de pacientes que atinge uma RCgC.

Assim, tornou-se imprescindível medir ou quantificar a carga tumoral para determinar a doença residual mínima (DRM). O desenvolvimento de metodologias moleculares

avançadas, como o PCR quantitativo em tempo real (q-PCR), possibilitou o estabelecimento da carga tumoral através da medição dos níveis de transcritos BCR-ABL no sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO) [GABERT *et al.*, 2003]. Os níveis crescentes de BCR-ABL mostraram-se preditivos da recaída pós-alotCTH e do desenvolvimento de resistência à terapia com IM [BRANFORD *et al.*, 2004]. Vários consensos foram propostos para o estabelecimento de uma abordagem laboratorial unificada que permita a comparação de resultados moleculares entre diferentes grupos de trabalho [GABERT *et al.*, 2003].

A proposta foi construir uma Escala Internacional (EI) para aferição dos níveis de BCR-ABL por q-PCR. Uma linha de base foi estimada a partir dos valores de RT-qPCR de um grupo de pacientes com LMC ao diagnóstico, sendo teoricamente considerada como equivalente a 100% de carga tumoral. Assim, uma redução de 3-log da linha de base (0,1%) equivale a uma RM Maior (RMM), valor que representa um importante fator preditivo da evolução clínica [HUGHES *et al.*, 2006; BACCARANI *et al.*, 2006]. Conseqüentemente, a introdução destas novas técnicas moleculares no acompanhamento do paciente com LMC, tem permitido a re-estratificação dos pacientes que alcançaram uma RCgC de acordo com os níveis da RM, possibilitando a reorientação terapêutica e aumentando o sucesso do tratamento pela possibilidade de intervenção precoce.

Em 2006, um painel de “*experts*” elaborou uma série de recomendações para o acompanhamento de pacientes com LMC tratados com IM em primeira linha, que foram amplamente aceitas pela comunidade médico-científica [BACCARANI *et al.*, 2006 em nome da LeukemiaNet]. Além de uniformizar as definições de RH, RCg e RM, foram estabelecidos parâmetros operacionais indicativos e/ou preditivos de falha terapêutica e de uma resposta sub-ótima (Tabela 1.1). Em fins de 2009, foi publicada uma revisão destes parâmetros, onde foi incluída a definição de uma resposta ótima e a utilização da monitoração molecular, assim

como os dados obtidos pela incorporação à clínica dos ITK de segunda geração (ITK-2G) [BACCARANI *et al.*, 2009].

**Tabela 1.1: Definição de respostas e parâmetros operacionais para pacientes com LMC recém diagnosticados tratados com IM em primeira linha segundo a LeukemiaNet 2006 e 2009**

	Resposta Hematológica	Resposta Citogenética	Resposta Molecular	
<b>Definições</b>	RHC: Plaquetas <450 10 <sup>9</sup> /L Leucócitos <10 <sup>9</sup> /L Diferencial sem granulócitos imaturos e menos de 5% de basófilos Sem esplenomegalia	RCgC: 0% Ph RCgP: 1%-35% Ph RCgMe: 36%-65% Ph RCgMi: 64%-95% Ph RCgN: > 95% Ph RCgM: RCgC+RCgP	RMC: indica transcritos BCR-ABL não-quantificáveis e não-detectáveis. RMM: ≤ 0.10	
Tempo	Resposta Ótima	Falha Terapêutica	Resposta Sub-ótima	Atenção
<b>Diagnóstico</b>	NA	NA	NA	Alto risco, del9q+, ACAs nas células Ph+
<b>3 meses</b>	RHC e ≤65% Ph+	Não RH (doença estável ou progressão) Menor RHC	Menor que RHC Não RCg (>95%)	NA
<b>6 meses</b>	≥35% Ph+	Menor que RHC, não RCg (Ph+ >95%)	Menos que RCgP (Ph+ > 35%)	NA
<b>12 meses</b>	RCgC (0%Ph+)	Menor que RCgP (Ph+ > 35%)	Menor que RCgC	Menor que RMM
<b>18 meses</b>	RMM	Menor que RCgC	Menor que RMM	NA
<b>Qualquer tempo</b>	RMM estável ou melhorando	Perda RHC*, perda de RCgC†, mutação‡	ACA em célula sPh+ §, perda de RMM§, mutação	Qualquer aumento no nível de transcritos, outras alterações cromossômicas nas células Ph+

RHC: resposta hematológica completa; Ph: cromossomo Philadelphia; RCgC: resposta citogenética completa; RCgP: resposta citogenética parcial; RCgMe: resposta citogenética menor; RCgMi: resposta citogenética mínima; RCgN: resposta citogenética nula; RCgM: resposta citogenética maior, considerada como a RCgC + RCgP; RMC: resposta molecular completa; RMM: resposta molecular maior; NA: não aplicável; ACA: alterações cromossômicas adicionais; RH: resposta hematológica; \*confirmado em 2 ocasiões, a menos que se associe progressão a fase acelerada ou crise blástica; †confirmado em 2 ocasiões, a menos que se associe com perda de RHC ou progressão; ‡alto nível de resistência IM; §confirmado em 2 ocasiões, a menos que se associe com perda da RHC ou da RCgC; ¶ alto nível de resistência ao IM.

A eficácia na predição do comportamento clínico destes parâmetros foi validada num estudo monocêntrico, onde pacientes foram classificados de acordo à resposta ao IM como “falha” ou “não-falha”, de acordo aos 4 pontos temporais propostos pela LeukemiaNet e apresentados na Tabela 1.1. Este estudo demonstrou uma excelente correlação entre tempo de alcance das respostas e progressão da doença, fortalecendo ainda mais as recomendações da LeukemiaNet [MARIN *et al.*, 2008].

Em particular, o alcance da RCgC se mostrou um dos pilares preditivos da resposta terapêutica. Entretanto, ainda que estes parâmetros temporais tenham-se mostrado muito úteis



e eficazes na predição do comportamento clínico, sabe-se que existe um grupo de pacientes que alcançam as respostas almeçadas mais tardiamente, os chamados “respondedores tardios”. Diversos trabalhos mostram que o fato de atingir respostas ótimas mais tardiamente se correlaciona com uma maior possibilidade de desenvolver resistência e falhar à terapia [O'BRIEN *et al.*, 2003; CORTES *et al.*, 2005; QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2009].

Entretanto, o comportamento dos respondedores tardios ainda precisa ser elucidado, principalmente naqueles pacientes que receberam IM em fase crônica tardia (FCT), já que não está claro se nestes pacientes respostas tardias e estáveis também se traduzem em um prognóstico desfavorável [HOCHHAUS *et al.*, 2008a; IACOBUCCI *et al.*, 2006a]. Em um estudo realizado em pacientes com LMC em FCT tratados com IM, foi observado que a proporção de RCgC estável foi similar entre pacientes que atingiram a RCgC em até 12 meses e aqueles que a atingiram mais tardiamente (80% vs 75%) [PALANDRI *et al.*, 2008].

O interesse pelo comportamento das respostas destes pacientes é ainda substancial, já que eles ainda representam um grupo considerável em países onde o IM foi disponibilizado mais tardiamente. Este é o caso do Brasil, onde os pacientes com LMC-FC do sistema público de saúde puderam fazer uso do IM como primeira linha de tratamento somente ao final de 2008. Neste contexto, o conhecimento do comportamento das respostas nos pacientes com LMC-FCT, sua estabilidade e duração são parâmetros importantes a ser considerados para o correto manejo da terapia com ITK, mas ainda se considerada a opção atual de utilizar ITK-2G.

Atingir as respostas consideradas ótimas (RCgC aos 12 meses e/ou RMM aos 18 meses de IM) tem sido associado com um melhor desfecho clínico e, ainda que os pacientes que alcançam tais respostas mais tardiamente possam apresentar também excelentes resultados clínicos, estes últimos enfrentam o problema da competição entre a probabilidade de melhorar

suas respostas ou progredir para a FA [CORTES, 2008]. Assim, a obtenção das respostas consideradas ótimas no menor tempo possível seria um objetivo a ser perseguido, embora ainda não esteja claro se a velocidade com a qual uma resposta é alcançada se traduz em uma vantagem para a resposta terapêutica futura.

Por outro lado, o valor preditivo da resposta molecular ainda é um ponto de discussão. A obtenção da RMM tem sido amplamente descrita como um importante *endpoint* associado à manutenção da RCgC, e conseqüentemente, com a resposta à terapia com IM [PASCHKA *et al.*, 2003; IACOBUCCI *et al.*, 2006b; PRESS *et al.*, 2007]. Após 18 meses de IM, a probabilidade de perder a RCgC quando associada a RMM foi 0%, comparado com 25% para o grupo com RCgC mas sem RMM [MARIN *et al.*, 2008].

Alguns estudos também demonstraram uma vantagem na sobrevida livre de evento (SLE) e de transformação de pacientes que apresentam RCgC associada a RMM, quando comparados com aqueles com RCgC sem RMM [HUGHES, 2003; HEHLMANN *et al.*, 2011]. Em uma análise recente dos dados moleculares do estudo IRIS, foi relatado que pacientes que alcançaram uma RMM em até 18 meses de IM apresentaram respostas duradouras, com 95% de probabilidade de SLE e 3% de probabilidade de perda da RCgC, enquanto isto foi observado em 26% dos pacientes que não alcançaram uma RMM após 7 anos ( $p < .001$ ) [HUGHES *et al.*, 2010].

Entretanto, outros estudos não confirmaram diferenças significativas na sobrevida global (SG) e sobrevida livre de progressão (SLP) para os pacientes que atingem uma RMM. Em um estudo retrospectivo de uma coorte de 224 pacientes com LMC tratados com IM, MARIN e colaboradores não confirmaram o valor da RMM aos 12 ou 18 meses como indicador positivo da SLP após 5 anos. Da mesma maneira, DE LAVALLADE e colaboradores não observaram diferenças na SG e/ou SLP nos pacientes com RCgC com

RMM em comparação aqueles sem RMM [MARIN *et al.*, 2008; DE LAVALLADE *et al.*, 2008]. Assim, se e como a obtenção da RMM se traduz em um benefício clínico adicional quando associada a uma RCgC ainda precisa ser melhor compreendido.

Outros pontos de grande interesse para os pacientes com LMC tratados com ITK constituem a estabilidade da RMM e a rapidez com que esta é alcançada. PALANDRI e colaboradores descrevem que 96% dos pacientes com RMM estável ao longo do tempo sustentam sua RCgC, enquanto isto ocorre com 79% daqueles que apresentaram uma RMM oscilante ou instável [PALANDRI *et al.*, 2009]. Resultados similares foram relatados pelo grupo do MD Anderson Cancer Center, em um grupo de 276 pacientes com LMC tratados com altas doses de IM: uma RMM duradoura e estável (RMM por >12 meses) foi associada com uma maior SLP [KANTARJIAN *et al.*, 2008].

A rapidez na obtenção da RMM correlaciona-se com uma maior probabilidade de alcançar uma resposta molecular completa (RMC): pacientes com LMC que atingiram a RMM após 9 meses de tratamento com IM têm 93% de probabilidade de evoluir para uma RMC. Alcançar uma RMC poderia ser considerado o *endpoint* ideal, já que foi sugerido que em alguns pacientes atingir uma RMC está associado a respostas mais duradouras [PRESS *et al.*, 2007; BRANFORD *et al.*, 2007].

Mais ainda, a perspectiva de alcançar uma RMC é importante frente à possibilidade de suspender o IM em pacientes que apresentam uma RMC estável. Recentemente, foi realizado na França um estudo clínico, onde o *endpoint* primário foi avaliar a persistência de remissão molecular após descontinuação do IM. O estudo STIM (do inglês *Stop Imatinib Trial*), mostrou que 50% dos pacientes que atingiram uma RMC e a mantiveram por pelo menos 2 anos, ainda a mantêm após descontinuar o IM [MAHON *et al.*, 2010]. Ainda que metade dos

pacientes que suspenderam o medicamento continuam apresentando RMC, a descontinuação do IM não é recomendada fora de estudos clínicos.

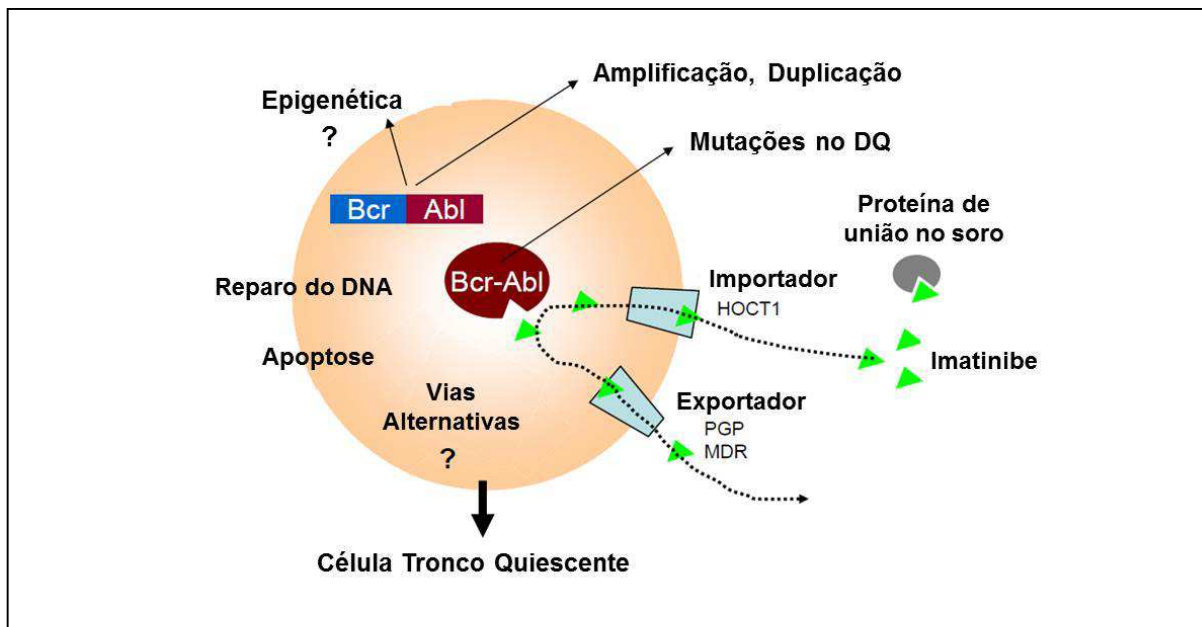
## 1.2 A HETEROGENEIDADE DOS MECANISMOS SUBJACENTES À RESISTÊNCIA AOS ITK

A pesar dos excelentes resultados observados com o tratamento com ITK em pacientes com LMC, a resistência á terapia é um problema clínico crescente. Ainda que observada principalmente em pacientes em FA ou CB, aproximadamente 35% dos pacientes com LMC em FC desenvolvem resistência ou intolerância ao IM. Assim, atualmente um dos grandes desafios é reconhecer precocemente o paciente que irá falhar ao ITK, possibilitando a reavaliação precoce da estratégia terapêutica [GOLDMAN, 2009].

A resistência ao IM pode ser classificada como primária (ou refratária) quando existe falha em atingir uma resposta inicial, ou como secundária quando a resposta previamente obtida durante o tratamento é perdida. Com base nas recomendações atuais propostas pela LeukemiaNet, resistência primária ao IM é definida como uma falha para alcançar uma RHC aos 3 meses, qualquer RCg aos 6 meses, RCgP aos 12 ou uma RCgC aos 18 meses de IM [BACCARANI *et al.*, 2006; 2009].

A procura pelo entendimento dos mecanismos subjacentes ao aparecimento da resistência aos ITK tem-se intensificado na última década, sendo identificados mecanismos tanto dependentes quanto independentes de BCR-ABL. Dentre os descritos, encontram-se a sobre-expressão do gene *MDR-1* (do inglês *Multi Drug Resistance-1*) e a amplificação do próprio BCR-ABL [GORRE *et al.*, 2001; BARNES *et al.*, 2005]. Foi relatado que variações na absorção gastrointestinal e no metabolismo poderiam também afetar as respostas, assim como o influxo–efluxo celular do medicamento, defeitos nos mecanismos de apoptose ou de

reparo celular, e o desenvolvimento de vias alternativas de transdução de sinais [APPERLEY, 2007] (Fig. 1.2).



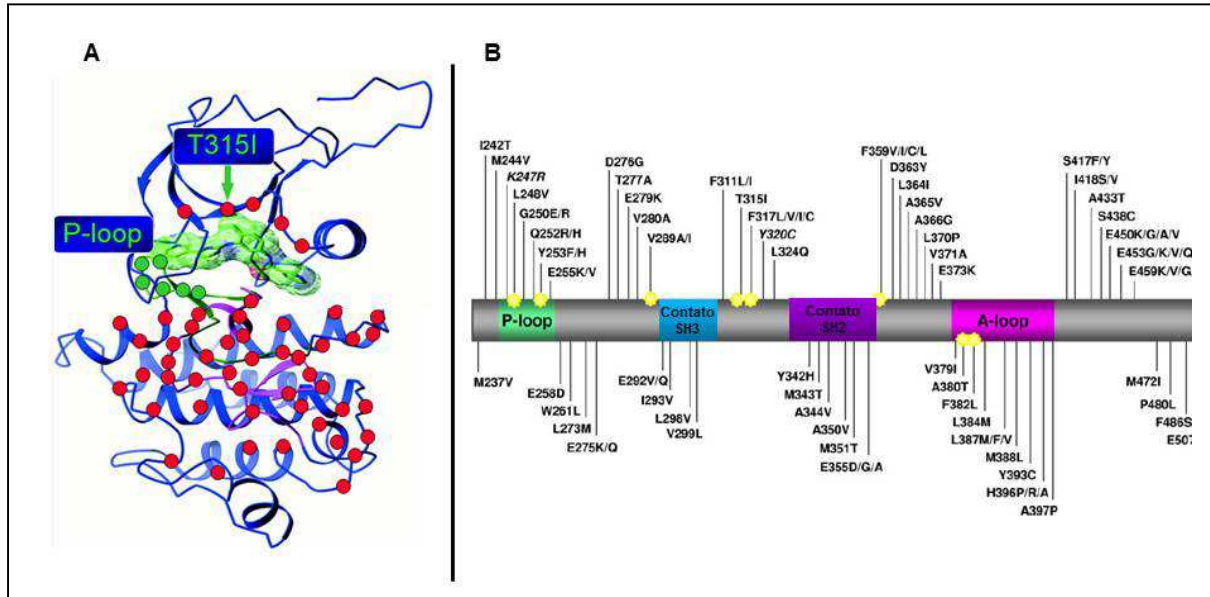
**Figura 1.2: Mecanismos propostos relacionados à resistência aos ITKs.** Os mecanismos dependentes de BCR-ABL incluem amplificação ou duplicação gênica e mutações no domínio quinase da porção do gene ABL. Mecanismos alternativos independentes de BCR-ABL incluem transporte do medicamento dentro da célula e no plasma, persistência de células tronco leucêmicas, ativação de vias de sinalização complementares, defeitos nos mecanismos de reparo do DNA e de regulação da apoptose e, mais recentemente, mudanças epigenéticas. DQ: domínio quinase do gene BCR-ABL. Adaptado e modificado de ROYCHOWDHURY & TALPAZ, 2011.

Contudo, a presença de mutações no DQ da proteína BCR-ABL tem sido apontado como o principal fator relacionado com o aparecimento da resistência. Descritas pela primeira vez em 2001, as mutações no DQ constituem sem dúvida o mecanismo mais amplamente estudado. GORRE e colaboradores estudaram 11 pacientes com LMC-CB ou leucemia linfóide aguda (LLA) resistentes ao tratamento com IM, e em 6 dos 9 casos analisados foi observada a mutação pontual C>T no nucleotídeo 944, que resulta em uma mudança de aminoácido na posição 315, designada como T315I [GORRE *et al.*, 2001].

A treonina da posição 315 forma uma ligação de hidrogênio crucial com o IM, e a ausência de um átomo de oxigênio na isoleucina impede a formação dessa ponte, desestabilizando a estrutura. Além disso, o volume maior da isoleucina induz um choque

estérico com o IM, o que levou a chamar o resíduo 315 de “gatekeeper” do IM [APPERLEY, 2007]. Até o momento a mutação T315I é a que representa o maior desafio clínico-científico, já que é a única que confere resistência total ao IM e aos ITK-2G. Esta mutação aparece em aproximadamente 15% dos pacientes com leucemia Ph+ que apresentam resistência ao IM e sua presença foi correlacionada com uma diminuição das respostas e da SLP [HAYETTE *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*, 2009a].

As mais de 100 mutações já descritas acometem diversos resíduos de aminoácidos localizados ao longo de todo o DQ envolvendo, por exemplo, o domínio de ativação (A-loop, aminoácidos 381-402 da porção do gene ABL), o domínio de ligação ao fosfato (P-loop, aminoácidos 244-255), e o domínio catalítico (aminoácidos 350-363) [BRANFORD *et al.*, 2002] (Fig. 1.3).



**Figura 1.3: Mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL.** **A:** O esquema tridimensional do domínio quinase mostra a localização do imatinibe em verde. O P-loop é indicado com círculos verdes, e a localização de mais de 60 mutações clinicamente descritas mostra-se com círculos vermelhos. O local da mutação T315I também é indicado. **B:** Mapa do domínio quinase do BCR-ABL indicando as substituições de aminoácidos reportados como resistentes ao imatinibe. P-loop: sítio de união ao fosfato; SH2 e SH3: regiões de contato com proteínas portadoras de domínios SH2 e SH3; A-loop: domínio de ativação. K247R e Y320C foram reportados como SNPs. As estrelas amarelas indicam posições de aminoácidos chave para a união do IM. Adaptado e modificado de SCHINDLER *et al.*, 2000; SOVERINI *et al.*, 2011.

Na conformação inativa, a ativação do *A-loop*, principal elemento regulador do DQ, bloqueia o centro catalítico. Mutações no *A-loop* desestabilizam a estrutura e impossibilitam adotar uma conformação inativa, essencial para o funcionamento do IM. O *P-loop* é um domínio altamente conservado, rico em glicina, que se dobra sobre o IM quando o *A-loop* se une ao medicamento através de pontes de hidrogênio e ligações van der Waals [APPERLEY, 2007]. Alguns estudos têm sugerido que as mutações do *P-loop* teriam particularmente um prognóstico adverso, enquanto outros trabalhos mais recentes não confirmam estes achados. Assim, a incidência, frequência e implicação prognóstica das diferentes mutações ainda é uma questão em aberto, podendo ser influenciada por muitos fatores [BRANFORD *et al.*, 2003; JABBOUR *et al.*, 2006; NICOLONI *et al.*, 2007].

Recentemente, foram relatados pacientes portadores de uma mesma mutação apresentando comportamento clínico diferenciado [SOVERINI *et al.*, 2006b; JABBOUR *et al.*, 2008; ESKAZAN *et al.*, 2011], e alguns trabalhos que analisaram a cinética dos clones mutado em comparação com clones não mutado de pacientes com LMC, mostraram que o aumento do alelo mutado nem sempre está relacionado ao aparecimento da resistência [KHORASHAD *et al.*, 2006]. Em conjunto, estas observações evidenciam que a presença de uma mutação não seria condição única e absoluta para o aparecimento de resistência ao tratamento com ITKs, e que a quantificação da mutação poderia ser importante durante o acompanhamento de pacientes portadores de mutação no DQ em algumas situações. Assim, o estudo de grupos de pacientes com uma mesma mutação é crucial para tentar elucidar o real valor das mutações no status da resistência aos ITKs.

Diferentes ensaios realizados *in vitro* mostraram que as mutações conferem diferentes níveis de resistência, variando segundo a localização e tipo de mutação [AZAM *et al.*, 2003; O'HARE *et al.*, 2007; RADAELLI *et al.*, 2009]. Os ITK-2G, como Dasatinibe e Nilotinibe,

foram especialmente desenvolvidos para tentar superar a resistência associada ao IM. Mais potentes, seriam capazes de eliminar 80 - 95% dos clones mutados [O'HARE *et al.*, 2007]. No entanto, trabalhos que analisaram o valor preditivo da presença de mutações para o sucesso do tratamento com ITK-2G, mostraram que as taxas de resposta são semelhantes para pacientes com ou sem mutações, evidenciando assim a complexidade do fenômeno de resistência [KHORASHAD *et al.*, 2008a; MÜLLER *et al.*, 2009a; BRANFORD *et al.*, 2009].

Por outro lado, ainda que a expansão de clones com mutações no DQ seja claramente um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de resistência ao IM, estas mutações ocorrem em 30–60% dos pacientes resistentes, variando segundo a série analisada. Assim, tem ficado cada vez mais evidente que a falta de resposta ao tratamento com ITKs depende de mecanismos muito heterogêneos, e de que outros parâmetros BCR-ABL-independentes seriam relevantes e devem ser estudados.

Além disso, a questão da definição de resistência propriamente dita parece ser mais complexa do que a simples perda de uma resposta predefinida ou o fato de não atingir as respostas almejadas nos tempos propostos. Ainda mais difíceis de classificar seriam os pacientes que claramente atingem uma RMM, mas que nunca alcançam uma RMC (RT-PCR-*nested* e RT-qPCR negativos), sendo sempre detectado um nível basal de transcritos. Em teoria, estes pacientes também poderiam ser considerados de alguma forma resistentes [APPERLEY, 2007]. Assim, pareceria provável que os mecanismos envolvidos na resistência aos ITKs (ou uma combinação dos mesmos), sejam diferentes em grupos de pacientes com LMC de acordo com a variação do alcance da resposta molecular.

Ao que parece, o sucesso na reversão do quadro de resistência aos ITKs apenas será possível através do entendimento de todos os mecanismos moleculares envolvidos e de como estes interactivam entre eles no contexto da fisiologia da célula neoplásica.



### 1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS NAS NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS: O PAPEL DOS MICRO-RNAS NA LMC

O papel na tumorigenese das alterações genéticas, tais como mutações, deleções e translocações, é bem conhecido [HANAHAN & WEINBERG, 2000]. Porém, nos últimos anos, fortes evidências demonstram que os processos epigenéticos também desempenham um papel central no processo neoplásico [JONES & LAIRD, 1999; ESTELLER, 2002; HERMAN & BAYLIN, 2003]. O termo “epigenética” se refere a mudanças estáveis na expressão gênica que não envolvem alterações na sequência primária de nucleotídeos (nt) [GALM *et al.*, 2006]. Dentre os mecanismos mais estudados, se destacam a metilação do DNA e a modificação post-translacional das histonas, como acetilação e ubiquitinação [TOYOTA & ISSAB, 2005; RICE *et al.*, 2007]. Contudo, mais recentemente, pequenos RNAs não codificantes têm surgido como mais um mecanismo epigenético atuante na fisiologia do câncer.

A metilação do DNA caracteriza-se pela adição de um grupo metil no carbono 5 das citosinas. Aproximadamente, 1% das bases do genoma humano são 5-Metilcitosinas localizadas no contexto de dinucleotídeos CpG, que estão distribuídos numa forma não-randomica dentro do genoma [GARDINER-GARDEN & FROMMER, 1987]. As regiões ricas em dinucleotídeos CpG, chamadas de ilhas CpG, localizam-se principalmente nos promotores gênicos, podendo ser encontradas também ao início da sequência codificante ou nos primeiros introns, onde alguns genes possuem importantes sequências reguladoras da transcrição [HERMAN & BAYLIN, 2003; ESTELLER, 2005]. De uma forma geral, as células neoplásicas se caracterizam, por um lado, por uma hipometilação global, e por outro, pela hipermetilação de ilhas CpGs localizadas em promotores gênicos cujo silenciamento é importante na patogênese da neoplasia [FEINBERG *et al.*, 1988; EHRLICH, 2002].

Padrões anormais de metilação do DNA têm sido reconhecidos em diferentes tipos de tumores sólidos [FEINBERG *et al.*, 1983; ESTELLER *et al.*, 1999; ESTELLER *et al.*, 2000; VARAMBALLY *et al.*, 2002; SELIGSON *et al.*, 2005; MAUNAKEA *et al.*, 2010; HANSEN *et al.*, 2011]. Assim, os estudos do metiloma (padrão de metilação do genoma inteiro) de diferentes neoplasias têm-se intensificado nos últimos anos, no intuito de se demarcar os mecanismos moleculares subjacentes ao perfil de metilação de cada tumor. Da mesma maneira, o silenciamento da expressão gênica mediado por metilação foi descrito também em diversas neoplasias hematológicas, incluindo vários tipos de leucemias [MELKI *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2000; TOYOTA *et al.*, 2001; GARCIA-MANERO *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2003; ESTELLER, 2003; ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2004].

Especificamente na LMC, vários trabalhos têm analisado o estado de metilação de genes envolvidos em diferentes vias de sinalização celular, visando relacionar a metilação com as diferentes fases da doença ou até mesmo com a progressão [NELKIN *et al.*, 1991; HERMAN *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2001; NAGY *et al.*, 2003; ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2005; ORTMANN *et al.*, 2005; AGIRRE *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006]. Entretanto, ainda se conhece muito pouco sobre o perfil de silenciamento gênico produzido pelos mecanismos de metilação na LMC e sua relação com o fenômeno de resistência aos ITKs.

Após a era do sequenciamento de genoma inteiro, as técnicas para estudos de larga escala foram direcionadas para desenvolver abordagens que permitissem determinar o catálogo completo das sequências transcritas por um organismo. Até muito recentemente, a descrição de um transcriptoma (conjunto de todos os transcritos em uma célula) era essencialmente limitada à caracterização dos produtos de transcrição de genes conhecidos, principalmente RNAs mensageiros, além de alguns RNAs não codificantes (RNAnc), tais como RNAs de transferência e pequenos RNAs nucleares.

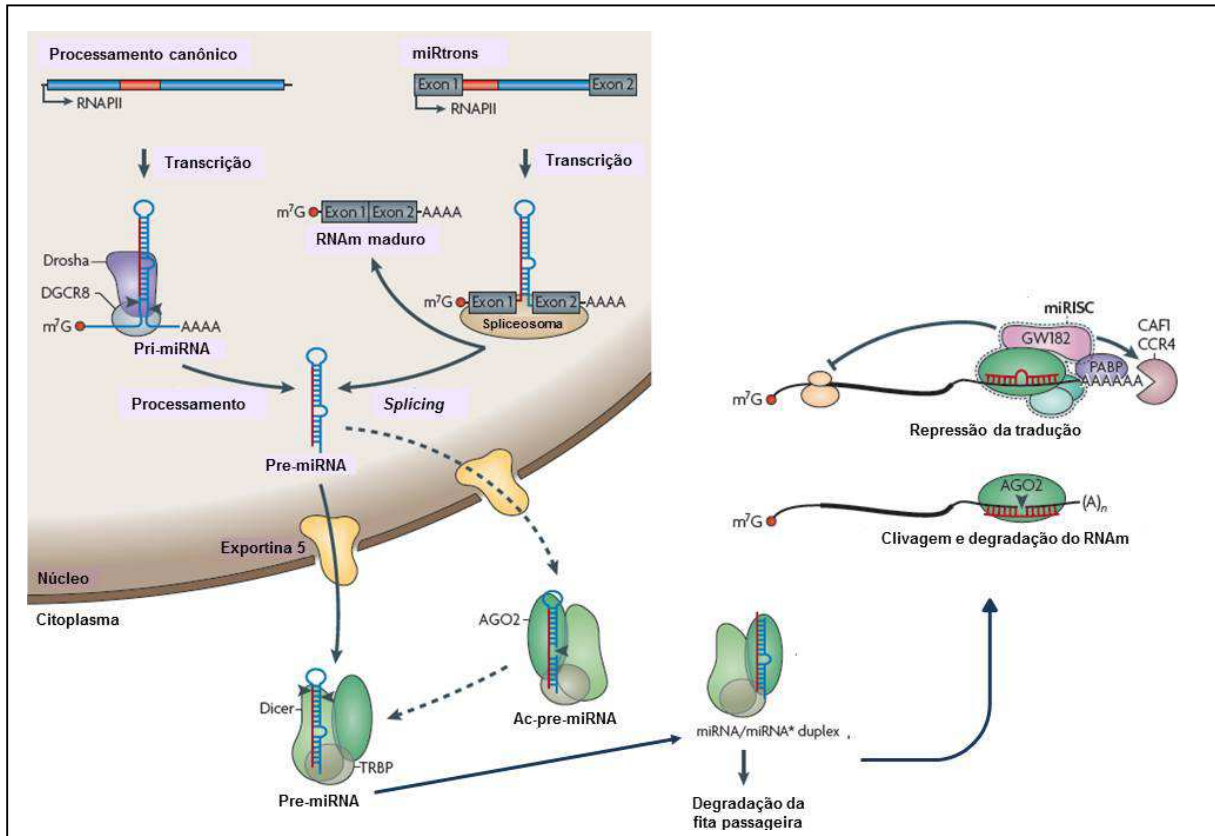
No entanto, níveis inesperados de complexidade começaram a surgir. Em 1993, foi descoberto que a expressão da proteína LIN14 em *Caenorhabditis elegans* era regulada por um pequeno RNA codificado pelo gene *lin-4* [LEE *et al.*, 1993; WIGHTMAN *et al.*, 1993]. No entanto, somente no ano de 2000, quando outro RNA pequeno, o *let-7*, foi identificado e demonstrado ser altamente conservado em várias espécies, que um novo cenário da regulação da expressão gênica foi revelado [REINHART *et al.*, 2000; PASQUINELLI *et al.*, 2000].

O desenvolvimento de novas tecnologias, como os *arrays* de alta resolução e, mais recentemente, as técnicas de sequenciamento de alta resolução para RNA (*RNAseq*) possibilitaram entender que o transcriptoma dos eucariotos superiores é ainda mais complexo do que imaginado, e que a transcrição não é restrita apenas às regiões do genoma que contêm genes com funcionalidade bem definida. Assim, foram descritas outras muitas espécies de RNAnc, como os endo-siRNA (do inglês *endogenous small interfering RNA*), exo-siRNA (do inglês *exogenous small interfering RNA*) e os microRNAs (miRNAs) [GHILDIYAL & ZAMORE, 2009].

Os miRNAs são pequenos RNAnc de cadeia simples de aproximadamente 22 nt de comprimento, altamente conservados entre plantas, invertebrados e vertebrados [AMBROS, 2003]. O descobrimento de que os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica em diversos organismos eucariotos, revolucionou os princípios biomoleculares clássicos. Esta nova classe de genes reguladores constitui um mecanismo de silenciamento post-transcricional, que atua através do reconhecimento de sequências específicas no RNA alvo [FIRE *et al.*, 1998].

De uma forma geral, os miRNAs são transcritos como precursores primários (pri-miRNA) que logo são clivados pelo complexo enzimático Drosha-DGCR8/Pasha6 para formar um pre-miRNA de 70-100 nt (Fig. 1.4). Uma vez translocados ao citoplasma, os pre-

miRNAs são processados para obter miRNAs maduros de fita dupla de 19-24 nt, que se mantêm unidos ao complexo protéico RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*) até reconhecer sua sequência alvo [LUND *et al.*, 2004; BARTEL *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2005].



**Figura 1.4: Biogênese dos miRNAs.** Os miRNAs são processados a partir de transcritos gerados pela RNAPII a partir de genes independentes ou de íntrons de genes codificadores de proteínas. Na via canônica, o processamento do precursor primário (pri-miRNA) ocorre em 2 etapas, catalisadas por dois membros da família RNase III, Drosha e Dicer, operando em complexos com proteínas de união a dsARN (dsRBPs), por exemplo, DGCR8 e TRBP em mamíferos. No núcleo, o complexo Drosha-DGCR8 processa o pri-miRNA em um precursor de ~70nt (pré-miRNA), que é exportado para o citoplasma. Alguns pré-miRNAs são produzidos a partir de íntrons muito curtos (mirtrons) como resultado de splicing e/ou desmache, abolindo o passo pelo Drosha-DGCR8. De qualquer maneira, a clivagem pela Dicer, assistida pela TRBP no citoplasma produz um duplex miRNA/miRNA\* de ~20pb. Nos mamíferos, Argonaute2 (AGO2), uma potente endonuclease RnaseH-like, suporta o processamento da Dicer clivando o braço 3' de alguns pré-miRNAs, formando assim intermediário chamado precursor miRNA AGO2-clivado (pré-ac-miRNA). Em seguida, uma fita do duplex miRNA/miRNA\* (miRNA) é incorporada em um complexo de silenciamento-induzida via miRNA (miRISC), enquanto que o outro filamento (fita passageira ou miRNA\*) é liberado e degradado. Geralmente, a fita retida é a que tem o extremo 5' menos estável no miRNA/miRNA\*. GW182: proteína glicina-triptofano; m7G: 7-metilguanossina-cap; PABP: proteína de ligação poli-A. Adaptado e modificado de KROL *et al.*, 2010.

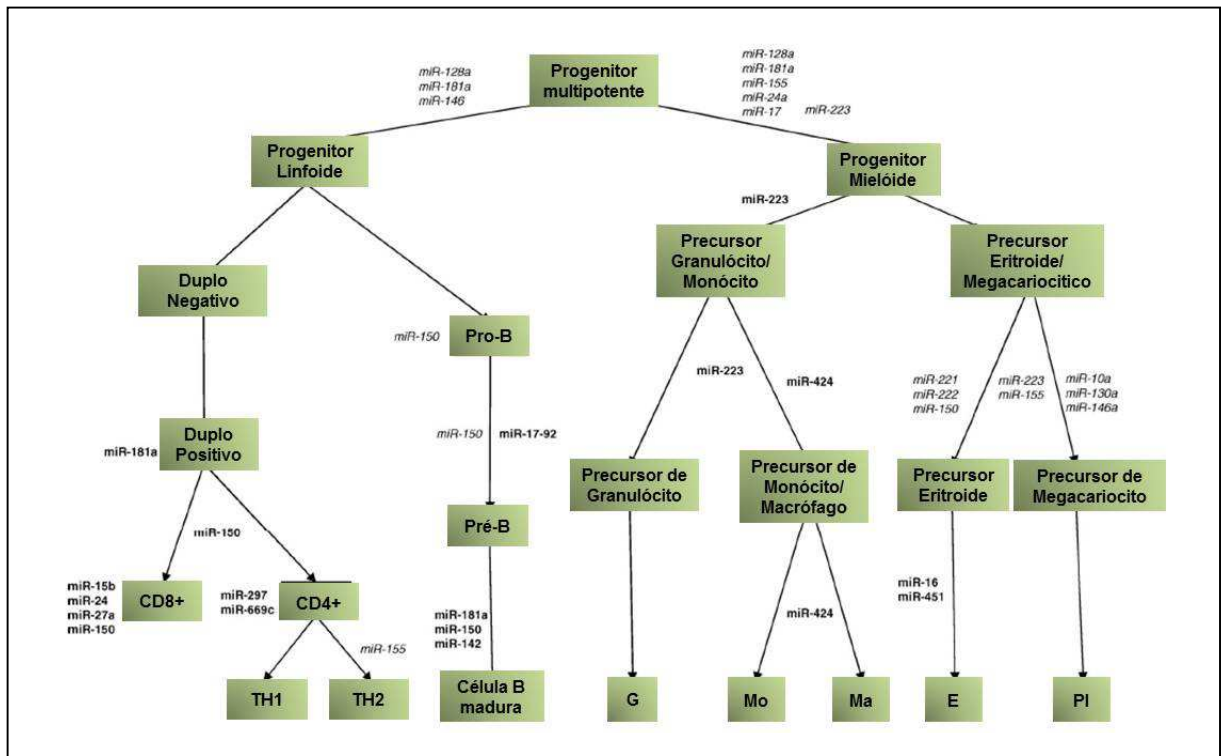
Os genes dos miRNAs têm sido identificados em todos os cromossomos humanos, tanto como sequências independentes com promotor próprio quanto em introns de genes

codificantes, podendo encontrar-se ou não agrupados em transcritos policistronicos [RODRIGUEZ *et al.*, 2004; WEBER, 2005; ALTUVIA, 2005]. Até hoje, foram identificados mais de 650 miRNAs no genoma humano, e estima-se que aproximadamente 30% dos genes codificantes sejam regulados por eles [LEWIS *et al.*, 2005; GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2006]. O papel dos miRNAs na fisiologia celular ainda não é bem entendido, tendo sido descrito em diversos processos celulares, como diferenciação, ciclo e metabolismo celular [BARTEL *et al.*, 2004; PASQUINELLI *et al.*, 2005; BOEHM *et al.*, 2006; CARLETON *et al.*, 2007].

Diversos trabalhos mostraram que cada tecido normal possui um único e específico perfil de miRNAs, ou miRNAoma, e que este conceito poderia ser aplicado a tipos de neoplasias diferentes [LIU *et al.*, 2004; HE *et al.*, 2004]. No tecido hematopoiético, vários miRNAs parecem ter um papel regulador central na diferenciação de cada linhagem hematopoiética, e cada tipo celular teria um perfil característico de miRNAs [LAWRIE, 2007]. Assim, foi proposto, por exemplo, que os miR-128a e -181a regulam a diferenciação do progenitor multipotente, direcionando tanto para a formação de progenitores mielóides quanto de progenitores linfóides. No entanto, o miR-146 inibiria o comprometimento linfóide em estádios precoces, e os miR-155, -24a e -17 o comprometimento mielóide [GEORGANTAS *et al.*, 2007] (Fig. 1.5). Durante a diferenciação mielóide, o miR-16, miR-103 e miR-107 foram preditos de inibir o comprometimento precoce para granulocitos/macrófagos, enquanto que o miR-223 exerce um papel central na regulação da granulopoiese, estando super-expresso nesta linhagem [FAZI *et al.*, 2005; GEORGANTAS *et al.*, 2007].

Por outro lado, foi observado que a expressão ectópica do miR-150 (expresso seletivamente em células B e T maduras, mas não em seus progenitores), em células tronco murinas e em seus progenitores, reduz significativamente os níveis de células B maduras circulantes, em linfonodos e no baço, sem afetar os níveis de células T e os da serie mielóide

[MONTICELLI *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2007]. Este efeito na ontogenia da célula B poderia ser explicado por um bloqueio na transição do estadió pro-B ao estadió pre-B [ZHOU *et al.*, 2007]. Assim, estes achados revelam o papel central da regulação mediada por miRNAs no sistema hematopoiético.



**Figura 1.5: Expressão de miRNAs na Hematopoiese.** A figura mostra quais miRNAs estão envolvidos na hematopoiese, e como sua expressão varia durante a diferenciação do progenitor multipotente nas diferentes linhagens. **miRNAs**: alta expressão; **miRNAs**: baixa expressão. CD8+: linfócito T CD8; CD4+: linfócito T CD4; TH1: linfócito T-helper 1; TH2: linfócito T-helper 2; G: granulócito; Mo: monócito; Ma: macrófago; E: eritrócito; PI: plaquetas. Adaptado e modificado de FABBRI *et al.*, 2009.

Interessantemente, os genes dos miRNAs localizam-se frequentemente em regiões do genoma associadas ao câncer, como por exemplo, dentro ou perto de oncogenes ou genes supressores de tumor. Esta associação constituiu a primeira evidência forte do envolvimento dos miRNAs em processos neoplásicos [CALIN *et al.*, 2004]. Evidências crescentes sugerem que os miRNAs tem um papel importante na patogênese de diferentes neoplasias hematológicas, e que em alguns casos poderiam estar envolvidos com o prognóstico da doença [BRYANT *et al.*, 2009].

Alguns miRNAs aparecem com baixa expressão, enquanto outros são sobre-expressos, desta maneira é proposto que alguns miRNAs podem atuar como genes supressores de tumor ou alternativamente como oncogenes (oncomiRs) [LU *et al.*, 2005]. Na leucemia linfoblástica aguda (LLA) foi observado uma sobre-expressão do *cluster* miR-17-92, associado também com uma função oncogenica em diversos tumores [ZANETTE *et al.*, 2007]. Outros trabalhos identificaram assinaturas diferentes de miRNAs para LLA e para leucemia mieloide aguda (LMA), relatando que através de apenas 4 miRNAs (miR-128a, -miR-128b, miR-let-7b e miR-223) é possível diferenciar a linhagem em leucemias agudas ao diagnóstico com uma acurácia de 98% [MI *et al.*, 2007].

Outros relatos recentes têm identificado assinaturas de miRNA associadas com translocações envolvendo a região 11q23, trisomia do cromossomo 8 e mutações do gene *FLT3* (do inglês, *FMS-like tyrosine kinase 3*). Da mesma forma, um perfil específico de miRNA foi associado com o estado mutacional do gene *NPM1* (do inglês *Nucleophosmin-1*) e do gene *FLT3* em pacientes com LMA [GARZON *et al.*, 2008a; GARZON *et al.*, 2008b]. Vários outros trabalhos analisando o papel de diferentes miRNAs têm surgido em diversos tipos de leucemias e linfomas [KLUIVER *et al.*, 2005; RAVECHE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008].

Entretanto, o papel dos miRNAs na LMC ainda tem sido pouco estudado. Um trabalho com linhagens celulares mostrou que o *cluster* miR-17-92 é transativado pelas proteínas MYC e BCR-ABL [VENTURINI *et al.*, 2007]. Mais recentemente, foi demonstrado também que o gene *ABL* é um alvo direto do miR-203, e que tanto mecanismos genéticos quanto epigenéticos têm a capacidade de inativar este miRNA num modelo de linfoma T [BUENO *et al.*, 2008]. Interessantemente, uma alta taxa de metilação foi observada no promotor do miR-203 em neoplasias Ph+, incluindo LLAs B, LMC e linhagens celulares, entretanto, estes

achados não foram corroborados em outras neoplasias com alterações no gene ABL [BUENO *et al.*, 2008]. A relação entre o perfil de expressão de miRNAs e os diferentes tipos de resposta obtidos com a terapia com ITKs ainda não é completamente entendido. Da mesma maneira, a variação da expressão dos miRNAs durante o curso da LMC e sua relação com o fenômeno de resistência aos ITK, são questões ainda em aberto.

Ainda se conhece pouco sobre os mecanismos que regulam a expressão dos miRNAs, sendo descrito que alguns poderiam estar silenciados no câncer mediante padrões de metilação aberrante de ilhas CpG adjacentes aos genes dos miRNAs e/ou por modificações de histonas [LEHMANN *et al.*, 2008]. Por outro lado, recentemente foi descrita uma série de miRNAs capazes de regular, direta e indiretamente, a expressão de proteínas chave da maquinaria de metilação celular, como as DNMTs, HDACs e polycomb [FABBRI *et al.*, 2007; BENETTI *et al.*, 2008; SINKKONEN *et al.*, 2008].

Assim, estes "epi-miRNAs" representam uma nova visão sobre o papel dos miRNAs dentro da complexa rede de mecanismos reguladores da expressão gênica, mostrando que são capazes de influenciar diversos processos celulares tanto através de mecanismos genéticos quanto epigenéticos. Entretanto, o entendimento da correlação entre os mecanismos de metilação e a expressão dos miRNAs, no câncer em geral e na LMC em particular, ainda é uma área onde se precisa aprofundar muito no conhecimento, fundamentalmente quando se leva em consideração a possibilidade da utilização de terapias demetilantes.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi analisar os padrões de resposta de um grupo de pacientes com LMC submetidos à terapia com IM, visando identificar mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados com a resposta e a resistência aos ITK.

Para isto, foram propostos os seguintes objetivos secundários:

- Analisar as respostas citogenética e molecular de um grupo de pacientes com LMC tratados com IM, visando identificar diferentes padrões de resposta terapêutica.
- Realizar um estudo mutacional no domínio quinase do gene BCR-ABL no grupo de pacientes com resposta sub-ótima e/ou classificados como resistentes, visando correlacionar a presença de mutação com o curso clínico e estabelecer tipo e frequência das mutações no grupo estudado.
- Analisar o perfil de expressão de microRNAs maduros ao diagnóstico, em grupos de pacientes diferenciados de acordo com o tipo de resposta alcançada, visando avaliar o possível valor preditivo destes perfis em relação à resposta obtida.
- Avaliar a mudança no perfil de expressão de microRNAs maduros ao longo do curso da LMC, visando identificar possíveis moléculas alvos de regulação por microRNAs que possam contribuir com o fenótipo resistente.
- Iniciar a caracterização funcional dos microRNAs associados com a resistência e/ou resposta à terapia com ITKs na LMC.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E AMOSTRAS ESTUDADAS

No presente trabalho foram estudadas amostras de 264 pacientes com LMC registrados no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro. Os casos incluídos neste estudo tiveram o diagnóstico de LMC realizado por citogenética (presença do cromossomo Ph) e/ou por biologia molecular (método de PCR para detecção do gene BCR-ABL, *vide seção 3.5.1*). O estudo obedece 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 e 129/10 (Anexo I).

Na etapa inicial do trabalho, foram analisadas as respostas hematológica, citogenética e molecular de 204 pacientes tratados no Instituto Nacional de Cancer (INCA) que utilizaram IM como primeira e/ou segunda linha de terapia (Fig. 3.1). Os critérios de inclusão para esta análise foram (i) dados clínicos completos e (ii) pelo menos 6 meses de uso do ITK. Visando construir a cinética de resposta obtida por cada paciente ao longo do acompanhamento, foram construídos bancos de dados contendo informações clínicas e laboratoriais. As informações clínicas e demográficas de cada paciente foram coletadas do prontuário mediante uma ficha especialmente desenhada para este trabalho (Anexo II) e encontram-se detalhadas na seção 3.12.

Após a análise do tipo de resposta obtida em cada caso, foi identificado um grupo de 65 pacientes do INCA que apresentaram uma resposta sub-ótima ou que foram classificados como resistentes ao tratamento com ITK, de acordo aos critérios propostos pela LeukemiaNet e discutidos anteriormente na seção 1.1 [BACCARANI *et al.*, 2006; 2009]. Neste grupo, foi avaliada a presença de mutações no DQ do gene BCR-ABL e especificamente a presença da

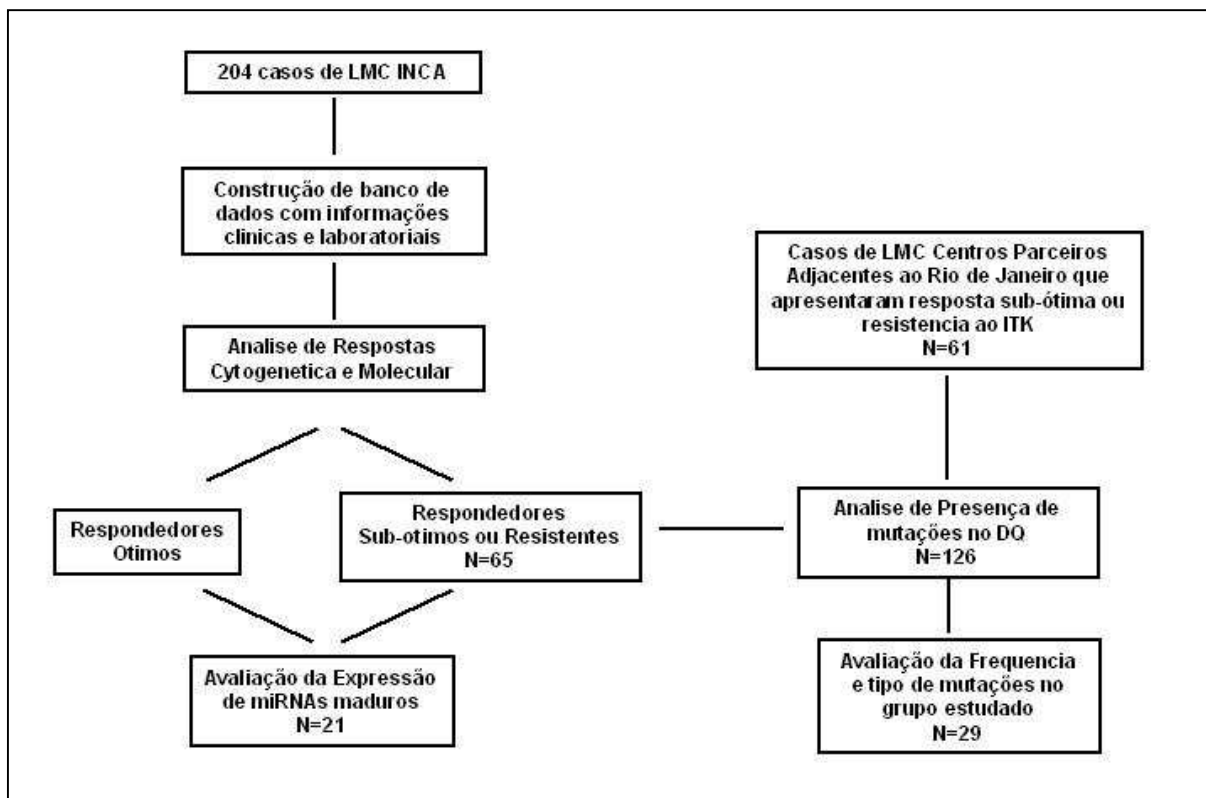
mutação T315I. Adicionalmente, no intuito de identificar a frequência e tipo de mutação apresentada pelos casos de LMC acompanhados pelo laboratório de Biologia Molecular do CEMO que não alcançaram as respostas ótimas nos tempos propostos de uso de IM, também foram estudadas amostras de 61 pacientes provenientes de centros parceiros localizados no Rio de Janeiro e/ou adjacências (Anexo III).

Uma vez caracterizados os pacientes de acordo com suas respostas e confirmada ou não a presença de mutações no DQ, foram selecionados amostras de 17 casos de pacientes com LMC do INCA para a realização de um *screening* inicial de expressão de miRNAs maduros mediante *arrays* de TLDA (*vide seção 3.7.1*). Os critérios para escolha destes casos foram (i) ter no mínimo 24 meses de acompanhamento e uso de ITKs, (ii) disponibilidade de amostras ao diagnóstico e/ou durante o tratamento com ITK e (iii) dados completos das cinéticas de resposta citogenética e molecular. Amostras de sangue periférico (SP) de 5 doadores sadios do CEMO foram utilizadas como controle normal de expressão de miRNAs maduros. Posteriormente, na avaliação de expressão de miRNAs por ensaios *singles* (*vide seção 3.7.2*), foram incluídas também amostras de 4 pacientes que apresentaram mutações no DQ do gene BCR-ABL (Fig. 3.1).

### 3.2 CULTURA DE LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares listadas na Tabela 3.1 foram utilizadas no decorrer deste trabalho com diferentes objetivos: para estudos de expressão de miRNAs; para construção de controles de qualidade para o método de RT-qPCR; para quantificação de transcritos BCR-ABL e para realização de ensaios funcionais. As linhagens criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas gradualmente em 15 ml de soro fetal bovino (SFB) Cellgro® (Mediatech, Inc), centrifugadas durante 7 minutos a 1200 rpm e lavadas com meio completo RPMI-1640 Cellgro® (Mediatech, Inc) suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em suspensão a uma concentração de  $0,5-1 \times 10^6$  células/ml em meio RPMI-1640

suplementado com 10% de SFB, 100 UI/ml de penicilina (Sigma) e 50 µg/ml de estreptomicina (Sigma). Foram cultivadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup> em condições de total esterilidade. As linhagens foram congeladas em criotubos a uma concentração aproximada de 10<sup>6</sup> células/ml em SFB contendo 10% (v/v) de di-metil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). As características das linhagens utilizadas encontram-se detalhadas na Tabela 3.1. A viabilidade celular e a contagem do número de células foram estimadas por exclusão com azul de tripan utilizando um contador automático Vi-CELL® (Beckman Coulter, Inc).



**Figura 3.1: Desenho do Estudo.** Este quadro apresenta o desenho do estudo e seleção de casos para as diferentes etapas do trabalho. Primeiramente, foram analisadas as respostas citogenética e molecular de um grupo de 204 pacientes com LMC do INCA tratados com imatinibe. Os pacientes foram classificados em respondedores ótimos, sub-ótimos ou resistentes. A presença de mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL foi analisada em 65 casos considerados respondedores sub-ótimos ou resistentes ao imatinibe, conjuntamente com 61 casos provenientes de centros adjacentes ao Rio de Janeiro, encaminhados ao nosso laboratório para pesquisa de mutação. Em 29 dos 126 casos analisados foram identificadas mutações no domínio quinase. Adicionalmente, para pesquisa e avaliação da expressão de microRNAs maduros, foram selecionados 21 casos de pacientes do INCA, discriminados segundo a resposta alcançada com ITKs e à presença de mutações.

**Tabela 3.1: Características das linhagens celulares estudadas**

Linhagem	Origem Celular	Características	Referência
K562	LMC	t(9;22)(q34;q11)	[ATCC, CCL 243]
KBM-5	LMC-CB	t(9;22)(q34;q11), IM-R	[RICCI <i>et al.</i> , 2002]
Kasumi-1	LMA	t(8;21)(q22;q22)	[ATCC, CRL-2724]

LMC: Leucemia mieloide crônica; CB: Crise Blastica; IM-R: Resistente ao Imatinibe; LMA: Leucemia mieloide aguda; ATCC, *American Type Culture Collection*.

### 3.3 MÉTODO DE ISOLAMENTO DE RNA TOTAL

As amostras de SP e/ou medula óssea (MO), assim como alíquotas das linhagens celulares, foram processadas para obtenção de RNA total. Após lise de hemácias nas amostras de SP e/ou MO, uma quantidade de  $5-8 \times 10^6$  células foi ressuspensa em 1 ml de Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante. As células em Trizol® foram agitadas mecanicamente (vórtex) e incubadas por 3-5 min a TA, após o qual foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (Merck). A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e o RNA foi precipitado mediante a adição de 0,5 ml de isopropanol (Merck), seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O sedimento (RNA) foi lavado com 1 ml de etanol 75%, secado a TA por 5-10 min e solubilizado em 12 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

A quantificação e o grau de pureza do RNA foram avaliados por espectrofotometria (Nanodrop), pela leitura no comprimento de onda em 260 e 280 nm, considerando-se como pura uma amostra de RNA com valor da razão 260/280 próximo a 2,0. As frações predominantes do RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,2 % em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M) seguido de coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e avaliação sob luz ultravioleta. A visualização dessas foi considerada evidência da integridade do RNA. Após avaliação quali-quantitativa, o RNA foi utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA) (*vide seção 3.4*) e armazenado a -70°C.

### 3.4 MÉTODO DE SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Para a quantificação dos níveis de transcritos do gene BCR-ABL, as reações de retrotranscrição foram realizadas em volumes de 20-40 µl. Para a síntese do cDNA, 2 µg de RNA total foram incubados com iniciadores randomicos hexaméricos [5µM] (Random Hexamer Primers, Invitrogen) por 10 min a 65°C. Adicionou-se então uma mistura contendo tampão [20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], MgCl<sub>2</sub> [2,5mM], DTT [10mM], dNTPs [1mM], a enzima transcriptase reversa Superscript™ (10U/ml) (Invitrogen), o inibidor de RNase *RNAguard* (1U/ml) (Invitrogen) e H<sub>2</sub>O-DEPC até completar o volume. A incubação foi realizada por 10 min a 42°C. Após o termino da retrotranscrição, os tubos foram incubados a 65°C por 5 min, para interromper a ação da transcriptase reversa. O cDNA foi armazenado a -20°C.

### 3.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS BCR-ABL

#### 3.5.1 PCR qualitativos para BCR-ABL

A presença do gene BCR-ABL foi identificada mediante uma primeira amplificação com vários pares de iniciadores a fim de detectar as isoformas caracterizadas como b3a2, b2a2 e e1a2 (PCR Multiplex, sensibilidade  $1 \times 10^{-3}$ ). O gene BCR normal foi amplificado como controle do procedimento de extração de RNA e de transcrição reversa. Mediante um resultado negativo do PCR Multiplex, foi realizada uma segunda abordagem para amplificar o transcrito BCR-ABL em baixos níveis. O PCR em ninho ou *Nested*, com uma sensibilidade de  $1 \times 10^{-6}$ , foi realizado em duas etapas, utilizando iniciadores mais internos na segunda etapa [CROSS *et al.*, 1994; OTAZÚ *et al.*, 2000; GABERT *et al.*, 2003]. O resultado das reações de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

### 3.5.2 Padronização do ensaio de quantificação de transcritos BCR-ABL por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A padronização do ensaio de quantificação absoluta de transcritos BCR-ABL foi realizada mediante uma reação de RT-qPCR multiplex em termociclador ABI 7000, incluindo sonda específica marcada 5'FAM-3'TAMRA e iniciadores para isoformas b3a2 e b2a2, utilizando o sistema TaqMan®, segundo protocolos estabelecidos por consórcios internacionais [MARIN *et al.*, 2005; HUGHES *et al.*, 2006]. O gene ABL foi utilizado como controle endógeno. Diluições seriadas de DNA plasmidial foram utilizadas como *standards* do número de cópias para realização de uma curva padrão. O mesmo plasmídeo é utilizado para quantificação de BCR-ABL e de ABL, controlando qualquer variação na eficiência de quantificação do plasmídeo. Foram incluídas também amostras de controle de qualidade com altos e baixos níveis de BCR-ABL, além de 3 tipos diferentes de controles negativos. A padronização e controle do ensaio de quantificação absoluta foi desenhada segundo as recomendações propostas pelas MIQEs (do inglês *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) [BUSTIN *et al.*, 2009]. A obtenção do fator de correção específico para validação dos resultados e conversão para Escala Internacional foi realizada através do programa internacional de padronização de ensaios de RT-qPCR para BCR-ABL liderado pela Dra Susan Branford, Centro de Biologia do Câncer, Universidade de Adelaide, Austrália [BRANFORD *et al.*, 2008].

## 3.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES DO GENE BCR-ABL

### 3.6.1 RT-PCR para amplificação do DQ e sequenciamento direto

A identificação de mutações do DQ do gene BCR-ABL foi realizada amplificando o fragmento de interesse mediante uma reação de PCR semi-nested, segundo protocolo descrito por BRANFORD e colaboradores (Fig. 3.2A) [BRANFORD *et al.*, 2002]. Após amplificação,

os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1.5% e purificados mediante o sistema QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) segundo recomendações do fabricante. Uma vez purificados os produtos foram preparados para seqüenciamento direto em placa de 96 poços, utilizando-se o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

As reações foram preparadas a um volume final de 10 µl, contendo 4 µl do produto purificado, 2 µl do oligonucleotido iniciador (*forward ou reverse*) (1 pmol/µl) e 4 µl da mistura comercial BigDye®. As amostras assim preparadas foram submetidas a uma reação de seqüenciamento por 30 ciclos (95° C 20 seg., 50° C 15 seg. e 60° C 1 min.) com uma etapa final a 10° C em um termocilador Veriti® Thermal Cyclers (Applied Biosystems).

A precipitação dos produtos foi realizada adicionando 2,5 volumes de álcool absoluto, seguido de uma centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos e lavados uma vez com álcool 70%. Uma vez secos, os produtos foram ressuspensos em tampão de corrida (EDTA 10mM pH 8.0/formamida) e colocados para leitura das seqüências em um seqüenciador ABI 310 (Applied Biosystems). A análise das seqüências foi feita com o programa Mutation Surveyor (Softgenetics), e comparadas com as dos genes BCR e ABL disponíveis nos bancos de dados online (GenBank acesso M14752 modificada).

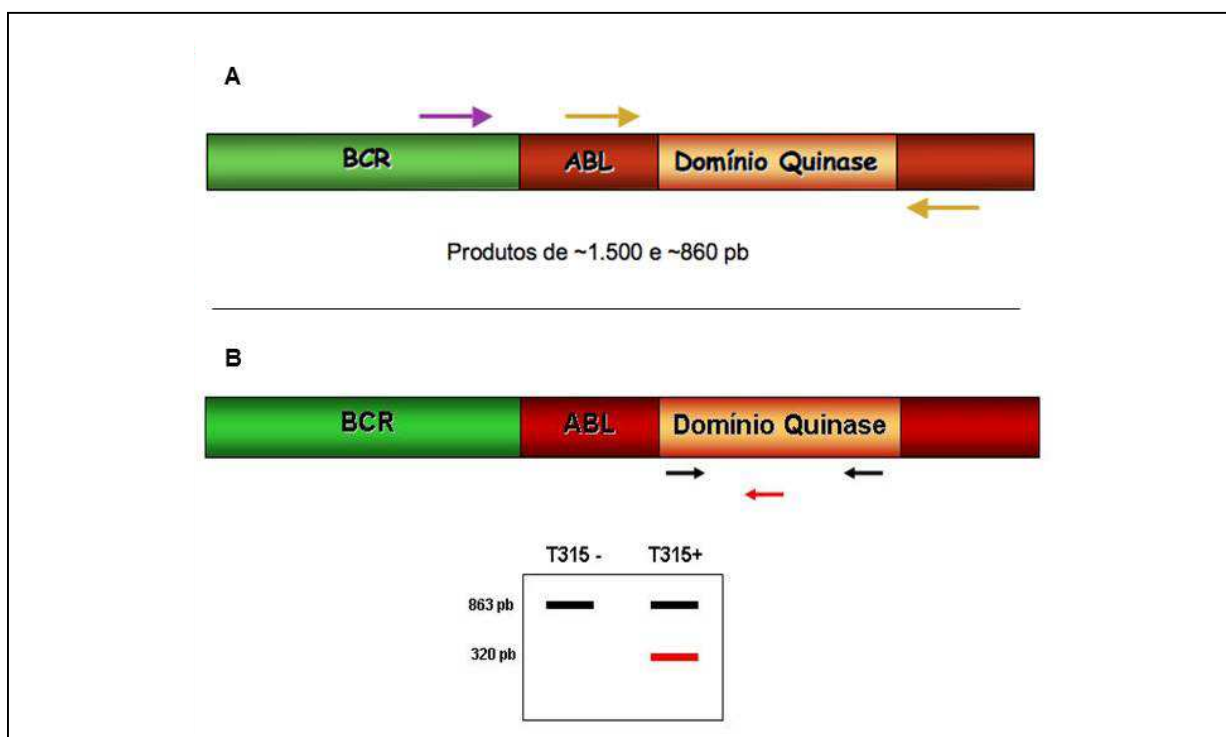
### 3.6.2 Desenho e padronização de um PCR-Alelo Específico (AS) para detecção da mutação T315I

O desenvolvimento de uma metodologia molecular sensível que permitisse detectar a presença da mutação T315I em baixos níveis foi idealizado através de um PCR-AS. Este ensaio foi padronizado em colaboração com o grupo liderado pela Dra Rosário Uriarte da Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Montevideo, Uruguay. Para isto, iniciadores para amplificação do DQ do gene ABL e um específico para a mutação T315I



foram utilizados numa mesma reação (Fig. 3.2B) [BRANFORD *et al.*, 2002; WILLIS *et al.*, 2005]. Os produtos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0.5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

A sensibilidade da técnica foi estimada através de diluições seriadas construídas a partir de RNA de uma amostra de LMC com a mutação T315I e RNA da linhagem celular K562. As misturas de RNA foram retro-transcritas para obter cDNA e analisadas pelo ensaio PCR-AS T315. Como controles negativos da reação, foram utilizadas amostras de 15 pacientes com LMC respondedores ao IM e 10 amostras de pacientes com doenças Ph negativo. Segundo o racional do desenho do PCR-AS, num caso mutado seriam observados 2 fragmentos num gel de agarose: um de 863 pb correspondente ao DQ do ABL e outro de 320 pb correspondente à mutação T315I. Nos casos sem a mutação, apenas o fragmento maior seria visualizado (Fig. 3.2B).



**Figura 3.2: Pesquisa de mutações no Domínio Quinase: A: reação de sequenciamento direto. B: Reação de PCR-AS para detecção da mutação T315I.** Esquema de amplificação da reação dentro do DQ do gene BCR-ABL. Setas pretas: iniciadores Abl-KF e Abl-KR; seta vermelha: iniciador T315. Num gel de agarose, espera-se identificar duas bandas num caso positivo para a mutação, e apenas uma banda em um caso negativo para a mutação.

### 3.6.3 Quantificação de mutações do gene BCR-ABL por piro-sequenciamento

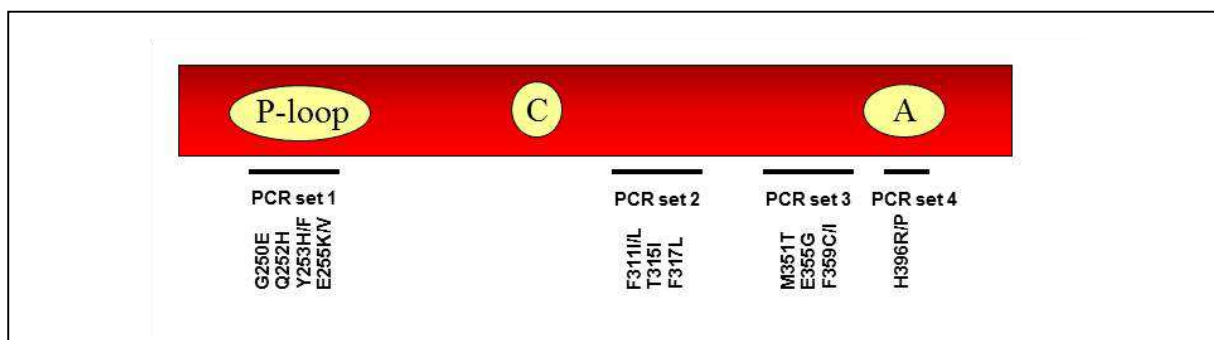
Em casos onde foram identificadas mutações por sequenciamento direto, a quantificação de mutações do DQ do gene BCR-ABL foi realizada por piro-sequenciamento, no intuito de poder avaliar-se o aumento ou diminuição do clone mutado em comparação com o clone *wild-type* de BCR-ABL durante o acompanhamento do tratamento com ITK.

De uma forma geral, no pirosequenciamento, a síntese de DNA ocorre através de um complexo conjunto de reações químicas, que inclui as enzimas ATP sulfúrilase e luciferase e os substratos adenosina 5' fosfossulfato e luciferina, resultando na produção de luz detectável quando um nucleotídeo é adicionado. Assim, quando a DNA polimerase incorpora um novo nucleotídeo em uma cadeia crescente de DNA, pirofosfato é gerado de maneira estequiométrica, resultando na produção de ATP. O ATP produzido leva à conversão enzimática da luciferina com emissão de fótons, o que possibilita a quantificação. À medida que os componentes da reação diminuem, um novo ciclo de reagentes é introduzido e então a incorporação de nucleotídeos específicos é avaliada de maneira sequencial.

Para a amplificação dos fragmentos de interesse foi utilizada uma estratégia de PCR-nested. Na primeira etapa foi amplificado um fragmento de ~1.500 pb, visando amplificar uma região do transcrito BCR-ABL [BRANFORD *et al.*, 2002]. Na segunda etapa, foram utilizados 4 pares de iniciadores desenhados para amplificar 4 fragmentos que contêm algumas das mutações de importância clínica para a resposta aos ITK, sendo sempre um dos iniciadores do par biotinizado [YIN *et al.*, 2010] (Fig. 3.3). Assim, 1,5 µl do produto de PCR da primeira etapa foi colocado no mix de PCR da segunda etapa, contendo o par de primers específico para a amplificação do fragmento que continha uma mutação sabidamente conhecida em cada amostra.

Os produtos biotinilados obtidos em cada reação de PCR foram preparados para piro-sequenciamento. Para isto, os produtos foram incubados com a resina Streptavidin Sepharose™ High Performance (GE Healthcare), e posteriormente filtrados utilizando a estação de trabalho PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. Seguidamente, os produtos foram fixados em ethanol 70%, denaturados em 0.2 M NaOH e lavados com uma solução de 10 mM Tris–acetato (pH 7.6).

Os produtos foram colocados em uma placa preparada para piro-sequenciamento, contendo tampão de anelamento comercial (Qiagen) e 0.3uM do iniciador de sequenciamento. A reação de piro-sequenciamento foi realizada num aparelho Q24 Pyrosequencer (Qiagen) utilizando o conjunto de reagentes PyroMark Gold Q24 (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. A quantificação de transcritos mutados/não-mutados foi calculada por comparação mediante o programa PyroMark Q24 Software (Qiagen).



**Figura 3.3** Esquema do domínio quinase do gene ABL. A Localização dos *primers* utilizados na reação nested para o piro-sequenciamento. As mutações que podem ser quantificadas com este ensaio encontram-se sinalizadas. A: domínio de ativação; C: domínio catalítico; *P-loop*: domínio de união ao ATP.

### 3.7 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAS MADUROS

#### 3.7.1 Análise de expressão por *arrays* de TLDA

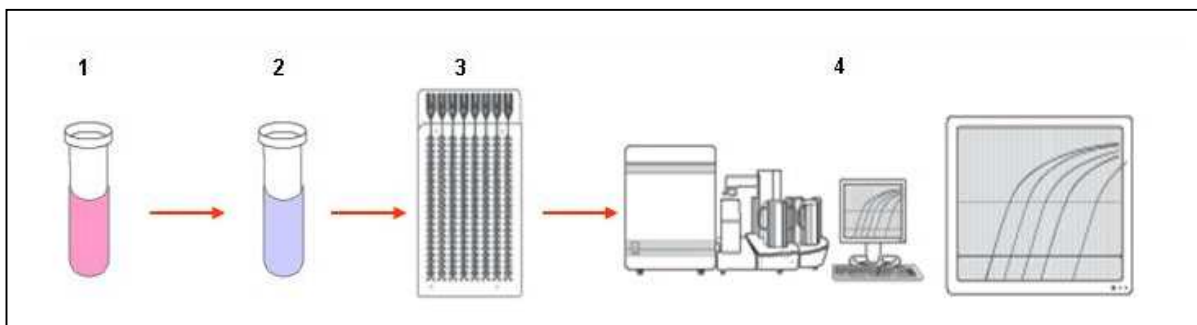
A análise do perfil de expressão de miRNAs maduros foi realizada utilizando *arrays* de TLDA (do inglês *TaqMan Low Density Array*) em aparelho ABI PRISM® 7900HT

Transcription (Applied Biosystems), no Laboratório do Departamento de Patologia do hospital A.C. Camargo, São Paulo, em colaboração com o Dr Fernando Soares. Esta plataforma representa o procedimento mais abrangente para um *screening* global de miRNAs, com conjuntos de primer-sonda comerciais extensamente validados.

Para isto, primeiramente foi realizada uma reação de transcrição reversa específica para miRNAs a partir de 1000ng de RNA total, sem pré-amplificação, utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e os iniciadores Megaplex™ RT Primers (Pool A) (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante (*Megaplex™ Pools Protocol 4399721*) (Fig. 3.4). Este conjunto de iniciadores permite obter simultaneamente o miR-cDNA de 377 miRNAs maduros, 3 RNAs pequenos utilizados como controles endógenos e 1 controle negativo.

Após a retrotranscrição, 6 µl do cDNA obtido de cada amostra foi colocado em uma placa de TLDA TaqMan® Human MicroRNA Array v2.0 (array A), adicionando 450 µl da mistura comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 444 µl de H<sub>2</sub>O. As sondas do *array* são do tipo TaqMan MGB, com um *reporter* (FAM™) no extremo 5' e *quencher* não fluorescente no extremo 3'. A preparação do *array* foi realizada segundo recomendações do fabricante (*TaqMan® Array User Bulletin 4371129*).

As condições de reação utilizadas foram 50°C 2 min, 94.5°C 10 min, e 45 ciclos de 97°C 30s e 59.7°C 1 min. O valor do ciclo de quantificação (Cq) foi obtido através do programa SDS v2.3 e visto mediante exportação ao programa ABI TaqMan RQ manager. O valor do threshold foi estabelecido em 0.2, como recomendado para placas TLDA.



**Figura 3.4: Esquema de trabalho com *arrays* de TLDA para miRNAs.** 1: Isolamento de RNA total a partir de Trizol®; 2: Transcrição reversa com TaqMan® MicroRNA RT kit e Megaplex™ RT Primers; 3: Preparação da placa TLDA; 4: corrida das placas em aparelho ABI 7900HT e análise dos resultados.

### 3.7.2 Análise de expressão por ensaios *singles*

As diferenças de expressão de miRNAs observadas através dos *arrays* de TLDA foram confirmadas através de ensaios *singles* de expressão específicos para o miRNA de interesse, utilizando os conjuntos comerciais TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems), que permitem obter especificamente o miR-cDNA de cada miRNA escolhido e sua quantificação por RT-qPCR utilizando iniciadores e sondas TaqMan® desenhados para cada miRNA maduro.

Para obtenção do miR-cDNA, 250ng de RNA total previamente extraído das amostras clínicas e/ou das linhagens celulares utilizadas neste trabalho, foi retrotranscrito utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e o primer fornecido no TaqMan® MicroRNA Assay, de acordo com as recomendações do fabricante (*TaqMan® MicroRNA Assays Protocol 4364031 RevB*). Brevemente, o RNA foi colocado numa reação com volume final de 7.5 µl contendo 50nM do primer de RT, 1µl de tampão, 3.33 U/ml da enzima MultiScribe RT e 0.25 U/ml de inibidor de RNase. A mistura de RT mix foi incubada a 16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min e 4°C indefinidamente.

Após a retrotranscrição, a quantificação foi realizada em aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). As reações foram padronizadas para um volume final de 10µl, com 2µl

do produto de RT, 6µl da mistura comercial TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2µl da mistura comercial primer/sonda para qPCR fornecida no TaqMan® MicroRNA Assay. As reações foram colocadas numa placa de 96 poços a 95°C 10 min seguidos de 45 ciclos de 95°C 15 seg e 60°C 1 min. Todas as reações de PCR foram feitas em triplicata utilizando o controle endógeno escolhido (*vide seção 6.1.1.2*).

### 3.8 ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO DE miRNAS GERADOS POR RT-qPCR

Para a análise dos dados de expressão de miRNAs foi utilizando o programa GenEx Enterprise (MultiD Analyses AB, Sweden), uma ferramenta de análise integrada desenhada especificamente para normalização e análise de dados de expressão gerados por qPCR e baseado nos princípios do método do CT comparativo [LIVAK *et al.*, 2001]. Este método considera resultados normalizados da expressão do gene alvo e do endógeno de cada amostra, assim como a expressão do alvo e do endógeno de uma única amostra de referência, o “calibrador”, cuja expressão do alvo é muito baixa. Desta forma, foi obtida a média dos valores de CT para os miRNAs alvos e para o endógeno escolhido de cada amostra. Em seguida, calculou-se o  $\Delta Ct$ , que é a diferença entre o CT do alvo e o CT do endógeno [ $\Delta Ct = Ct(\text{alvo}) - Ct(\text{endógeno})$ ], para cada uma das amostras. Assim pôde-se calcular o  $\Delta\Delta Ct$ , que representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra e o  $\Delta Ct$  do calibrador [ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$ ].

Para aplicação deste método e a realização da análise estatística dos dados utilizando o programa GenEx Enterprise, primeiramente foi realizado um pre-tratamento dos dados, que incluiu definição do *cut-off* de amplificação e *missing data*, normalização com o gene de referência escolhido, comparação com uma amostra definida como calibrador e transformação logarítmica do resultado ( $\log_2$ ). Os dados assim pre-processados foram analisados com o mesmo programa visando identificar miRNAs diferentemente expressos

entre os grupos. As comparações entre valores médios de expressão foram realizados com teste-*t* de student (2-caudas). O ajuste do valor *p* para comparações múltiplas (nos dados gerados com os *arrays*) foi realizado pelo método de Benjamini-Hochberg. A análise supervisionada dos dados foi realizada através do método de average-linkage com correção Euclidiana. A seleção do melhor gene endógeno foi realizada aplicando os algoritmos geNorm e NormFinder.

### 3.9 ANÁLISE *IN SILICO* PARA PREDIÇÃO DE ALVOS DE miRNAS

A predição de genes alvos dos miRNAs de interesse foi realizada utilizando as bases de dados PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), PITA (<http://genie.weizmann.ac.il>), RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>), Targetscan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) e Miranda ([www.microrna.org/microrna](http://www.microrna.org/microrna)). A função e localização dos genes alvos preditos foram pesquisadas utilizando as bases de dados Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) e GenomeNet (<http://www.genome.jp>).

### 3.10 ENSAIOS FUNCIONAIS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAS

As linhagens celulares de LMC K562 e KBM-5, descritas na seção 3.2, foram utilizadas para ensaios *in vitro* desenhados para avaliar o papel da metilação na regulação da expressão dos miRNAs de interesse e/ou para avaliar o efeito da super-expressão de um determinado miRNA mediante transfecção de precursores pre-miRNAs.

#### 3.10.1 Ensaios de demetilação do DNA

Os ensaios de demetilação do DNA foram realizados nas linhagens K562 e KBM-5 utilizando o agente demetilante 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-d) em 2 concentrações diferentes, 0.5  $\mu$ M e 1 $\mu$ M. Estas concentrações de 5-Aza-d foram escolhidas por serem as utilizadas em ensaios demetilantes para avaliação da expressão de alvos. Para estes ensaios,

de cada linhagem celular foram preparadas 4 garrafas com uma concentração de  $0.5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640 Cellgro® (Mediatech, Inc). Em uma das garrafas a solução salina PBS 1x Cellgro® (Mediatech, Inc) foi utilizada como agente controle e em outra foi adicionado 10µl de DMSO (Sigma), veículo do agente demetilante. As células foram cultivadas por 72hs, sem trocar o meio. A viabilidade e a quantidade de células foram estimadas diariamente.

Após 24hs, 48hs e 72hs de tratamento uma alíquota de cada tratamento foi separada para extração de RNA total. Adicionalmente, após 72hs, uma outra alíquota foi utilizada para extração de proteínas totais para aferição dos níveis de apoptose (*vide seção 3.11*). O RNA total foi extraído como descrito na seção 3.3 e a avaliação da expressão do miRNA de interesse foi realizado como descrito na seção 3.6.2.

### 3.10.2 Ensaio de transfecção com precursores pre-miRNAs

Para os ensaios de transfecção com pre-miRNAs, foram preparadas culturas de 12 mL das linhagens K562 e KBM-5 com  $7.2 \times 10^6$  células/mL em fase de crescimento exponencial para cada miRNA analisado. Primeiramente, foi preparada uma solução A, contendo 57µl do agente de transfecção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) e 570µl de meio Opti-MEM® (Gibco®). Esta solução foi incubada a 37°C por 5 min. Posteriormente, foi preparada a solução de transfecção B, contendo 275µl da solução A, 275µl de meio Opti-MEM® e 22µl do pre-miR ou do RNA controle negativo (*scramble*).

Após incubação a 37°C por 20 min, 250µl da solução B foram colocados em uma suspensão de  $7.2 \times 10^6$  células/mL de cada linhagem celular. Uma alíquota de cada garrafa de cultura foi extraída após 24h, 48h e 72h para obtenção de RNA total com Trizol®, e às 96h para obtenção de proteínas totais. A viabilidade e número de células foram estimados diariamente como descrito previamente na seção 3.2.



### 3.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E WESTERN-BLOT

A técnica de Western-Blot foi utilizada para aferição dos níveis de apoptose mediante marcação da proteína PARP, uma poli-ADP-ribose polimerase envolvida na resposta do reparo do DNA em resposta a stresse do meio. Para isto, as células foram lavadas com PBS 1x Cellgro® (Mediatech, Inc) e centrifugadas 4 min a 1200 rpm. O pellet celular foi resuspendido em 120µl de uma mistura de extração, contendo o tampão de lisis RIPA (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) (Sigma-Aldrich), inibidor de fosfatase (1x) (Sigma-Aldrich), inibidor de protease (1x) (Sigma-Aldrich) e 1 mM DTT (Invitrogen™). Após vortexar por 5 seg, a preparação foi mantida em gelo por 20 min, vortexada novamente por 5 seg, e mantida por 10 min a 4°C. Posteriormente, após centrifugação por 10 min a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi coletado e colocado em um tubo eppendorff de 1.5 mL.

Após a extração, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford utilizando o conjunto de reagentes Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-rad Laboratories, Inc), segundo recomendações do fabricante. Brevemente, 1 parte da solução comercial Dye Reagent Concentrate (Bio-rad Laboratories, Inc) foi diluída em 4 parte de H<sub>2</sub>O MilliQ. Para a quantificação, 1mL da solução foi colocado em cuvetas individuais e foram adicionados 2µl de cada concentrado proteico. As medidas foram efetuadas em aparelho SmartSpec Plus Spectrophotometer (Bio-rad Laboratories, Inc) a 595 nm de absorbância.

Os extratos de proteínas foram diluídos para uma concentração final de 60µg em 10µl de tampão RIPA, aos que foram adicionados 10µl de tampão Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% w/v azul de bromofenol) (Bio-rad Laboratories, Inc). As diluições assim preparadas foram incubadas 5 min a 95°C e mantidas em gelo até seu uso. As proteínas foram aplicadas num gel do tipo SDS-PAGE 4-20% Criterion Tris-HCl precast

Gels (Bio-rad Laboratories, Inc), e corridos em uma cuba de eletroforese Criterion Cell (Bio-rad Laboratories, Inc) com tampão Tris/Glycine/SDS (1X 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.01% SDS, pH 8.3) (Bio-rad Laboratories, Inc) a 35 mA, 160v por aproximadamente 2hs. Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel a uma membrana de nitrocelulose (Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose) utilizando o sistema semi-seco Trans-Blot® Turbo™ transfer system (Bio-rad Laboratories, Inc) a 25v por 10 minutos.

Ao termino da transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h a TA em tampão TBS-T-leite (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 0,1% Triton e 5% de leite em pó desnatado) em agitação constante. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc) (diluição 1:15000) e PARP (Cell Signaling Technology, Inc) (diluição 1:1000) em tampão de bloqueio por 12hs em agitação continua em câmara fria (4°C). Após a realização de 3 lavagens com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* e/ou anti-*mouse* (diluição 1:2000) (GE Healthcare) por 1h a TA. Posteriormente, foram realizados 3 lavagens com TBS-T e logo as membranas foram reveladas com kit de detecção Amersham™ ECL™ detection systems (GE Healthcare).

### 3.12 DEFINIÇÕES E REGISTRO DAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os critérios para definição de FC, FA e/ou CB utilizados neste trabalho foram de acordo aos estabelecidos pela WHO (do inglês *World Health Organization*) [VARDIMAN *et al.*, 2002]. Os pacientes com LMC em FC foram classificados em FCP ou FC Tardia (FCT) segundo o tempo transcorrido desde o diagnóstico da doença até o inicio do IM (FCT >12 meses desde o diagnóstico). No presente trabalho, as definições de resposta hematológica completa (RHC) e progressão de doença seguiu os critérios propostos pela LekemiaNet

[BACCARANI *et al.*, 2006, 2009]. A RCg foi definida de acordo a proporção de metáfases Ph+ como completa (0% Ph+), parcial (Ph+ 1% - 34%), menor (Ph+ 35% - 95%) e nula (Ph+ 96% - 100%). A resposta citogenética maior (RCgM) foi considerada como a RCgC+RCgP. A resposta molecular (MR) foi estabelecida de acordo aos níveis de BCR-ABL/ABL obtidos por RT-qPCR e convertidos para a EI aplicando o fator de correção laboratório-específico (*vide seção 4.1.1*). A resposta molecular maior (RMM) foi definida como valores  $\leq 0.1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>. A definição de uma RMC requereu a não detecção do transcrito BCR-ABL por RT-qPCR e por PCR-*Nested* em 2 amostras consecutivas.

A resposta ótima, falha terapêutica e resposta sub-ótima foram estabelecidas segundo critérios recomendados (*vide Tabela 1.1, seção 1.1*). Perda de resposta ao IM foi definida como a perda da melhor resposta obtida (RH ou RCg). Para a resposta molecular, a perda de resposta foi definida após 2 análises moleculares consecutivas. Os pacientes foram analisados quanto à SG, SLE e SLP. A SG foi determinada como o tempo a partir do diagnóstico da doença até a morte por qualquer causa, sendo censurada no momento da interrupção do tratamento ou na data do último dado disponível. A SLE foi definida a partir do momento de início do tratamento com IM até a primeira documentação de um evento. Os eventos foram definidos como: morte (qualquer causa), progressão para FA ou CB e perda de resposta (RH, RCg ou RM). A SLP foi definida como o tempo entre o início do IM e a data da progressão. Os pacientes sem progressão foram censurados no momento da interrupção do tratamento com o inibidor ou na data do último dado disponível.

As principais características clínicas e demográficas dos pacientes estudados foram obtidas dos registros do arquivo médico de INCA mediante uma ficha de coleta de dados elaborada para o presente trabalho. Cada paciente possui uma ficha individual com as informações que foram consideradas relevantes, tais como sexo, idade, data do diagnóstico,

fase da doença ao diagnóstico, SOKAL, tempo e tipo de tratamento prévio aos ITK, data e tempo para início da terapia com ITK, entre outros.

Bancos de dados com as informações clínicas, dados de citogenética e as informações de biologia molecular foram criados nos programas Excel (Microsoft) e SPSS 18.0 para análise estatística. As variáveis categóricas foram descritas utilizando-se proporções, e as contínuas através da mediana. A comparação dos valores entre os diferentes grupos foi realizada pelos testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Valores de probabilidade ( $p$ )<0,05 foram considerados como estatisticamente significativos. As análises de sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida livre de evento (SLE) foram realizadas pelo método de Kaplan e Meier e comparadas com o teste de log-rank [KAPLAN & MEIER, 1958].

## 4. ANÁLISE DAS RESPOSTAS OBTIDAS EM PACIENTES COM LMC TRATADOS COM IM

### 4.1 RESULTADOS

#### 4.1.1 Ensaio de RT-qPCR para aferição da resposta molecular

Como mencionado anteriormente, com a introdução da terapia com inibidores da atividade tirosina quinase, os ensaios de RT-qPCR representam atualmente uma ferramenta chave na monitorização dos transcritos BCR-ABL ao longo do tratamento. O estabelecimento da escala internacional (EI), assim como as recomendações sobre procedimentos laboratoriais, interpretação e expressão dos dados, permitiram a harmonização dos resultados moleculares [HUGHES *et al.*, 2006]. Os laboratórios interessados em utilizar a EI, precisam padronizar todos seus procedimentos, assim como obter um fator de correção laboratório-específico que, uma vez validado, pode ser aplicado por cada centro em particular para expressar seus resultados na EI [BRANFORD *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2009b].

O ensaio de RT-qPCR aqui utilizado foi desenhado e padronizado segundo as recomendações estabelecidas. Primeiramente, diluições seriadas de DNA plasmidial foram preparadas para serem utilizadas como *standards* do número de cópias mediante construção de uma curva padrão, tanto para o gene alvo quanto para o endógeno (Fig. 4.1A). Estas curvas foram avaliadas em triplicata para cada reação. A construção dos *standards* é realizada bi-anualmente a partir do sub-clonado de um plasmídeo original cedido pelo Dr NCP Cross, contendo o inserto BCR-ABL [CROSS *et al.*, 1994].

O número de cópias da preparação plasmidial foi calculado através da relação entre o tamanho do plasmídeo + tamanho do inserto (em pb) transformados em massa pela utilização do número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$ ). Uma vez determinado o número de cópias da

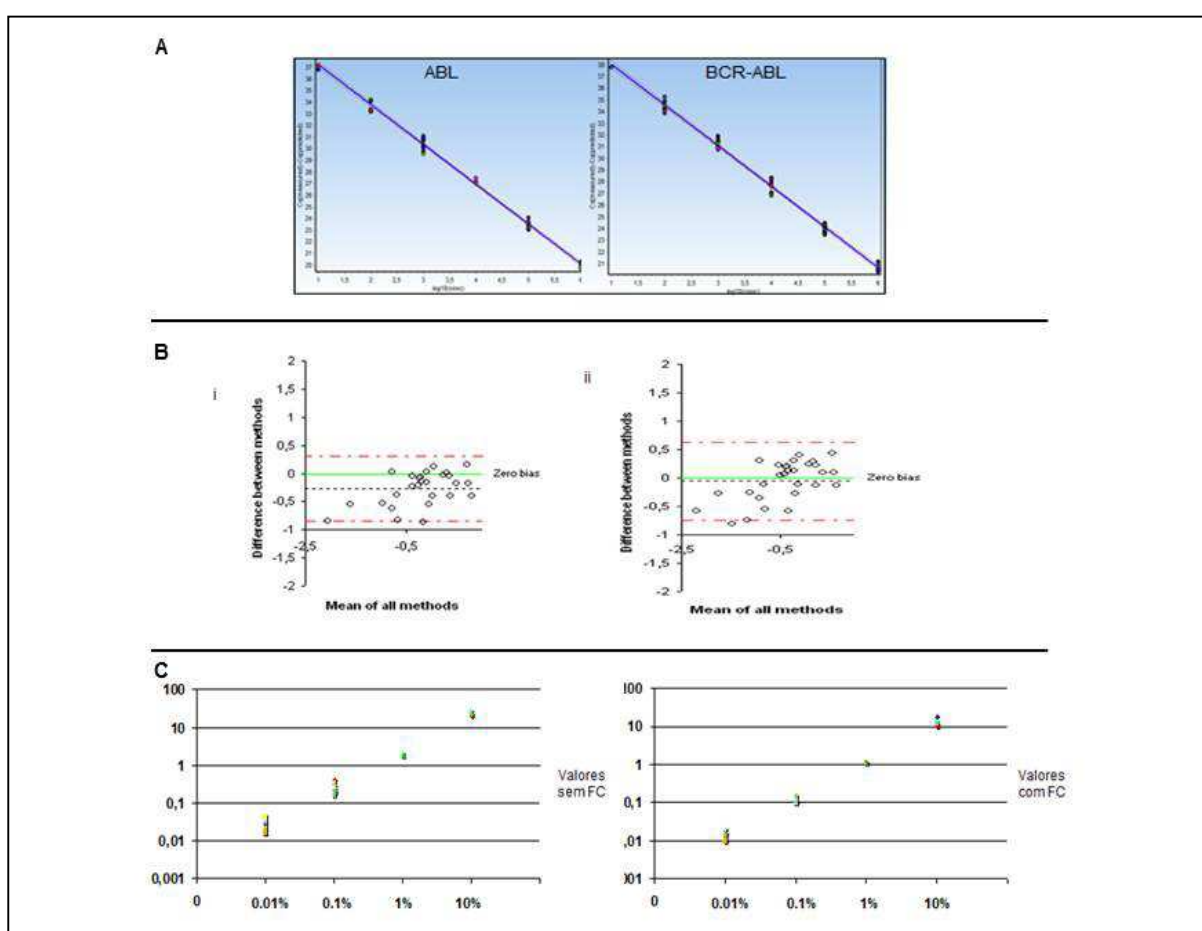
preparação stock, diluições seriadas foram realizadas para construção da curva padrão, desenhada para cobrir a faixa dinâmica de  $10^6 - 10^1$ . Em cada corrida, foram incluídas também amostras de controle de qualidade com altos e baixos níveis de BCR-ABL, preparadas mediante diluições das linhagens celulares K562 (BCR-ABL+) e Kasumi (BCR-ABL-). A utilização destas amostras permite monitorar a variabilidade inter-ensaio e a qualidade do processo como um todo, desde a extração do RNA. Além disso, em cada corrida foram incluídos um NTC (do inglês *non-template control*, uma amostra de DNA), um NAC (do inglês *non-amplification control*, uma amostra de cDNA BCR-ABL-) e um branco (tampão de corrida).

A padronização e o controle do ensaio de quantificação absoluta seguiram as recomendações propostas pelas MIQEs [BUSTIN *et al.*, 2009]. Assim, foram calculadas as seguintes informações técnicas do ensaio: eficiência da reação: 96% (desvio standard 0.01); sensibilidade do ensaio: > 4 logs; limite de detecção (LOD): 10 cópias; *slope*: -3.43 (-3,36-3,49) *intercept*: 41,1 (40,8- 41,6); R2: 0,997 (0,995-0,999).

Os resultados obtidos por RT-qPCR foram considerados representativos quando o número de cópias do gene ABL detectado foi  $\geq 30.000$ . Um resultado de RT-qPCR foi avaliado como negativo quando não foram detectados transcritos BCR-ABL em uma amostra com um número de copias do ABL considerado representativo. Os níveis de BCR-ABL foram calculados pela relação BCR-ABL/ABL% e convertidos para EI através da aplicação do fator de correção específico do laboratório de Biologia Molecular do CEMO.

Para obtenção do fator de conversão, um número representativo de amostras foi quantificado simultaneamente pelo Lab. de Biologia Molecular do CEMO e pelo Lab. de referencia internacional (Project for Standardization of BCR-ABL RQ-PCR methods, Adelaide, Austrália). Utilizando o método comparativo de Bland & Altman, o laboratório de

referência calculou a diferença ou *bias* entre seu método e o do Lab. de Biologia Molecular do CEMO (Fig. 4.1B). O fator de conversão é representado pelo anti-log do viés [BRANFORD *et al.*, 2008]. O fator de correção calculado para nosso laboratório foi de 0,53. Após períodos estabelecidos pelo Lab. de referência (12-15 meses), novos sets de amostras são enviados e medidos por ambos os laboratórios, a fim de monitorar possíveis variações do método e assim re-ajustar o fator de correção de cada centro.



**Figura 4.1: Padronização e validação do monitoramento molecular para LMC por RT-qPCR.** O fluxo do acompanhamento molecular para LMC começa com a definição do tipo de transcrito BCR-ABL mediante um ensaio quantitativo do tipo multiplex nas amostras virgens de tratamento. **A:** Padronização de um ensaio estável e controlado. *Standard curves* das amostras de DNA plasmidial utilizadas na quantificação, com os valores de *slope* e *R2* dentro dos parâmetros permitidos sugeridos (-3,3, -3,59 e 0,997, 1,00). **B:** Cálculo e validação de um fator de conversão laboratório-específico (FC). Cada valor BCR-ABL/ABL é convertido para a escala internacional (EI) aplicando o FC validado pelo Lab de Biol Molec Australiano, Adelaide. Para isto, um número representativo de amostras, incluindo pacientes em diversas fases da doença foram testados em paralelo no Laboratório de Biologia Molecular do INCA e no Laboratório de Adelaide. Um *plot* foi gerado para calcular o FC (i) e os mesmos dados com os dados convertidos (ii). Se não houvesse diferença no viés médio estimado, a linha pontilhada estaria em 0, assim, o FC foi o antilog do viés médio. O FC foi validado com uma troca subsequente de amostras. **C:** Os gráficos mostram um exemplo de como a aplicação do FC reduz o coeficiente de variação em 70 das nossas amostras para os valores específicos de 0,01%, 0,1%, 1% e 10%.

#### 4.1.2 Principais características clínico-demográficas do grupo estudado e definição dos critérios de resposta

No intuito de identificar pacientes com diferentes padrões de resposta à terapia com IM, foram analisadas, de acordo aos dados institucionais disponíveis, a resposta citogenética e molecular de 204 pacientes com LMC tratados no INCA. As principais características clínicas e demográficas dos casos incluídos nesta análise descritiva são apresentadas na Tabela 4.1. O grupo estudado incluiu 119 homens e 75 mulheres, com uma mediana de idade de 45 anos (18-85). Cento e cinco pacientes utilizaram IM como primeira linha de tratamento, 93 pacientes receberam IFN- $\alpha$  por um período  $\geq 1$  mês antes do IM e 6 pacientes receberam IM após recaída de aloTCTH. As principais causas da descontinuidade do tratamento com IFN- $\alpha$  foram intolerância (n=11), toxicidade grau 3/4 (n=20), progressão (n=3) e resistência ou falha (n=40). Adicionalmente, 19 pacientes iniciaram a terapia com IM por requerimento pessoal e devido à disponibilidade do novo tratamento na instituição.

Assim, 130 pacientes foram classificados como FCP e 48 como FCT no momento do início da terapia com o inibidor. Após um tempo médio de uso do IM de 30 meses (6-123), com 70% dos casos utilizando o inibidor por >12 meses, 152 pacientes continuam com IM (75%). Destes, 36 casos iniciaram terapia com ITK-2G. As causas de suspensão do IM foram: resistência/falha terapêutica (n=30), aloTCTH (n=8), intolerância ou toxicidade (n=8), óbito (n=5) e abandono do tratamento (n=1).



**Tabela 4.1: Características clínicas e demográficas dos pacientes estudados (n=204)**

	N	(faixa)
Idade ao diagnóstico, anos	45	(18-85)
Sexo		
Masculino	119	
Feminino	85	
Fase ao início do IM		
LMC-FC	178	
FCP	130	
FCT	48	
LMC-FA	26	
Tratamento prévio ao IM		
Nenhum	105	
INF- $\alpha$	93	
aloTCTH	6	
Índice Sokal		
Alto	40	
Intermediário	51	
Baixo	99	
Desconhecido	14	
Tempo médio de acompanhamento (Dg. até ultimo dado disponível), meses	43	(6-220)
Tempo médio de uso de IM, meses	30	(6-123)
Tempo médio de uso de INF- $\alpha$ , meses	3	(1-108)
Tempo médio desde o diagnóstico até início do IM, meses		
LMC-FC	3	(1-184)
FCP	2	(1-10)
FCT	42	(13-184)
LMC-FA	2	(1-67)

IM: imatinibe; FC: fase crônica; FCP: fase crônica precoce; FCT: fase crônica tardia; FA: fase acelerada; INF- $\alpha$ : interferon- $\alpha$ ; aloTCTH: transplante de células tronco hematopoiéticas alogênicas. Dg: diagnóstico.

#### 4.1.3 Análise descritiva das respostas citogenéticas obtidas com IM

Do grupo de pacientes estudado, 172 (172/204, 84%) tiveram dados de citogenética disponíveis (154 LMC-FC e 18 LMC-FA). Para o grupo total, a melhor resposta citogenética cumulativa obtida foi MCgR em 86% (RCgC, 75%, RCgP 11%), menos que parcial em 5% dos casos, e 9% tiveram RCg nula (Tabela 4.2). Quando a mesma análise foi realizada apenas no grupo de pacientes com LMC-FC, foi observado que 86% atingiram uma RCgM, 76% RCgC, 10% RCgP e 5% RCgMe (Tabela 4.2). A obtenção de uma RCgC não se viu influenciada pela duração da FC [83/113 (73%) dos LMC-FCP vs 34/41 (82%) dos LMC-FCT,  $p=0,7$ , teste qui-quadrado] nem pela utilização previa de INF- $\alpha$  [68/85 (80%) dos LMC-FC INF- $\alpha$  seguido de IM vs 50/69 (73%) dos IM LMC-FC primeira linha,  $p=0,21$ , teste

qui-quadrado]. A obtenção da RCgC também não foi diferente entre os grupos com índice Sokal distinto ( $p = >0,05$ ).

**Tabela 4.2: Melhores respostas citogenética observadas (n=172)**

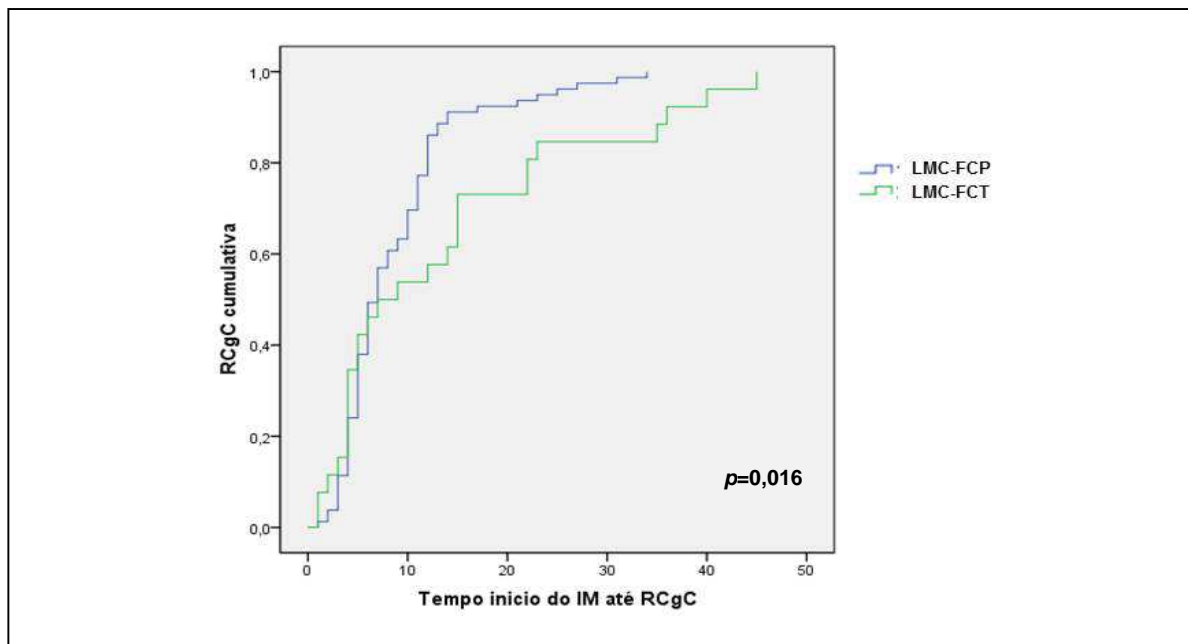
	Grupo Total	LMC-FA (n=18)	LMC-FC (n=154)
RCgM	149 (86,6%)	16 (89%)	136 (87%)
RCgC	129 (75%)	12 (66,5%)	117 (76,5%)
RCgP	20 (11,6%)	4 (22,5%)	16 (10,5%)
RCgMe	7 (4%)	-	7 (4%)
RCgN	16 (9,4%)	2 (11%)	14 (9%)

RCgM: resposta citogenética maior; RCgC: resposta citogenética completa; RCgP: resposta citogenética parcial; RCgMe: resposta citogenética menor; RCgN: resposta citogenética nula; LMC: leucemia mieloide crônica; FA: fase acelerada; FC: fase crônica.

Um total de 139 pacientes com LMC-FC tiveram dados disponíveis durante os primeiros 12 meses e ao longo do tratamento com IM. Neste grupo, foi analisado o tempo transcorrido para obtenção da RCgC. Ao todo, 105 (75%) alcançaram uma RCgC. Oitenta e nove casos (89/105, 85%) alcançaram a RCgC durante o primeiro ano de tratamento, com uma mediana de tempo de 6 meses (3-12 meses) e foram classificados como “respondedores citogenéticos ótimos”. Dos restantes 16 casos, 8 alcançaram a RCgC após 12 meses de IM (entre 12 - 24 meses) e 8 pacientes após 24 meses de terapia com IM.

Assim, 16/105 (15%) dos pacientes com LMC-FC que obtiveram uma RCgC foram considerados “respondedores citogenéticos tardios”, já que necessitaram mais de um ano para alcançar a RCgC. Estes respondedores tardios representam 32% (16/50) dos pacientes que não alcançaram uma RCgC durante os primeiros 12 meses do tratamento com IM. Apenas 2 casos dos respondedores tardios alcançaram a RCgC após aumento de dose do IM (de 400 mg/dia para 600 mg/dia). Aproximadamente, metade dos respondedores tardios (9/16, 56%) foram pacientes classificados como LMC-FCT. Quando analisados segundo a duração da FC até o início do IM, 73% (19/26) dos pacientes classificados como LMC-FCT obtiveram a RCgC em

até 12 meses de tratamento, em contraste com 91% (70/79) dos LMC-FCP ( $p=0,016$ , teste log-rank). Estes resultados mostram que os pacientes que iniciam IM em uma LMC-FCP alcançam a RCgC em um tempo menor que os LMC-FCT (Fig. 4.2).



**Figura 4.2: Distribuição dos tempos de obtenção da RCgC.** Este gráfico mostra a distribuição dos tempos para obtenção da RCgC entre pacientes classificados como LMC-FCP ou LMC-FCT, (FCT >12 meses desde o diagnóstico da doença), de acordo ao método de Kaplan-Meier. Estes resultados mostram que os pacientes que iniciam IM em uma LMC-FCP alcançam a RCgC em um tempo menor que os LMC-FCT ( $p=0,016$ , teste log-rank).

A RCgC se manteve estável em 94% (99/105) dos casos analisados, após uma mediana de acompanhamento de 33 meses (2-109 meses) desde a obtenção da resposta, 70% dos casos apresentaram um tempo de acompanhamento maior que 12 meses. Dos 6 casos que perderam a RCgC obtida, 5 foram classificados como respondedores ótimos (4 deles iniciaram o tratamento com IM em LMC-FCP), sendo que em apenas 2 casos a RCgC esteve associada a uma RMM.

Dentre os respondedores tardios, apenas 1 paciente perdeu a RCgC. Excetuando este paciente, os respondedores tardios sustentaram uma RCgC estável após 74 meses de uso do IM (27-115 meses) e um tempo médio de acompanhamento de 40 meses após obtenção da

RCgC (3-90 meses), com 80% dos casos com um tempo de acompanhamento maior que 20 meses. O respondedor citogenético tardio que perdeu a RCgC estava em LMC-FCT, apresentava índice Sokal baixo e alcançou a RCgC após 24 meses de IM, seguida de uma RMM.

#### 4.1.4 Resultados dos estudos moleculares e análise das respostas

A RM foi classificada de acordo à expressão dos valores obtidos mediante o ensaio de RT-qPCR convertidos para EI, como descrito anteriormente. Do grupo estudado, 182 (182/204, 89%) tiveram dados disponíveis do acompanhamento molecular (164 LMC-FC e 18 LMC-FA). Para o grupo total, a melhor resposta molecular cumulativa obtida foi: RMC em 27,5%; RMM 32,4%, uma redução de 2-log em 16,5% e de 1-log em 10,5% dos casos. Um grupo de 13.1% não obteve redução alguma de carga tumoral (Tabela 4.3).

Quando a mesma análise foi realizada apenas no grupo de pacientes com LMC-FC, foi observada uma RMC em 29% dos casos, RMM em 34% (63% com redução de pelo menos 3-log), redução de 2-log em 16,5%, redução de 1-log em 9% e nenhuma redução em 11,5% (Tabela 4.3). A obtenção da RMM não se viu influenciada pela duração da FC (67% dos LMC-FCP vs 71% dos LMC-FCT,  $p=0,65$  teste qui-quadrado) nem pela utilização previa de INF- $\alpha$  (74% dos LMC-FC INF- $\alpha$  seguido de IM vs 62% dos LMC-FC IM primeira linha,  $p=0,15$ , teste qui-quadrado). A obtenção da RMM também não foi diferente em relação ao índice Sokal ( $p= >0,05$ ). Dos 103 casos que apresentaram redução de pelo menos 3-log, 45% (47/103) alcançaram também uma RMC.

**Tabela 4.3: Melhores respostas moleculares observadas (n=182)**

	Grupo Total	LMC-FA (n=18)	LMC-FC (n=164)
RMC	50 (27,5%)	3 (17%)	47 (29%)
RMM- ≤ 0.1% EI (3-log)	59 (32,4%)	3 (17%)	56 (34%)
>0.1-1% EI (2-log)	30 (16,5%)	3 (17%)	27 (16,5%)
1-10% EI (1-log)	19 (10,5%)	4 (22%)	15 (9%)
≥ 10% EI	24 (13,1%)	5 (27%)	19 (11,5%)

RMM: resposta molecular maior; RMC: resposta molecular completa, EI: escala internacional; LMC: leucemia mieloide crônica; FA: fase acelerada; FC: fase crônica.

Um grupo de 110 pacientes com LMC-FC tiveram dados disponíveis durante os primeiros 18 meses e ao longo do tratamento com IM. Neste grupo foi analisado o tempo transcorrido para obtenção da RMM. Ao todo, 65 casos (59%) alcançaram uma RMM. Cinquenta e um casos (51/65, 78%) alcançaram a RMM durante os primeiros 18 meses de tratamento, com um tempo médio de 11 meses (6-18 meses) e foram classificados como “respondedores moleculares ótimos”. Dos restantes 14 casos, 7 alcançaram a RMM após 18 meses de IM (entre 18 - 24 meses) e 7 pacientes após 24 meses de terapia com o inibidor.

Assim, 14/65 (21%) dos pacientes com LMC-FC que obtiveram uma RMM foram considerados “respondedores moleculares tardios”, já que necessitaram mais de 18 meses para alcançar a RMM, representando 25% (14/55) dos pacientes que não alcançaram uma RMM até os primeiros 18 meses do tratamento com IM. Nenhum caso dentro do grupo de respondedores tardios alcançou a RMM após aumento de dose do IM. Apenas 3 dos 14 respondedores moleculares tardios (21%) foram pacientes classificados como LMC-FCT. Não foram observadas diferenças entre a duração da FC até o início do IM em relação à rapidez de obtenção da RMM (80% LMC-FCP vs 72% LMC-FCT em até 18 meses de tratamento;  $p=0,208$ , teste log-rank).

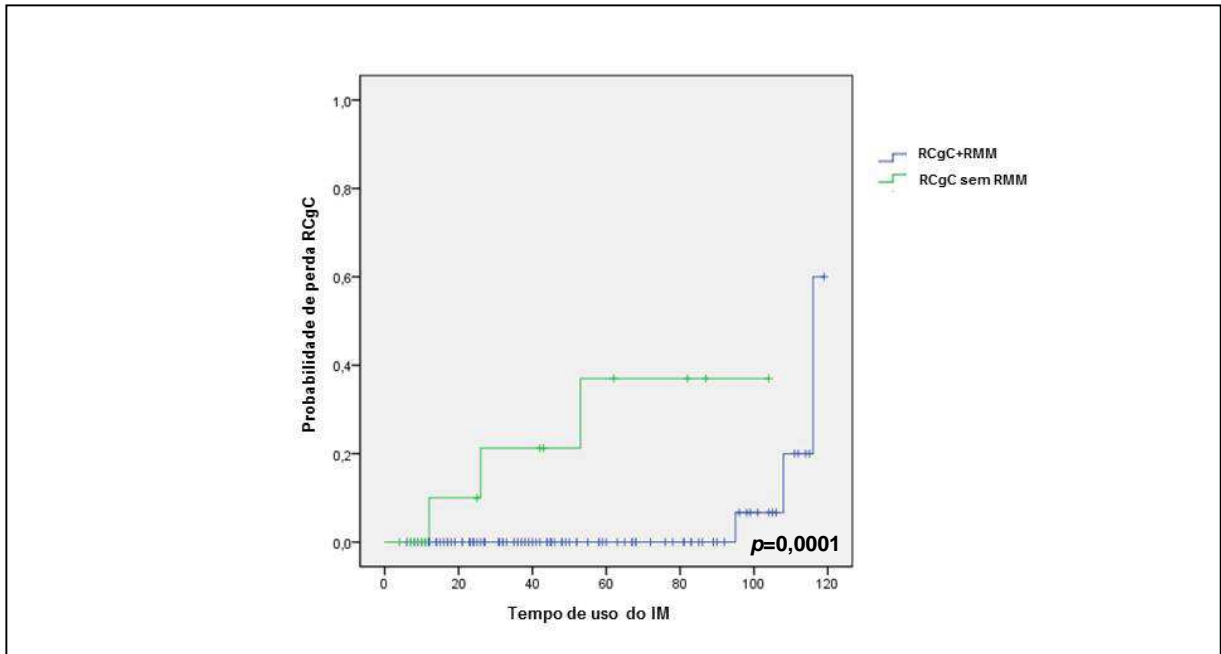
A RMM se manteve estável em 95% (62/65) dos casos, após uma mediana de acompanhamento de 17 meses (3-77 meses) após a obtenção da RMM, 60% dos casos

tiveram um tempo de acompanhamento >12 meses. Dos 3 casos que perderam a RMM obtida, 1 foi classificado como respondedor molecular ótimo (iniciou o tratamento com IM em LMC-FCP) e 2 como respondedores tardios (1 LMC-FCP e 1 LMC-FCT). Dentre o grupo de respondedores moleculares tardios, 86% (12/14), mantiveram uma RMM estável após 48 meses (24-83 meses) de uso do IM e um tempo médio de acompanhamento de 15 meses (2-43 meses) após obtenção da RMM, com 86% dos casos com um tempo maior a 12 meses. Os dois respondedores tardios que perderam a RMM, tiveram índice Sokal baixo ao diagnóstico, alcançando a RMM entre 18-24 e após 24 meses de IM, respectivamente.

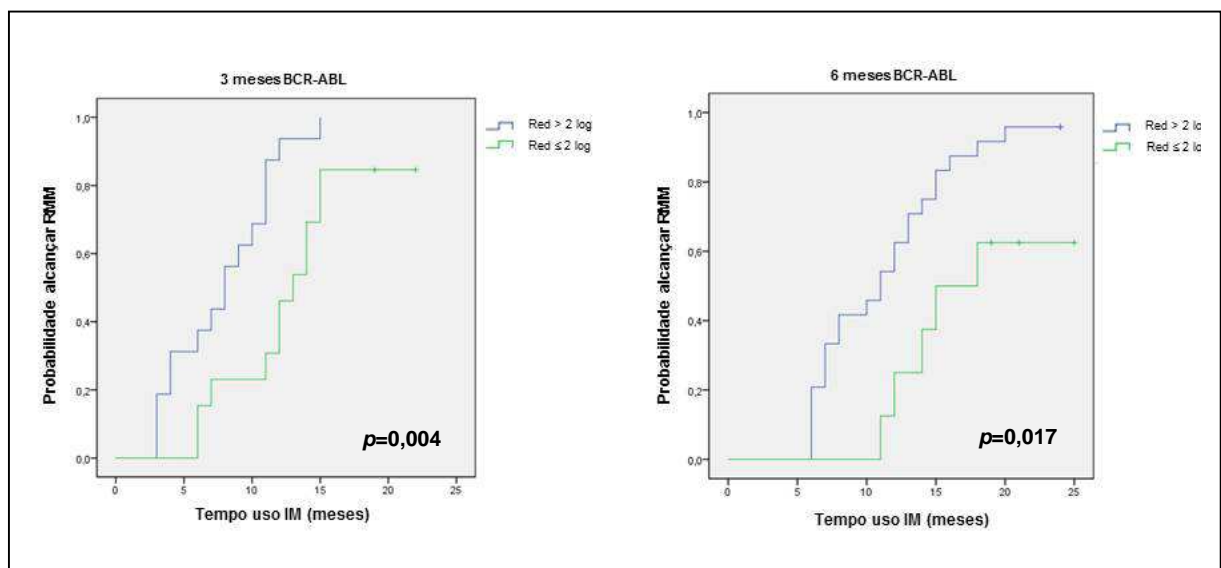
A associação da RMM com a manutenção da RCgC foi analisada em um grupo de 116 casos que apresentaram RCgC e tiveram dados disponíveis da resposta molecular. Destes, 99 casos apresentaram RCgC associada com RMM e/ou RMC, e 17 casos apresentaram RCgC sem associação com RMM e/ou RMC. Quando realizada a análise da probabilidade de perda da RCgC de acordo ao tempo, houve uma diferença significativa entre os grupos com ou sem RMM ( $p=0,0001$ , teste log-rank) (Fig. 4.3). O grupo de pacientes com RCgC sem associação com uma RMM foi caracterizado por uma perda precoce da RCgC, comparado com o grupo que apresentou RCgC com RMM, em que a perda foi verificada mais tardiamente. Nenhum dos casos que apresentou RCgC+RMC perdeu a resposta obtida, com o qual 100% dos pacientes a sustentaram após um tempo médio de acompanhamento de 9 meses (5-45 meses). Os respondedores citogenéticos ótimos e tardios atingiram uma RMM em proporções similares (precoces 84% vs tardios 85%).

A redução da carga tumoral em até 2-logs (valores  $\leq 1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup> em comparação com valores  $>1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>) foi analisada aos 3 e aos 6 meses do início do tratamento com IM. A redução de até  $\leq 1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup> aos 3 e/ou aos 6 meses foi relacionada com uma maior probabilidade de alcançar uma RMM em um tempo de até 18 meses de uso do inibidor ( $p=0,004$  e  $p=0,017$  teste log-rank, respectivamente) (Fig. 4.4). Assim, a probabilidade de

obter uma RMM até 18 meses de uso de IM foi de 100% vs 85% para os pacientes com redução de  $>2$  e  $\leq 2$ -log de BCR-ABL%<sup>EI</sup> aos 3 meses, respectivamente, e de 96% e 62,5% aos 6 meses, respectivamente.

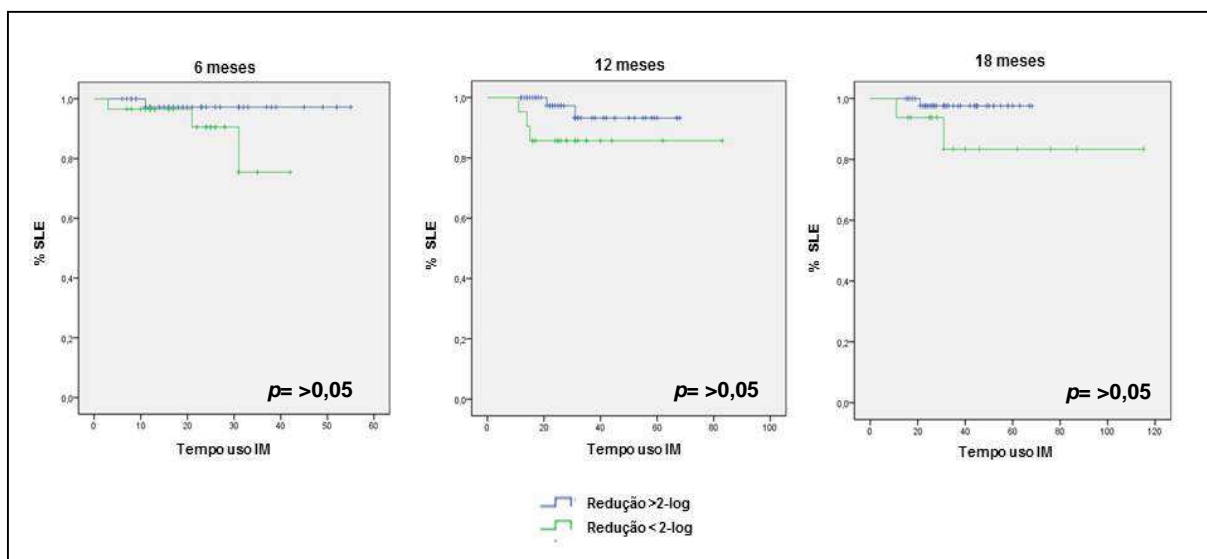


**Figura 4.3: Análise da Perda da RCgC.** Quando realizada a análise de probabilidade de perda da RCgC ao longo do tratamento com IM, houve uma diferença significativa entre os grupos, em que os pacientes com RCgC sem RMM foram caracterizados por uma perda precoce comparado com o grupo dos pacientes com RCgC associada a RMM, em que a perda foi verificada mais tardiamente. Método de Kaplan-Meier com comparação log-rank.



**Figura 4.4: Probabilidade de alcançar uma RMM.** Análise de distribuição de probabilidade de alcançar uma RMM em até 18 meses de tratamento com IM, de acordo à redução de carga tumoral medida por RT-qPCR. Os pacientes foram classificados segundo redução de até 2-log (valores  $\leq 1\%$  EI), aos 3 e aos 6 meses de iniciada a terapia com IM. Os pacientes com redução de até 2-log nos tempos avaliados apresentaram uma maior probabilidade de atingir uma RMM em até 18 meses. Método de Kaplan-Meier com comparação log-rank.

Uma análise recente dos dados moleculares do estudo IRIS, mostrou que a obtenção da RMM após 18 meses de uso do IM (valores  $\leq 0,1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>) esteve relacionada com uma SLE de 95%, comparada com uma SLE de 86% no grupo de pacientes que apresentaram valores dentre 0,1-1% BCR-ABL<sup>EI</sup> e de 65% nos casos com valores  $>1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>, [HUGUES *et al.*, 2010]. Assim, a SLE foi analisada no grupo estudado no presente trabalho em relação à diminuição de até 2-logs do valor de BCR-ABL%<sup>EI</sup> aos 6, 12 e 18 meses do início do tratamento com IM, não tendo sido observadas diferenças significativas nesta análise ( $p=>0,05$ , teste log-rank) (Fig. 4.5).

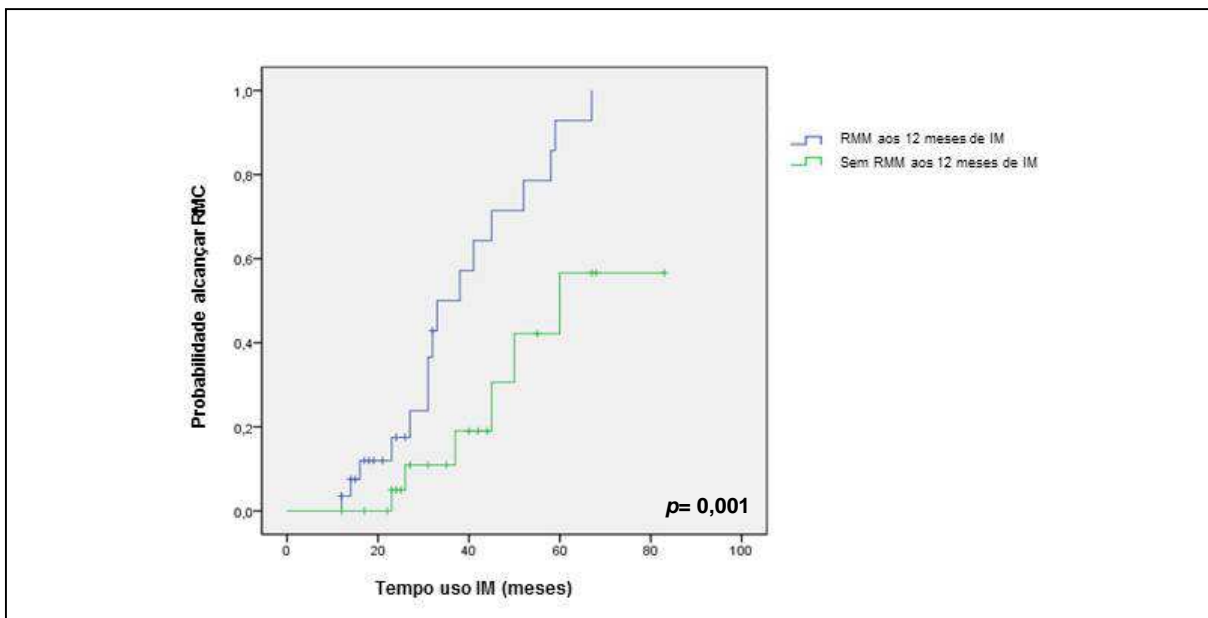


**Figura 4.5: Probabilidade da sobrevida livre de evento com tratamento com IM.** Análise da probabilidade da sobrevida livre de evento (SLE) foi realizada de acordo à redução de carga tumoral apresentada aos 6, 12 e 18 meses de iniciado o tratamento com IM. Os pacientes foram classificados segundo redução de até 2-log (valores  $\leq 1\%$  EI) nos tempos analisados. Esta análise não mostrou diferenças significativas. Método de Kaplan-Meier com comparação log-rank.

Por outro lado, o grupo de pacientes com LMC-FC com dados disponíveis durante os primeiros 18 meses e que alcançaram uma RMM ( $n=65$ ), foi analisado segundo a resposta molecular apresentada após 12 meses de tratamento com IM em relação à posterior obtenção da RMC. Esta análise mostrou que a probabilidade de alcançar RMC foi maior para os pacientes que apresentaram uma RMM aos 12 meses de tratamento com o inibidor comparado com aqueles com valores  $>0,1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup> aos 12 meses (100% vs 58%,  $p = 0,001$  teste



log-rank) (Fig. 4.6). A probabilidade de obter uma RMC em qualquer tempo foi 4,8 vezes maior (Hazard ratio) nos casos que apresentaram uma RMM durante os primeiros 12 meses de tratamento com IM ( $p=0,002$ , regressão de Cox, IC 95% 1,7-13,3)

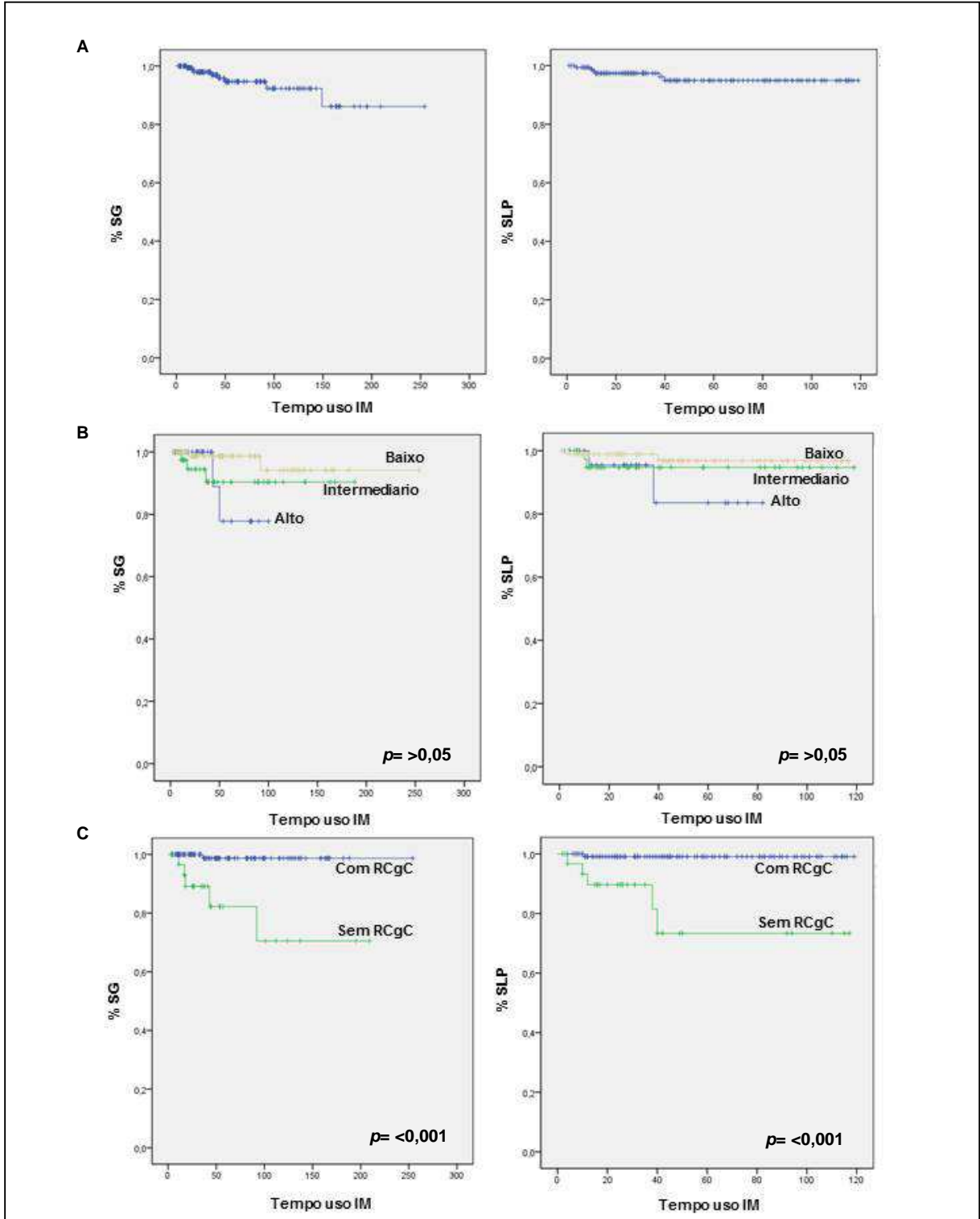


**Figura 4.6: Probabilidade de obtenção de uma RMC.** Análise da probabilidade de alcançar uma RMC em qualquer tempo durante o tratamento com IM. Os pacientes foram classificados de acordo à resposta molecular apresentada após 12 meses de uso de IM. Os grupo que obteve uma RMM em até 12 meses de tratamento, teve uma probabilidade 4,8 vezes maior de obter uma RMC. Método de Kaplan-Meier com comparação log-rank e regressão de Cox.

#### 4.1.5 Análise de SG e SLP

Após um tempo médio de 43 meses de acompanhamento, o grupo de pacientes com LMC estudado neste trabalho apresentou uma SG de 95% e uma SLP de 96% (Fig. 4.7A). Não foram identificadas diferenças significativas na SG e SLP dentre os grupos de pacientes com índice Sokal distinto ( $p>0,05$ , teste log-rank). Entretanto, cabe mencionar que o grupo com classificação de índice Sokal alto, mostrou tanto uma menor SG quanto SLP (Fig. 4.7B). Em contraste, quando a SG e SLP foram analisadas de acordo à obtenção da RCgC em algum momento durante o tratamento com inibidor, foi observado que o grupo de pacientes com RCgC apresentou uma alta e maior probabilidade de sobrevidas mais longas ( $p<0,001$  teste log-rank) (Fig. 4.7C). A probabilidade de uma melhor SG foi 21 vezes maior (Hazard ratio)

nos pacientes com RCgC ( $p=0,005$ , regressão de Cox, IC 95% 2,56-188) e de uma melhor SLP 5,35 vezes maior (Hazard ratio) ( $p=0,001$ , regressão de Cox, IC 95% 2,05-13,09).



**Figura 4.7: Análise de sobrevida global e sobrevida livre de progressão.** A análise da probabilidade de sobrevida global e livre de progressão foi analisada no grupo total (A), de acordo ao índice Sokal discriminado ao diagnóstico da doença (B) e de acordo à obtenção de uma RCgC em algum momento do tratamento com IM (C). O grupo de pacientes com RCgC apresentou uma alta e maior probabilidade de sobrevidas mais longas (C).

## 4.2. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de uma terapia alvo-específica de sucesso no tratamento da LMC constitui sem dúvida o melhor exemplo da tradução do conhecimento do laboratório para a clínica. O alcance das respostas obtidas com o IM superou todas as modalidades terapêuticas anteriores, e atualmente virtualmente todos os pacientes com LMC recém diagnosticados utilizam ITKs.

O tratamento de pacientes com LMC com IM tem demonstrado altas taxas de resposta, com obtenção de uma RCgC em 65 - 85% dos casos, de uma RMM em 40 - 70% e de uma RMC em 10 - 40% [O'BRIEN *et al.*, 2003; DRUKER *et al.*, 2006; KANTARJIAN *et al.*, 2006]. Os resultados obtidos após 7 anos (84 meses) de acompanhamento dos pacientes do estudo IRIS mostram 86% de SG, 81% de SLE e 93% SLP. Além disso, 82% dos casos apresentam uma RCgC, dos quais apenas 17% a perderam durante o tratamento [O'BRIEN *et al.*, 2008]. Os dados obtidos das análises realizadas no presente estudo mostram resultados semelhantes aos relatados na literatura. Após um tempo médio de acompanhamento de 43 meses, nossa série apresentou 95% de SG e 96% de SLP, com 76% de RCgC no grupo de pacientes com LMC-FC, 63% de RMM e 29% dos casos com RMC. Dos casos apresentam uma RCgC, apenas 6% a perderam durante o tratamento, após uma mediana de acompanhamento de 33 meses (2-109 meses) desde a obtenção da resposta.

Segundo o tempo transcorrido desde o diagnóstico da doença, um paciente com LMC-FC pode ser classificado como LMC-FCP ou LMC-FCT (FCT >12 meses desde o diagnóstico). Atualmente, com a introdução dos ITKs, propõe-se que todos os pacientes intolerantes ou resistentes ao INF- $\alpha$  podem ser considerados como LMC-FCT, independente do tempo transcorrido desde o diagnóstico [BACCARANI *et al.*, 2006]. Entretanto, diversos trabalhos que analisam o comportamento clínico e as respostas obtidas em pacientes tratados

com IM como segunda linha de tratamento, reforçam o conceito de que uma série de pacientes intolerantes ou resistentes ao INF- $\alpha$  pode ser considerada como LMC-FCT sempre e quando todos ou a maioria dos casos também inicie a terapia com IM após 12 meses do diagnóstico.

Na série de pacientes com LMC aqui analisada, optou-se por definir a LMC-FCT em relação ao tempo transcorrido desde o diagnóstico. No Brasil, a utilização de IM como primeira linha de tratamento para pacientes com LMC no sistema público de saúde foi somente autorizada em 2008, pelo que na nossa instituição, e conseqüentemente na série aqui estudada, existe um grande número de pacientes que recebeu IM como segunda linha de tratamento, com uma grande variação de tempo transcorrido entre o diagnóstico e o início do IM. Neste contexto, o comportamento das respostas nos pacientes com LMC-FCT na nossa coorte, sua estabilidade e duração devem ser individualizados para uma melhor compreensão e avaliação da resposta terapêutica.

Na literatura, existem numerosos trabalhos relatando as respostas obtidas em pacientes com LMC-FCP tratados com IM em primeira linha. Entretanto, os estudos que analisam pacientes com LMC-FCT com IM como segunda linha de tratamento são menos frequentes, descrevendo taxas de RCgC que variam entre 45-70% segundo a série analisada, e taxas de RMM de 60-74% [KANTARJIAN *et al.*, 2002; CERVANTES *et al.*, 2003; ROSTI *et al.*, 2004; LAHAYE *et al.*, 2005; PALANDRI *et al.*, 2008]. No presente trabalho, a obtenção da RCgC e/ou da RMM não estiveram influenciadas pela duração da FC, mostrando que 82% dos pacientes com LMC-FCT alcançaram uma RCgC e 71% uma RMM. As respostas obtidas pelo grupo de pacientes estudado neste trabalho são semelhantes às descritas na literatura, apesar da proporção de RCgC obtida no nosso grupo ser ligeiramente mais elevada (Tabela 4.4). A nosso entender, esta diferença pode refletir o número amostral disponível para

nossas análises, muito menor na nossa série em relação às descritas (n=41, LMC-FCT). A Tabela 4.4 mostra em detalhe as respostas relatadas em outras séries de pacientes LMC-FCT tratados com IM e os resultados obtidos neste trabalho.

**Tabela 4.4. Respostas obtidas em pacientes com LMC-FCT descritas em series anteriores**

Trabalho	Nº de casos analisados	Tempo médio desde Diag-IM (meses)	RCgM	RCgC	RMM/RMC
Kantarjian et al, 2002 <sup>δ</sup>	454	34	60%	41%	DND
Cervantes et al, 2003	150	21.5	66%	44%	DND
Rosti et al, 2004	191	38	61%	44%	60%
Silver et al, 2004	532	DND	65%	52%	DND
Kantarjian et al, 2004	261	35 (aprox.)	73%	63%	74%
Lahaye et al, 2005	139	31	61%	49%	63%
Palandri et al, 2008	277	38	71%	55%	74%
Hochhaus et al, 2008 <sup>δ</sup>	454	34	67%	57%	DND
O presente trabalho	154				
LMC-FCP	113	2	-	73%	67%
LMC-FCT	41	42	-	82%	71%

<sup>δ</sup> Mesma série, apos mais 6 anos de acompanhamento; Diag: diagnóstico; IM: imatinibe; RCgM: resposta citogenetica maior; RCgC: resposta citogenetica completa; RMM: resposta molecular maior; RMC: resposta molecular completa; DND: dado não disponível.

Por outro lado, diversos estudos descrevem a existência de um grupo menor, mas importante, de pacientes que precisam de um tempo maior que o estipulado para atingir as respostas ótimas, os chamados “respondedores tardios” [HOCHHOUS *et al.*, 2008a; PALANDRI *et al.*, 2008; LUCAS *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2009; HOCHHOUS *et al.*, 2009a]. Alguns dos trabalhos que analisaram pacientes com LMC tratados com IM em primeira linha, sugerem uma associação entre alcançar resposta ótima tardiamente e um prognóstico adverso. [O'BRIEN *et al.*, 2003; CORTES *et al.*, 2005; QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2009]. Entretanto, algumas séries não confirmam esta associação, e mostram que o risco de progressão é similar entre respondedores citogenéticos precoces ou tardios [DRUKER *et al.*, 2006].

Em um trabalho realizado por IACOBUCCI e colaboradores em pacientes com LMC-FCT, foi analisado o tempo de alcance da RCgC. Os autores mostram que o grupo de respondedores tardios apenas tem uma cinética mais lenta, mas após 4 anos de

acompanhamento, estes respondedores citogenéticos tardios apresentam taxas similares de RMM àqueles apresentadas por respondedores precoces, assim como uma SLP e SG semelhante (88% vs 100% e 92% vs 100%, respectivamente) [IACOBUCCI *et al.*, 2006a]. Em outro estudo realizado por PALANDRI e colaboradores foi observado que, após 72 meses de tempo médio de acompanhamento, a proporção de RCgC estável foi similar entre pacientes que atingiram a RCgC em até 12 meses e aqueles que a atingiram mais tardiamente (80% vs 75%) [PALANDRI *et al.*, 2008].

No presente estudo, 15% e 21% dos pacientes que alcançaram uma RCgC e uma RMM, respectivamente, foram classificados como “respondedores tardios”, por precisarem de um tempo maior para alcance das respostas ótimas do proposto pela LeukemiaNet [BACCARANI *et al.*, 2006; 2009]. Estes pacientes representam 32% e 25% dos pacientes que não alcançaram uma RCgC até os 12 meses e uma RMM até os 18 meses do tratamento com IM, respectivamente. Nossos dados indicam que aproximadamente metade do grupo de respondedores citogenéticos tardios está representado por pacientes que iniciaram o IM em FCT (56%). Entretanto, apesar da cinética mais lenta, estes pacientes cursaram com uma alta taxa de RMM (85%). Além disso, uma vez que a resposta citogenética e molecular foram alcançadas, se mantiveram estáveis. Cabe ainda mencionar que não é um consenso que os mesmos parâmetros de resposta descritos pela LeukemiaNet para pacientes com LMC em uso de IM em primeira linha possam ser aplicados aos pacientes que utilizam IM após tratamento com INF- $\alpha$ .

Neste contexto, a identificação e descrição do comportamento dos respondedores tardios descrito no presente trabalho é uma informação importante para a definição dos parâmetros apropriados para a intervenção terapêutica nos pacientes da nossa instituição. De fato, estes pacientes representaram aproximadamente 30% dos casos que não alcançaram

CCgR até 12 meses e/ou RMM até 18 meses. Em apenas 2 casos o aumento de dose foi necessário para atingir a CCgR, em todos os outros casos, as respostas ideais foram alcançados sem modificação da terapia. Assim, em nossa série, não considerar a existência de respondedores com uma cinética mais lenta, resultaria em que 30% dos pacientes candidatos a mudar para um tratamento com ITK-2G, teriam chance mais tardiamente de alcançar RCgC e/ou RMM mantendo a terapia com IM. A importância desta análise está no fato de que, diferentemente dos pacientes acompanhados pela LeukemiaNet para geração das recomendações, em relação ao uso de IM em função das respostas obtidas ao longo do tratamento, um grupo representativo dos pacientes aqui estudados foram tratados previamente com INF- $\alpha$ .

Por outro lado, tem que ser considerado que o tempo e frequência da RCgC e RMM constituem atualmente *endpoints* primários em estudos clínicos para a avaliação da eficácia do tratamento com ITKs. Entretanto, cabe ressaltar que parâmetros precoces (aos 3 meses ou 6 meses de tratamento) capazes de discriminar com segurança entre os pacientes que irão responder obtendo resposta estáveis dos outros que não, ainda não foram identificados. Assim, no contexto atual, é recomendado que para utilização das respostas como parâmetro preditivo da terapia (por exemplo, RCgC ou RMM) os riscos que competem à obtenção das respostas citogenética e/ou molecular devem ser considerados. Para isto, a realização de análises que incluam o cálculo dos CIFs (do inglês *cumulative incidence functions*) ao invés de análises realizadas mediante curvas 1-KM (Kaplan-Meier) seriam altamente recomendadas [PFIRRMANN *et al.*, 2011].

A obtenção da RMM tem sido amplamente descrita como um importante *endpoint* associado à manutenção da RCgC [PASCHKA *et al.*, 2003; IACOBUCCI *et al.*, 2006a]. Em um trabalho realizado por PRESS e colaboradores foi relatado que a obtenção de uma redução

molecular de até 2-log ao momento da RCgC, ou de 3-log em qualquer momento posterior, é um fator preditivo independente significativo da SLP [PRESS *et al.*, 2007]. De forma similar, MARIN e colaboradores mostraram que a probabilidade de perder a RCgC quando associada a RMM foi 0%, comparado com 25% para o grupo com RCgC mas sem RMM após 18 meses de terapia com IM [MARIN *et al.*, 2008]. Nossos resultados estão de acordo com estas observações, mostrando uma probabilidade significativamente menor de perder a RCgC precocemente quando associada com uma RMM, mais ainda, na nossa série, 0% dos casos que apresentaram RCgC associada com RMC perdeu a resposta citogenética obtida.

A redução de >3-log nos níveis de BCR-ABL%<sup>EI</sup> tem sido associada com uma menor incidência de progressão, e a redução de pelo menos 2-logs após 3 e 6 meses de tratamento com IM tem sido associada com o alcance da RMM e um menor risco de progressão. No estudo realizado por BRANFORD e colaboradores, foi identificado que 100% dos casos com uma redução >2-log aos 3 meses e 86.4% dos casos com igual redução aos 6 meses alcançaram a RMM em até 24 meses de tratamento [BRANFORD *et al.*, 2003]. Os resultados obtidos no presente trabalho estão em concordância com o relatado na literatura, mostrando que 100% e 96% dos pacientes que apresentaram reduções de até  $\leq 1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup> aos 3 e 6 obtiveram uma RMM em até 18 meses de uso do IM.

De maneira similar, a rapidez na obtenção da RMM correlaciona-se com uma maior probabilidade de alcançar uma RMC. Pacientes que atingiram a RMM após 9 meses de tratamento com IM têm 93% de probabilidade de evoluir para uma RMC [PRESS *et al.*, 2007; BRANFORD *et al.*, 2007]. Os dados do presente estudo mostram que os pacientes que apresentaram uma RMM aos 12 meses de tratamento com o inibidor têm 100% de probabilidade de atingir também uma RMC.



Entretanto, a análise de nossos dados não confirmou a correlação entre a obtenção da RMM ou redução de até 2-log (valores  $\leq 1\%^{EI}$ ) e uma melhor SLE relatada na literatura [HUGHES *et al.*, 2010]. Contudo, os dados de SG e SLP obtidos na presente série coincidem com o descrito em outros trabalhos, evidenciando assim a eficácia do IM no tratamento da LMC. Da mesma maneira, o grupo de pacientes que obteve uma RCgC em algum momento durante o tratamento com inibidor, apresentou significativamente uma melhor SG e SLP, em concordância com outros relatos [DRUKER *et al.*, 2006; GUILHOT *et al.*, 2009].

## 5. MECANISMOS GENÉTICOS: ANÁLISE DE PRESENÇA DE MUTAÇÕES NO DOMÍNIO QUINASE DO GENE BCR-ABL

### 5.1 RESULTADOS

#### 5.1.1 Seleção de casos e amostras

Para a análise da presença de mutações no DQ do gene BCR-ABL realizadas neste trabalho, foram utilizadas amostras de pacientes com LMC em uso de ITKs acompanhados pelo laboratório de Biologia Molecular do CEMO, provenientes dos serviços de Hematologia e CEMO do INCA, além de pacientes de outros centros parceiros localizados no Rio de Janeiro e adjacências.

Os critérios de inclusão para esta análise seguiram as recomendações atuais propostas pela LeukemiaNet para pesquisa de mutações [BACCARANI *et al.*, 2009; SOVERINI *et al.*, 2011]. Foram estudados pacientes em FA/CB, pacientes que apresentaram falha terapêutica e/ou resposta sub-ótima (falha em atingir uma RHC ou qualquer RCg aos 3 meses de tratamento com IM; RCgM aos 6 meses; RCgC aos 12 meses), e pacientes que tiveram um aumento dos níveis de transcritos BCR-ABL que levaram à perda da RMM.

Uma correlação teórica entre a quantidade de células Ph<sup>+</sup> e os níveis de transcritos BCR-ABL expressados na EI é realizada no intuito de equalizar as respostas citogenética e molecular. Assim, uma RCgM é equivalente a valores de 10% BCR-ABL<sup>EI</sup> e uma RCgC corresponde aproximadamente a 1% BCR-ABL<sup>EI</sup> [BRECCIA *et al.*, 2011]. Pacientes que apresentaram valores >10% BCR-ABL<sup>EI</sup> aos 6 meses de tratamento com IM e >1% BCR-ABL<sup>EI</sup> aos 12 meses são considerados respondedores sub-ótimos e incluídos na análise de presença de mutações.

Do total de 581 pacientes atualmente monitorados pelo Lab. de Biologia Molecular (204 do INCA e 377 de outros centros), um grupo de 126 (22%) se adequou aos critérios descritos anteriormente e foram analisados para presença de mutações no DQ (65 casos provenientes do INCA e 61 de outros centros) (Fig. 4.1, Materiais e Métodos). Ao momento da análise, 13 casos se encontravam em FA e 113 em FC. A seleção das amostras em relação ao critério utilizado é detalhada na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1: Critérios de seleção de amostras para pesquisa de mutações no DQ do gene BCR-ABL**

Procedência	Falha terapêutica*	Resposta sub-ótima*	FA/CB	Perda RMM
INCA (n=65)	16	31	13	5
Centros parceiros adjacentes ao Rio de Janeiro (n=61)	32	29		

INCA: Instituto Nacional de Câncer; FA/CB: fase acelerada e/ou crise blástica; RMM: resposta molecular maior. \*Segundo critérios recomendados pela LeukemiaNet [BACCARANI *et al.*, 2009; SOVERINI *et al.*, 2011].

### 5.1.2 Pesquisa de mutações no DQ do gene BCR-ABL

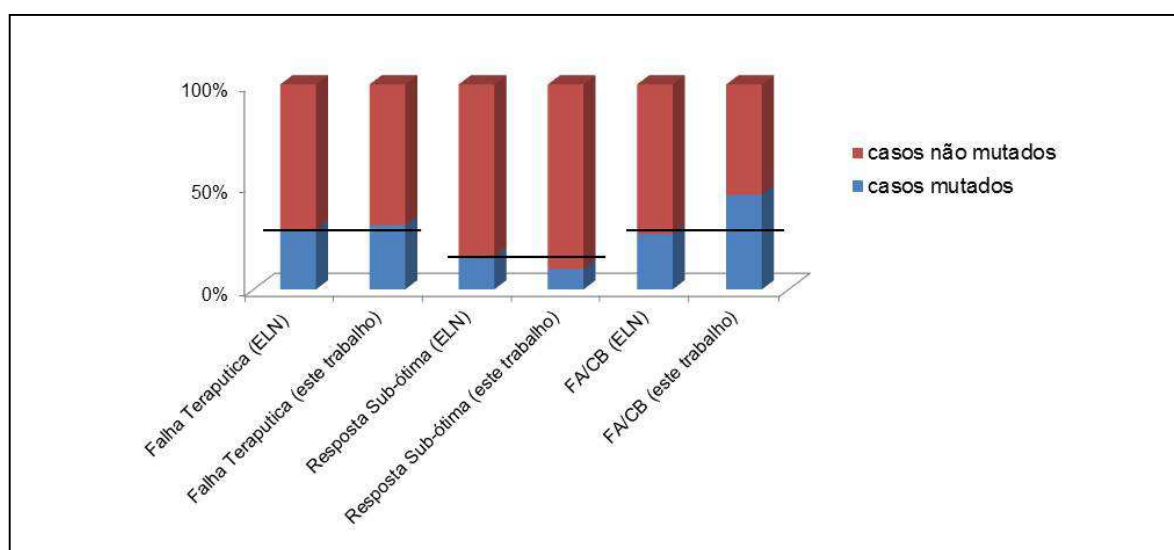
A análise de mutações no DQ foi realizada por sequenciamento direto, de acordo com protocolos já estabelecidos [BRANFORD *et al.*, 2002]. As amostras que apresentaram alguma modificação de seqüência foram submetidas a uma nova amplificação por PCR, purificação, sequenciamento e análise do fragmento, no intuito de confirmar a mutação detectada. Dos 126 casos analisados, 29 apresentaram mutações no DQ (23%). A mutação foi detectada em 6/13 (46%) dos pacientes em FA e em 23/113 (20%) dos pacientes em FC. As principais características clínicas dos casos portadores de mutações são apresentadas na Tabela 5.2. O grupo de pacientes portadores de mutações incluiu 24 homens e 5 mulheres, com uma mediana de idade de 43 anos (18-82). O tempo médio desde o diagnóstico até o aparecimento da mutação foi de 35 meses (3-93), e o tempo médio desde o início do tratamento com ITKs até o aparecimento da mutação foi de 32 meses (3-96).

**Tabela 5.2: Principais características dos pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL (n=29)**

Pt	Idade	Sexo	Tipo de mutação	Sokal	Fase início IM	Uso IM (meses)	Melhor Rta IM	Rta IM (meses)	Acomp. após falha IM (meses)	ITK-2G	Melhor Rta ITK-2G	Fase 1º mutação	Fase 2º mutação	Acomp. após detecção mutação (meses)
14	18	M	G250E	0,6	FCP	15	RCgM	12	20	Sim	RMM	FCT	NA	20
17	55	M	M351T	1,02	FCP	5	RHC	4	5	Sim	RHC	FA	NA	5 §
18	63	F	F486S	5,2	FA	41	RCgC	12	3	Sim	RHC	FCT	NA	3
19	54	F	F359I	1,9	FCT	9	RHC	8	9	Sim	RHC	FCT	NA	9 §
20	24	M	T315I	0,69	FCP	39	RCgP	24	24	Sim	RHC	FCT	NA	24
21	25	M	T315I	0,85	FCP	12	RCgP	9	15	Não	NA	FCT	NA	15
34	70	M	E258K	DND	FCT	63	RCgP	DND	12	Sim	RCgP	FCT	NA	12
36	49	M	E255K	0,64	FCT	66	RCgC	20	24	Sim	RCgC	FCT	NA	24
83	82	M	Y253H	1,78	FCT	36	RCgC	28	NA	Não	NA	FA	NA	6 §
93	45	M	E459K	0,75	FCP	53	RCgC	24	36	Sim	RMM	FCT	NA	48
95	27	F	Y253H/T315I	2,8	FCT	3	RHC	2	12	Sim	RCgC	FCT	FA	15
98	44	M	E255K/T315I	DND	FCT	78	RHC	DND	9	Sim	DND	FCT	FA	3§
106	38	M	M244V	0,75	FCP	95	RCgC	84	DND	DND	DND	FCT	NA	Perda seguimento
124	20	M	E453A	0,52	FCP	48	RCgC	12	DND	DND	DND	FCT	NA	14
155	52	M	A397P	4,9	FA	19	RCgC	6	3	Sim	RHC	FCT	NA	3
189	58	F	F317L	0,93	FCT	84	DND	DND	30	Sim	0,5% BCR-ABL <sup>EI</sup>	FCT	NA	72
202	31	M	M244V	DND	FCP	18	RCgP	6	15	Sim	RMM	FCT	NA	15
205	45	M	G250E	DND	FCT	48	RCgP	DND	DND	DND	DND	DND	NA	Perda seguimento
206	37	M	V268M/E355G	1,03	FCP	48	RCgP	21	17	Não	NA	FCT	FCT	17
207	23	M	F359I/E450G	0,54	FCP	29	RCgP	15	21	Sim	RCgP	FCT	FCT	24
208	61	M	F317L/E275K	0,73	FA	24	DND	DND	DND	Sim	RHC	FCT	DND	15
209	34	F	T315I	DND	DND	25	RCgP	DND	3	Sim	RHC	DND	NA	3
210	43	M	T315I	DND	FCT	36	RCgP	15	14	Sim	RHC	FCT	NA	14
211	43	M	E255V	DND	FCT	48	DND	DND	15	Sim	RCgC	FCT	NA	15
212	30	M	F359V/T315I	DND	FCT	36	DND	DND	2	Sim	DND	FCT	DND	14
213	63	M	F359I	DND	DND	DND	DND	DND	DND	Sim	RMM	FCT	NA	3
214	48	M	M244V	DND	DND	DND	DND	DND	DND	Sim	DND	FA	NA	8
215	56	M	L298V	DND	FCP	DND	DND	DND	DND	DND	DND	FA	NA	Perda seguimento
216	55	M	F486S	DND	FCP	24	RCgP	15	24	Sim	RMM	FCT	NA	24

Pt: numero do paciente. IM: imatinibe. Rta: resposta. Acomp: acompanhamento. ITK-2G: inibidor tirosina quinase de segunda geração. M: masculino, F: feminino. FCT: fase crônica tardia. FCP: fase crônica precoce. FA: fase acelerada. RCgP: resposta citogenética parcial. RCgC: resposta citogenética completa. RCgM: resposta citogenética maior. RHC: resposta hematológica completa. RMM: resposta molecular maior. §: óbito. DND: dado não disponível. NA: não aplicável.

Quando os resultados no grupo de LMC-FC foram avaliados segundo o critério de inclusão para o ensaio, foi observado que as mutações foram identificadas em 15/48 (31%) dos pacientes que apresentaram falha terapêutica, em 6/60 (10%) dos que apresentaram uma resposta sub-ótima e em 2/5 (40%) dos pacientes que tiveram aumento dos níveis de BCR-ABL com perda da RMM (Fig. 5.1). Estes resultados são concordantes com as estimativas relacionadas recentemente pela LeukemiaNet, que descreve que aproximadamente 29% dos pacientes com LMC-FC com critério de falha e 16% dos respondedores sub-ótimos apresentam mutações no DQ, assim como 27% dos LMC- FA [SOVERINI *et al.*, 2011].



**Figura 5.1: Distribuição de mutações detectadas segundo o critério de seleção.** O gráfico mostra a porcentagem de casos mutados vs não mutados detectados neste trabalho de acordo aos critérios utilizados para a seleção dos pacientes submetidos a pesquisa de mutação, em comparação com as frequências descritas pela LeukemiaNet. Alinha preta marca a estimativa relatada em SOVERINI *et al.*, 2011.

Nos 29 casos portadores de mutações, foram identificadas um total de 35 mutações afetando 18 resíduos proteicos distintos, com 6 pacientes apresentando duas mutações distintas, concomitantes ou não. Ao momento da detecção de mutações, 24 pacientes estavam em tratamento com IM e 5 em uso de ITK-2G (3/5 apresentaram 1 mutação com o regime de tratamento anterior e uma nova com o ITK-2G). O tipo e número das mutações identificadas neste trabalho são apresentados na Tabela 5.3. As mutações mais frequentes foram T315I

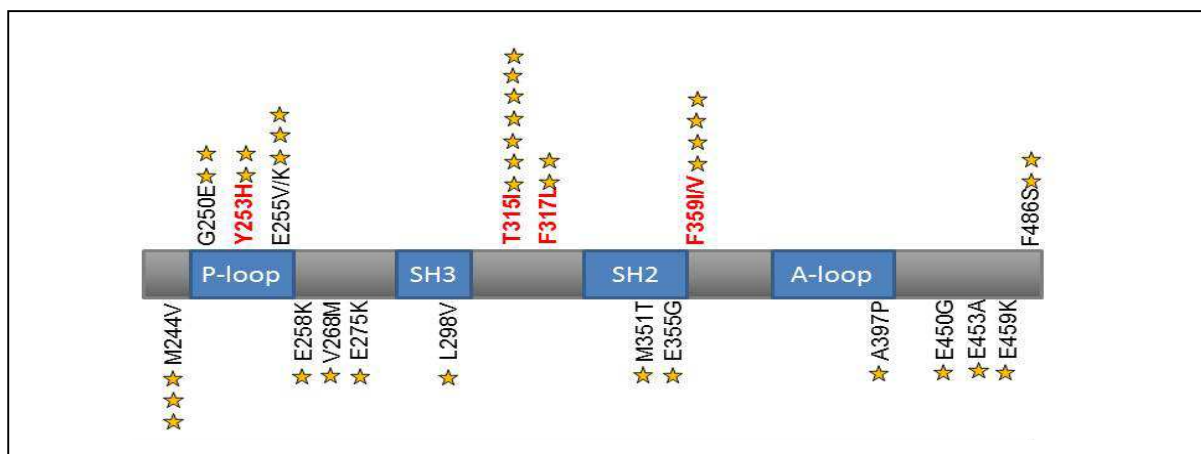
(7/35, 20%), F359I/V (4/35, 11,4%), M244V e E255K/V (3/35, 8,7% de cada uma delas). As 35 mutações identificadas neste trabalho localizaram-se ao longo do DQ do gene BCR-ABL (Fig. 5.2). Sete mutações foram identificadas no *P-loop* (7/35, 20%), uma no domínio SH3 (1/35, 3%), duas no domínio SH2 (2/35, 6%) e uma no *A-loop* (1/35, 3%). O restante das mutações foi identificado em diferentes locais do DQ não relacionados com um domínio proteico específico.

Os resíduos proteicos localizados nas posições 253, 315, 317 e 359 são considerados essenciais para a resposta ao tratamento com IM, já que sua interação com o medicamento através de pontes de hidrogênio e/ou interações de van der Waals é chave para a estabilidade da união do IM e/ou do ATP [SOVERINI *et al.*, 2011]. No presente trabalho, 15/35 (43%) das mutações identificadas se localizaram nestes domínios: Y253H (n=2), T315I (n=7), F317L (n=2) e F359I/V (n=4) (Tabela 5.3 e Fig. 5.2). Quando as mutações identificadas foram classificadas de acordo à resistência e ou sensibilidade ao IM segundo dados de ensaios *in vitro* (valores de IC<sub>50</sub>), observou-se que 12/35 (34%) foram caracterizadas como atribuindo alto grau de resistência ao IM (valores de IC<sub>50</sub>>3000 nM), 14/35 (40%) como de resistência intermediária (valores de IC<sub>50</sub>≤3000 nM) e 1/35 (3%) como sensíveis ao medicamento (valores de IC<sub>50</sub>≤ 1000nM). Os valores de IC<sub>50</sub> para o IM não foram encontrados na literatura para 8/35 (23%) das mutações detectadas neste trabalho.

**Tabela 5.3: Mutações no DQ do gene BCR-ABL identificadas neste estudo (n=35)**

Mutação	Número (%)	Valor de IC <sub>50</sub>	Mutação	Número (%)	Valor de IC <sub>50</sub>
T351I	7 (20)	<b>&gt;3000nM</b>	M351T	1 (2,8)	≤1000nM
F317L	2 (5,8)	≤3000nM	V268M	1 (2,8)	NA
M244V	3 (8,7)	≤3000nM	E355G	1 (2,8)	≤3000nM
F359I/V	4 (11,4)	≤3000nM	E459K	1 (2,8)	NA
E255K/V	3 (8,7)	<b>&gt;3000nM</b>	E453A	1 (2,8)	NA
G250E	2 (5,8)	≤3000nM	E450G	1 (2,8)	NA
Y253H	2 (5,8)	<b>&gt;3000nM</b>	E275K	1 (2,8)	NA
F486S	2 (5,8)	≤3000nM	L298V	1 (2,8)	NA
E258K	1 (2,8)	NA	A397P	1 (2,8)	NA

Valores de IC<sub>50</sub> para imatinibe de acordo a O'HARE *et al.*, 2007 e RADELLI *et al.*, 2009. Sensível ≤1000nM, Intermediário ≤3000nM, Resistente >3000nM. O valor das mutações resistentes ao imatinibe se mostram em negrito. NA: não avaliado.



**Figura 5.2: Localização das mutações identificadas no presente estudo.** P-loop: sítio de união ao fosfato; SH2 e SH3: regiões de contato com proteínas portadoras de domínios SH2 e SH3; A-loop: domínio de ativação. As estrelas amarelas indicam posições das 35 mutações identificadas neste trabalho. As mutações em vermelho indicam aminoácidos diretamente associados na união do IM.

As sete mutações detectadas no *p-loop* foram identificadas em amostras de 7 pacientes, sendo que em dois deles a mutação T315I foi também detectada posteriormente (pts **95** e **98**). As mutações E255K (pt **36**), E255V (pt **211**) e G250E (pt **14**), foram identificadas no momento da falha terapêutica ao IM 400mg/dia após 60, 48 e 12 meses de tratamento, respectivamente. Em ensaios *in vitro*, a mutação E255K/V confere resistência completa ao IM e parcial ao dasatinibe e nilotinibe, e a mutação G250E resistência intermediária ao IM sendo totalmente sensível ao tratamento com dasatinibe e nilotinibe [O'HARE *et al.*, 2007]. Após a detecção das mutações do *p-loop* (E255K/V e G250E) nestes pacientes, o IM foi suspenso, tendo sido iniciado tratamento com ITK-2G (dasatinibe, 100mg/dia). Atualmente, os 3 pacientes se encontram em RCgC com níveis moleculares de ~1% BCR-ABL<sup>EI</sup> e/ou RMM (pt **14**) após 24, 15 e 20 meses de seguimento do tratamento com o ITK-2G, respectivamente. Na última amostra disponível, não foi possível detectar a presença da mutação nos pts **36** e **14** com a sensibilidade oferecida pelo sequenciamento direto.

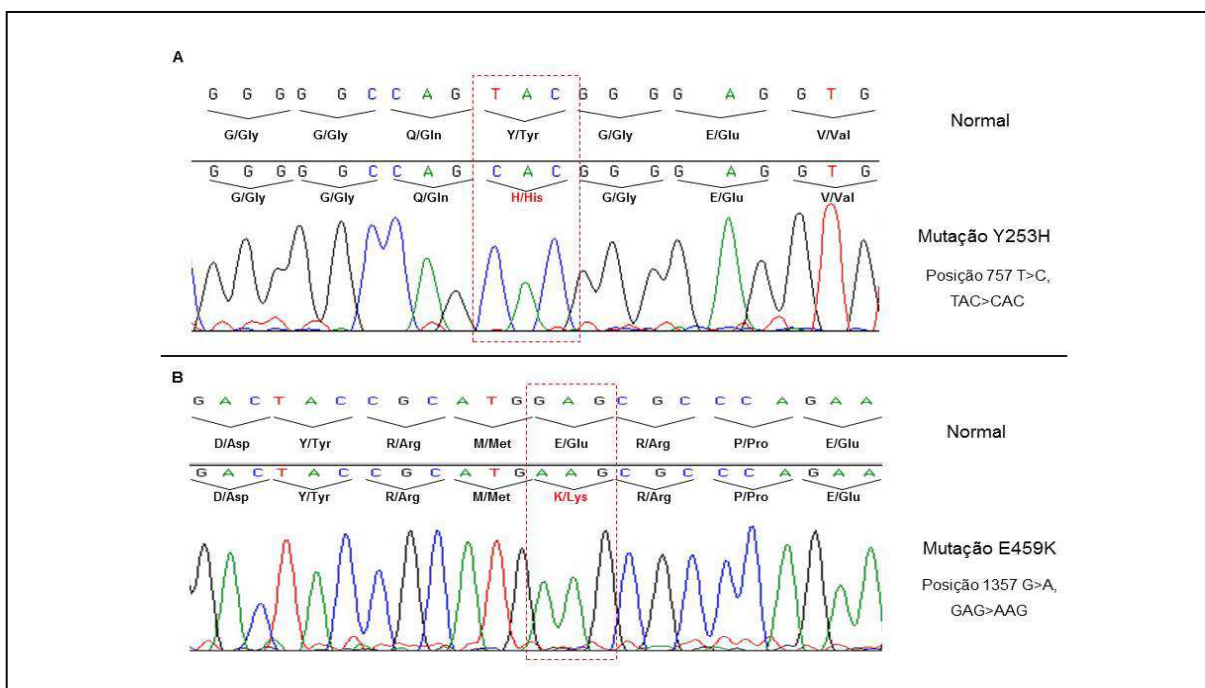
As mutações G250E (pt **205**) e Y253H (pt **83**) foram identificadas após falha ao IM. No caso do pt **205**, a mutação foi identificada após 24 meses tratamento com IM 400 mg/dia,

utilizado como tratamento de resgate da recaída de um aToTCTH. Este paciente teve perda do seguimento. Até o último dado disponível, o pt **205** fazia uso de IM 800 mg/dia, mantendo altos níveis de carga tumoral e presença constante da mutação. No pt **83**, a mutação foi detectada após 30 meses com IM 600mg/dia. O paciente faleceu 6 meses depois de detectada a mutação. Assim, 3/7 (42%) dos casos que apresentaram mutações no *p-loop*, obtiveram respostas satisfatórias com o tratamento com um ITK-2G. Exemplos de esferogramas observados nas análises de presença de mutações realizadas neste trabalho são apresentados na Fig. 5.3.

Como mencionado anteriormente, o resíduo T315 é considerado essencial para a união estável do IM à proteína BCR-ABL, e a mutação T315I é a que representa atualmente o maior desafio terapêutico, já que confere resistência a todos os ITKs disponíveis na prática clínica. Esta mutação foi a mais frequentemente detectada no presente estudo, isoladamente (n=4) ou em combinação com outras mutações (n=3). A mutação corresponde a uma mudança de base única ACT >ATT na posição 944 e produz uma troca de uma treonina por uma isoleucina.

Nos pts **20**, **210** e **209** a mutação T315I foi detectada após 39, 36 e 25 meses de terapia com IM 400mg/dia, respectivamente. Os pacientes portadores desta mutação apresentaram uma RCgP associada a valores de BCR-ABL 2-10% <sup>EI</sup> ao momento da detecção. Após a identificação da mutação, o tratamento com ITK-2G foi iniciado (dasatinibe 100mg/dia). Até o último dado de acompanhamento, a mutação T315I foi detectada em forma contínua nestes 3 casos, e os pacientes mantiveram uma RHC e níveis de carga tumoral que variaram entre 1-7% BCR-ABL <sup>EI</sup> após 24, 14 e 3 meses em uso de ITK-2G, respectivamente. O pt **21** é descrito com maior detalhe na seção 5.1.3.2.



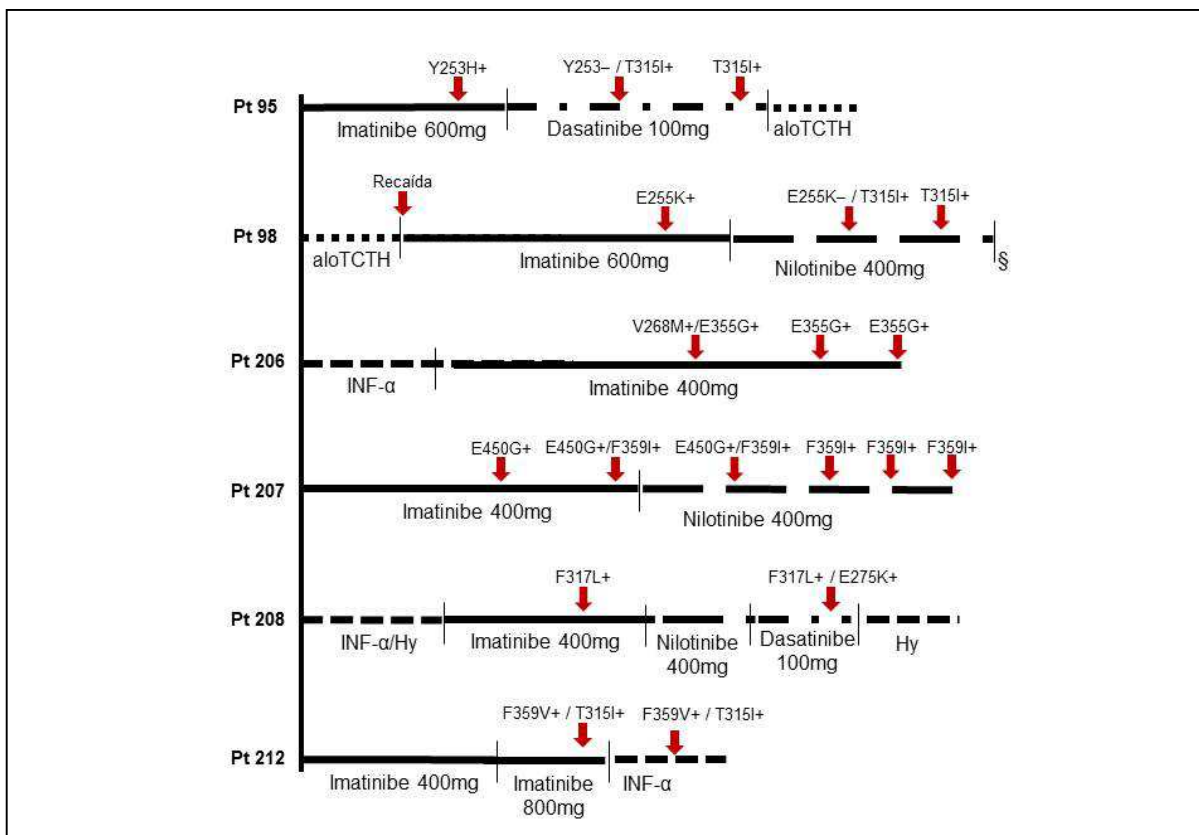


**Figura 5.3: Análise de mutações no DQ.** Esferogramas típicos observados neste trabalho. **A:** paciente **83** portador da mutação Y253H. **B:** paciente **93** portador da mutação E459K. AS caixas vermelhas sinalam o sitio da mutação.

Os pacientes com LMC podem adquirir mais do que uma mutação no DQ do gene BCR-ABL durante a terapia sequencial com ITKs. Estudos anteriores descrevem que após o aparecimento de uma mutação, os pacientes apresentam um risco mais elevado de aparecimento de uma segunda mutação, quando comparados com aqueles que não apresentam nenhuma mutação [SOVERINI *et al.*, 2009b]. No presente trabalho foram identificados 6 pacientes portadores de 2 mutações (pts **95**, **98**, **206**, **207**, **208** e **212**) (Fig. 5.4).

Nos pacientes **95** e **98**, a primeira mutação (Y253H e E255K, respectivamente) foi identificada no momento da falha ao IM, após o que o tratamento com ITK-2G foi iniciado. No paciente **98**, o IM foi ministrado como terapia de resgate depois de recaída de aloTCTH. Após 3 e 4 meses de terapia com o segundo inibidor, respectivamente, o primeiro clone mutado já não foi detectado por sequenciamento direto em ambos os casos, entretanto, foi identificada uma segunda mutação, a T315I. Após a identificação da segunda mutação, o paciente **95** foi submetido a um aloTCTH com sucesso. O paciente **98** faleceu 3 meses após a identificação da mutação T315I (Fig. 5.4).

No caso **206** as duas mutações (V268M e E355G) foram detectadas na vigência de uma resposta sub-ótima ao IM. Apenas a mutação E355G pode ser identificada nas últimas 3 amostras do seguimento, e atualmente o paciente apresenta uma RMM sem ter modificado seu tratamento com IM. No caso **207**, as duas mutações (E450G e F359I) foram detectadas no momento da falha terapêutica ao IM. Após troca de inibidor, o paciente apresentou uma RCgP e níveis de transcritos BCR-ABL  $>10\%^{EI}$ . Na última avaliação, somente o clone F359I foi detectado por sequenciamento direto. Nos casos **208** e **212**, ambas as mutações foram identificadas na falha terapêutica ao IM, sendo detectadas até a última amostra disponível de cada caso. No caso **208** a segunda mutação foi identificada após 8 meses de tratamento com o ITK-2G. Atualmente, ambos pacientes não fazem uso de ITKs, e foram encaminhados para aloTCTH.



**Figura 5.4: Pacientes portadores de 2 mutações.** Esta figura mostra o momento da identificação das duas mutações em cada paciente e a resposta obtida à terapia, sendo identificados 3 padrões distintos: pacientes que apresentaram as 2 mutações em momentos distintos do acompanhamento (pts 95 e 98), pacientes em que as duas mutações foram identificadas conjuntamente apenas por um tempo (pts 206 e 207) e pacientes em que ambas as mutações foram identificadas até a finalização do tratamento com ITKs ou último dado disponível.

Assim, na nossa série, em 21% (6/29) dos casos foram identificadas 2 mutações. Na análise temporal da detecção das mutações destes 6 casos, foram observados 3 padrões distintos em relação ao momento da detecção da segunda mutação e às respostas obtidas com os diferentes algoritmos de tratamento: (i) pacientes que apresentaram as 2 mutações em momentos distintos do acompanhamento, (ii) pacientes em que as duas mutações foram identificadas conjuntamente por um tempo, detectando-se apenas um clone mutado no último período do acompanhamento, e (iii) pacientes em que ambas as mutações foram identificadas até a finalização do tratamento com ITKs (Fig. 5.4). O interesse pela identificação de pacientes portadores de 2 ou mais mutações e o entendimento do comportamento dos clones mutados é uma questão atual e relevante no contexto da utilização dos ITK-2G, e diretamente relacionada com a sensibilidade alcançada pela metodologia utilizada.

### 5.1.3 Padronização de ensaios de piro-sequenciamento para quantificação de mutações do DQ do gene BCR-ABL

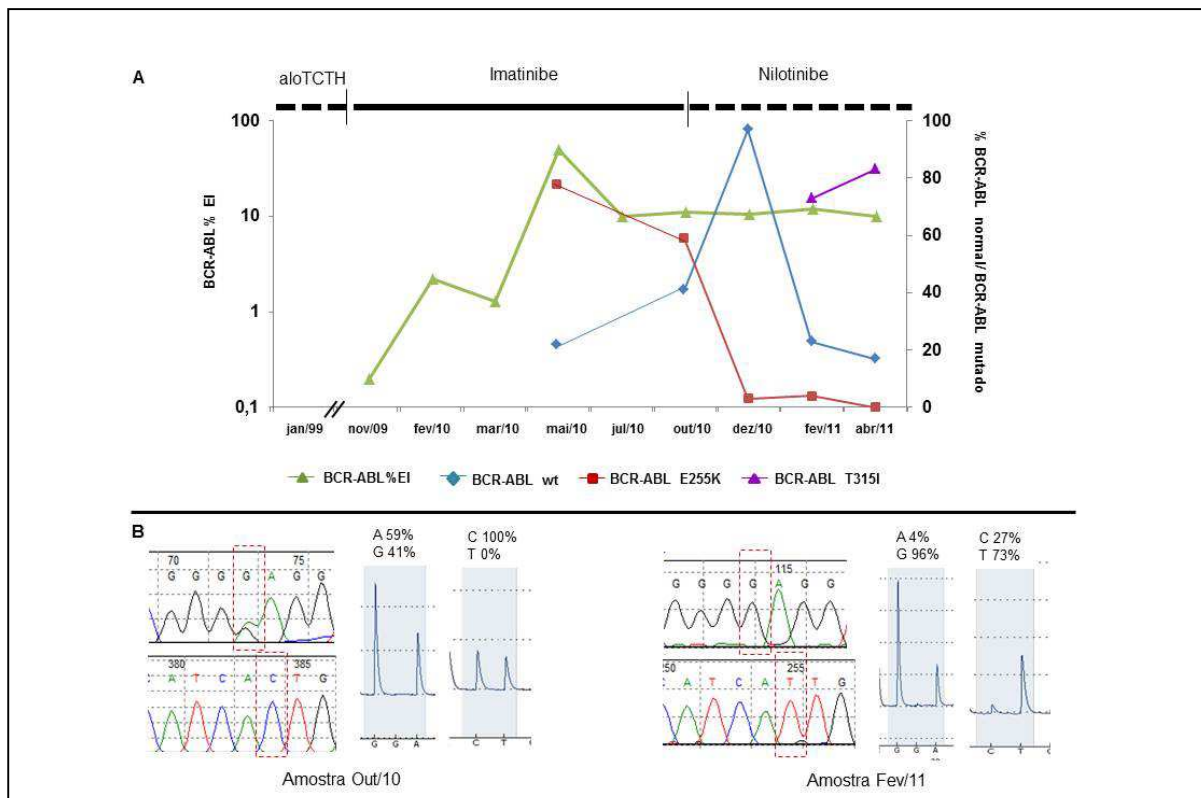
Para avaliar o tamanho e a cinética do(s) clone(s) mutado(s) nos pacientes em que foram detectadas mutações no DQ por sequenciamento direto, um ensaio de quantificação por piro-sequenciamento para pacientes com LMC foi padronizado com base no trabalho de YIN e colaboradores [YIN *et al.*, 2010]. Esta metodologia permite a detecção da mudança relativa dos níveis dos transcritos do clone mutado em comparação aos transcritos *wild-type* do gene BCR-ABL.

O ensaio padronizado neste trabalho permite, com o uso de 4 pares de *primers*, a quantificação de 11 tipos de mutações distintas, incluindo aquelas mais frequentemente apresentadas pelos pacientes resistentes ao IM (Y253H/F, E255K/V, T315I, F317L, M351T e H396R/P). Como descrito na seção 3.6.3, para a amplificação dos fragmentos por piro-sequenciamento, foi utilizada uma estratégia de PCR-*nested*. Na primeira etapa foi

amplificado um fragmento de ~1.500 pb, contendo o transcrito BCR-ABL, e na segunda etapa, o fragmento correspondente à mutação a ser quantificada.

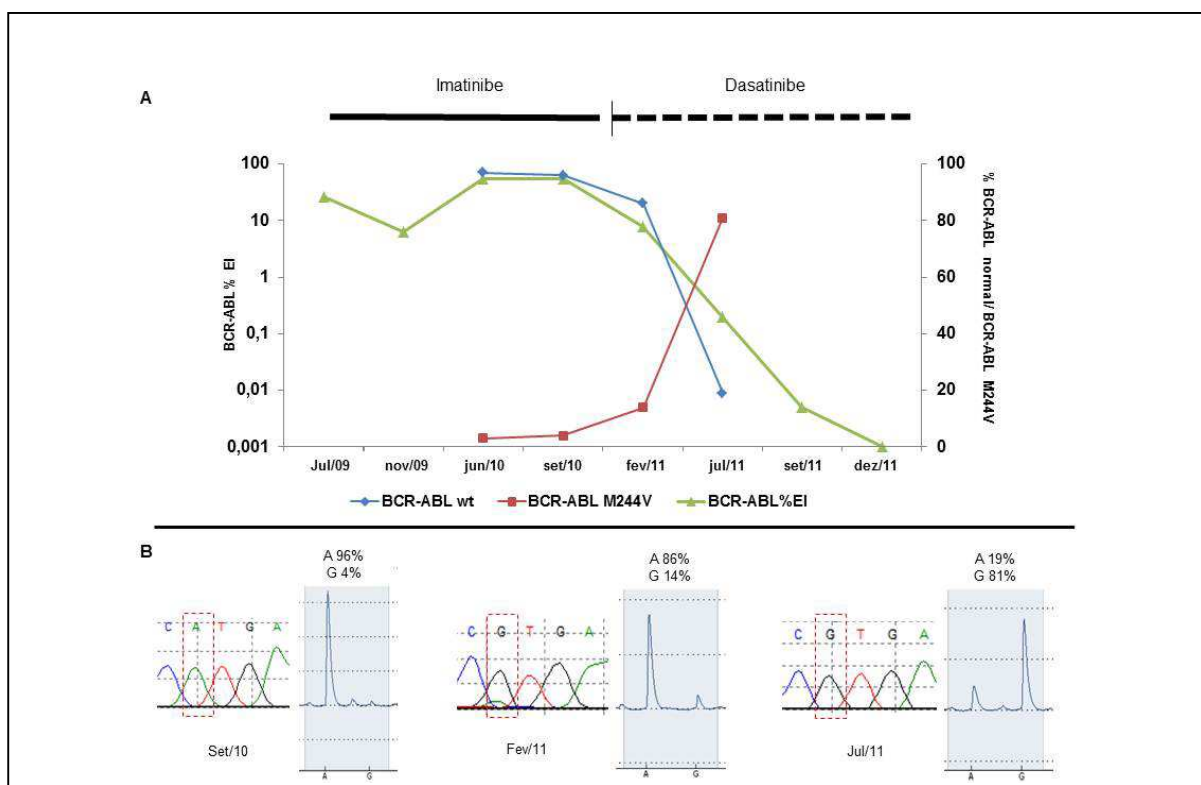
A padronização dos diferentes ensaios de piro-sequenciamento para mutações de importância clínica para a resposta aos ITK foi iniciada para quantificação das mutações F317L, T315I, E255K e M244V, escolhidas por serem as que conferem um alto grau de resistência ao IM. Amostras seriadas de 4 pacientes com LMC portadores destas mutações foram analisadas por piro-sequenciamento (pts **21**, **98**, **189** e **202**). Os dados obtidos mediante a quantificação dos clones mutados e *wild-type* foram comparados com dados de RT-qPCR e de sequenciamento direto.

Como mencionado anteriormente, no paciente número **98** foram identificadas as mutações E255K e T315I em amostras de diferentes tempos de acompanhamento. O paciente, um homem de 44 anos, foi diagnosticado com LMC Ph+ em 1997 e submetido a um aloTCTH em 1999 no CEMO-INCA. Em abril/2004 o paciente apresentou recaída hematológica e, após não obter melhora com infusão de linfócitos do doador (DLI, do inglês *donor leukocyte infusion*), inicia tratamento com INF- $\alpha$  em agosto/2004. Em novembro/2004 inicia tratamento com IM 400mg/dia, e recebe DLI novamente em abril/2005 e agosto/2005. A primeira mutação, E255K, foi identificada no momento da falha terapêutica ao IM em maio/2010. Nesse momento, o tamanho do clone portador da mutação era de 78% (Fig. 5.5). Após 2 meses de terapia com o ITK-2G (nilotinibe), o clone E255K era indetectável por sequenciamento direto, e apenas níveis muito baixos foram detectados por piro-sequenciamento (3-4% do clone E255K+). Entretanto, em fevereiro/2011 se identificou o aparecimento de uma segunda mutação, a T315I. A partir deste momento, os resultados de quantificação mostraram que o clone majoritário era de fato o T315I (73%). O paciente faleceu 3 meses após a identificação da segunda mutação.



**Figura 5.5: Paciente portador das mutações E255K e T315I.** **A:** o gráfico mostra a cinética de detecção das diferentes mutações e dos níveis de expressão de BCR-ABL%EI no paciente 98 ao longo do acompanhamento. **B:** comparação dos resultados obtidos por sequenciamento direto e por piro-sequenciamento de duas amostras do paciente, uma ao momento da troca de inibidor e outra no momento de identificação da segunda mutação.

No paciente **202** foi identificada a mutação M244V. O paciente, um homem de 31 anos, foi diagnosticado com LMC Ph+ em 2009, iniciando tratamento com IM 400mg/dia. Após 18 meses sem obtenção de RCgC e apresentando níveis  $\sim 10\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>, o tratamento com ITK-2G foi iniciado em fevereiro/2011, momento em que se detecta a presença da mutação por sequenciamento direto. A quantificação retrospectiva da mutação mostrou níveis de 5-6% do clone mutado nas amostras anteriores. As análises destas amostras por sequenciamento direto não detectaram mutações (Fig. 5.6). Com a mudança de inibidor, a carga tumoral diminui. O piro-sequenciamento mostrou que a diminuição da carga tumoral foi acompanhada pela redução do clone *wild-type* do BCR-ABL, e que os níveis de carga tumoral observados em julho/2011 ( $\sim 0,1\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup>) foram devidos principalmente à presença do clone positivo para a mutação M244V.



**Figura 5.6: Paciente portador da mutação M244V. A:** o gráfico mostra a cinética de detecção da mutação e dos níveis de expressão de BCR-ABL%EI no paciente 202 durante o tratamento com ITKs. **B:** comparação dos resultados obtidos por sequenciamento direto e por piro-sequenciamento.

### 5.1.3.1 Paciente portador da mutação F317L

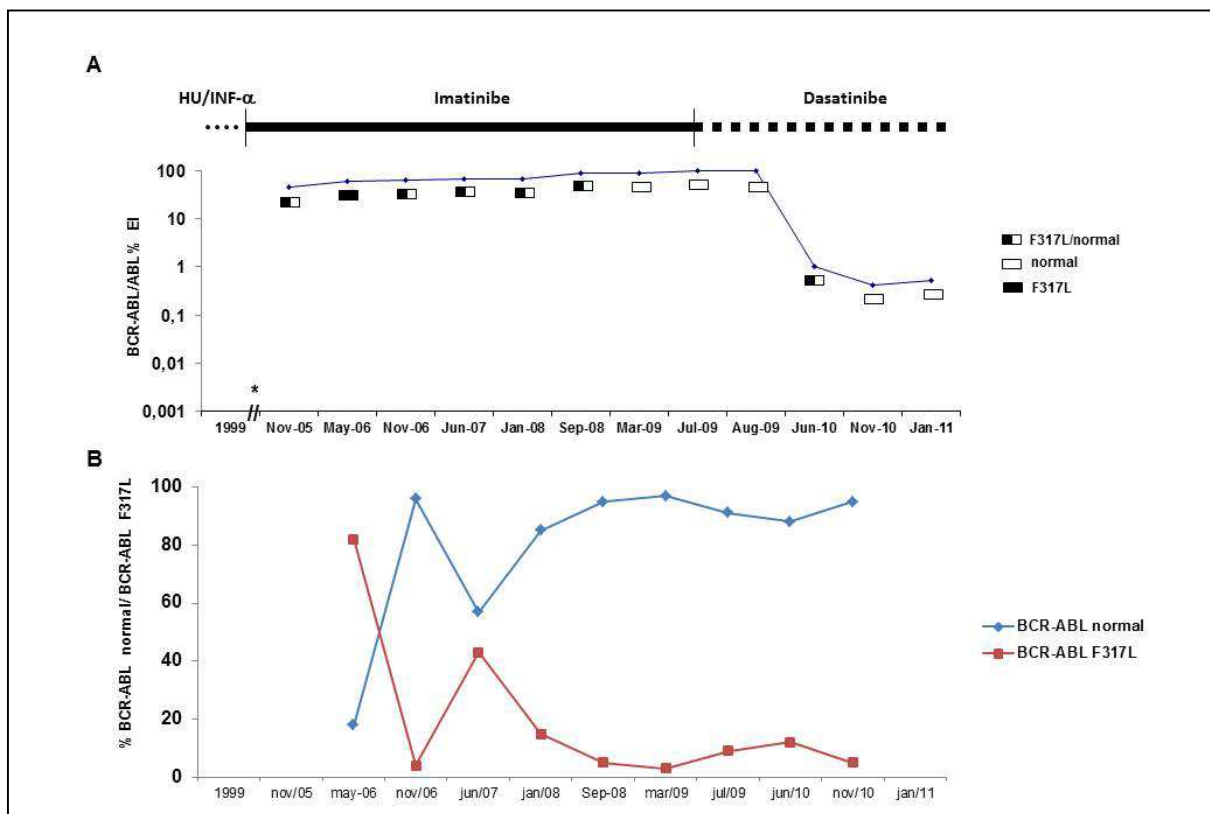
A mutação F317L corresponde à mudança genética TTC>TTA na posição 951, que produz a troca de uma fenilalanina por uma leucina no aminoácido 317 da proteína. Esta mutação determina uma resistência intermediária ao IM e ao dasatinibe [O'HARE *et al.*, 2007]. Embora vários trabalhos confirmem os resultados *in vitro*, alguns relatos recentes mostraram que a presença da mutação F317L pode nem sempre se traduzir no aparecimento de um fenótipo de resistência clínica em pacientes com LMC tratados com dasatinibe [FABER *et al.*, 2010].

No presente trabalho, a paciente **189**, de sexo feminino, 58 anos, foi diagnosticada com LMC em 1999 no serviço de Hematologia do INCA. As análises de citogenética mostraram um cariótipo Ph-, mas a presença da t(9,22) foi confirmada por FISH e pela

biologia molecular (Multiplex BCR-ABL+,  $10^{-3}$ ). A paciente fez uso de hydroxyureia desde o diagnóstico até fevereiro/2002, após o qual foi iniciado tratamento com INF- $\alpha$  por um período de 4 meses. Em julho/2002 a paciente iniciou tratamento com IM 400mg/dia, alcançando uma RHC. Em julho/2009 o IM foi suspenso de maneira definitiva por intolerância. Seguidamente, deu-se início à terapia com dasatinibe 100mg/dia, que continua até o ultimo dado disponível. A paciente permaneceu em FC ao longo de todo o acompanhamento (Fig. 5.7A).

A monitorização molecular da LMC era baseada em métodos de PCR qualitativos (multiplex e PCR-*nested*) até novembro/2005, a partir daí, a quantificação dos níveis de transcritos de BCR-ABL passou a ser realizada por RT-qPCR. Níveis elevados de BCR-ABL foram detectados consistentemente durante todo o seguimento da terapia com IM (PCR multiplex+ e valores  $>10\%$  BCR-ABL<sup>EI</sup> (Fig. 5.7A). A mutação F317L foi detectada por sequenciamento direto em setembro/2008, quando este tipo de teste molecular ficou disponível na instituição, e a análise retrospectiva de material arquivado mostrou a presença da mutação F317L em todas as amostras coletadas para o acompanhamento da terapia com IM.

Excetuando a amostra de junho/2012, o clone F317L+ não foi detectado por sequenciamento direto desde março/2009. Recentemente, foi possível quantificar o tamanho do clone mutado através do piro-sequenciamento, mostrando que o clone F317L+ se manteve em baixos níveis durante todo o período (5-10%), chegando a ser em alguns momentos quase indetectáveis (Sep/08–Jul/09). Estes resultados demonstram que a alta carga tumoral que a paciente apresentava era principalmente pela expansão do clone BCR-ABL *wild-type* (Fig. 5.7). No último dado disponível, a paciente apresentou níveis BCR-ABL<sup>EI</sup> em torno de 0,51%, mas uma RMM nunca foi alcançada.



**Figura 5.7: Paciente portador da mutação F317L.** **A:** o gráfico mostra a cinética de detecção da mutação por sequenciamento direto e os níveis de expressão de BCR-ABL%EI no paciente 189. **B:** cinética do clone F317L+ em comparação com o clone BCR-ABL *wild-type* por piro-sequenciamento.

### 5.1.3.2 Paciente portador da mutação T315I

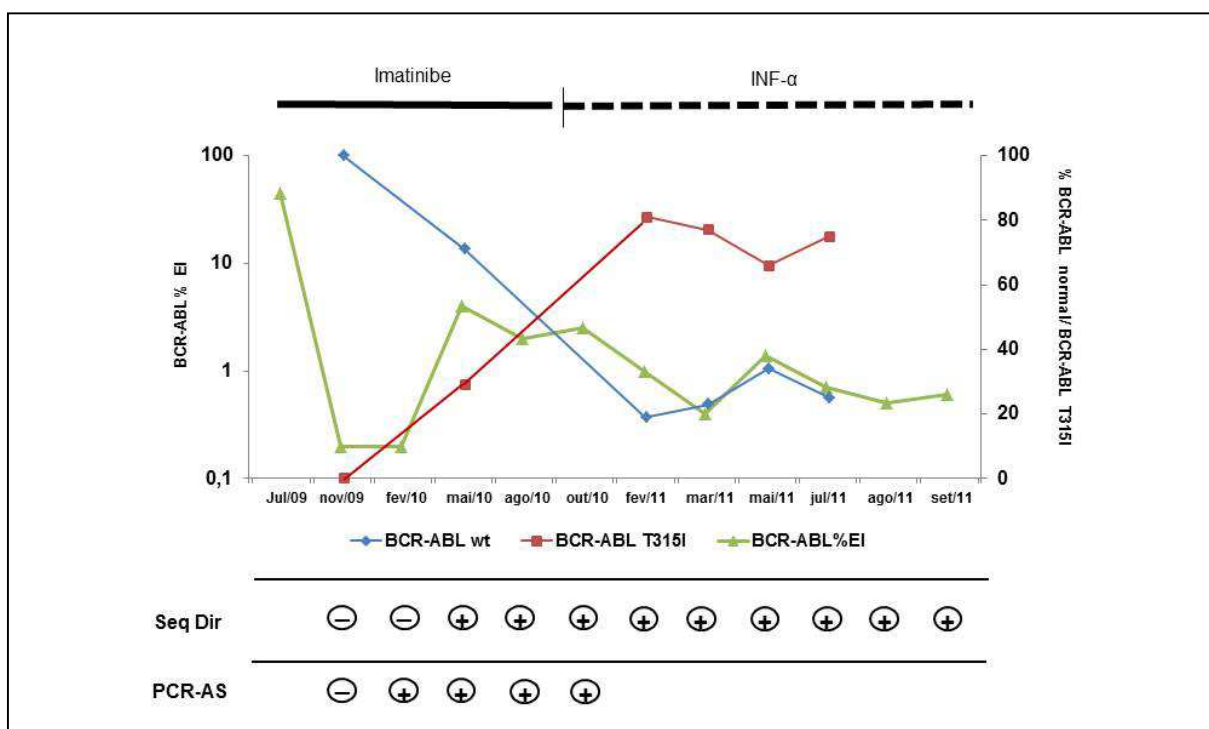
A mutação T315I corresponde à mudança genética ACT > ATT na posição 944, que produz a troca de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315 da proteína. O paciente **21**, um homem de 20 anos, foi diagnosticado com LMC Ph+ em julho/2009. Em agosto/2009 inicia IM 400mg/dia, e alcança RCgC com RMM seis meses depois, em fevereiro/2010. Entretanto, em maio/2010, com a perda da RMM previamente alcançada, a pesquisa de mutações por sequenciamento direto detecta a presença da mutação T315I.

Com a perda subsequente da RCgC 5 meses após a detecção da mutação, o paciente suspende o uso do IM e inicia tratamento com INF- $\alpha$  em outubro/2010, tratamento que mantém até o último dado disponível. A análise retrospectiva das amostras do acompanhamento, tanto por sequenciamento direto quanto por PCR-AS (*vide seção 5.1.4*),



mostrou que com a técnica mais sensível era possível identificar a mutação na amostra de fevereiro/2010 (Fig. 5.8).

Após um ano de tratamento com INF- $\alpha$ , na última amostra do acompanhamento (novembro/2011), o paciente apresentava 7% células Ph+ e níveis de transcritos BCR-ABL dentre 1-5%<sup>EI</sup>. Este paciente nunca fez uso de ITK-2G. A construção da cinética do clone positivo para a mutação T315I mostrou que, após um aumento substancial de aproximadamente 5% para 80% do clone T315I+, em um período de um ano (fevereiro/2010 até fevereiro/2011), a quantidade permaneceu relativamente estável desde o início do tratamento com INF- $\alpha$ , em torno a 70-80%. Estas observações evidenciam que, como esperado, a carga tumoral identificada através da medição de transcritos BCR-ABL era um reflexo do tamanho do T315I+ (Fig. 5.8).



**Figura 5.8: Paciente portador da mutação T315I.** O gráfico mostra a cinética do clone T315I+ em comparação com o clone BCR-ABL *wild-type* por piro-sequenciamento e os níveis de expressão de BCR-ABL%EI no paciente 21. Na parte inferior da figura se indica o resultado obtido por sequenciamento direto para pesquisa de mutações, e por PCR-AS para pesquisa da mutação T315I, nas amostras analisadas. Seq Dir: sequenciamento direto. PCR-AS: PCR alelo específico para mutação T315I. +: positivo. -: Negativo.

#### 5.1.4 Padronização e utilização de uma reação de PCR-AS para detecção da mutação T315I

Dentre as diversas metodologias descritas para a detecção de mutações no DQ do gene BCR-ABL, o método baseado na amplificação por RT-PCR seguido por sequenciamento direto, que apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 20%, é a metodologia mais amplamente utilizada, tendo sido extensamente discutido na literatura que esta sensibilidade se correlaciona satisfatoriamente com a clínica e frequentemente precede o aparecimento da resistência à terapia com ITKs [BRANFORD *et al.*, 2003].

A utilização de metodologias mais sensíveis para pesquisa de mutações é uma questão controversa, já que foi relatado que a identificação de um clone mutado em baixa quantidade não se traduz necessariamente no aparecimento futuro de resistência [SOVERINI *et al.*, 2009a]. Entretanto, métodos altamente sensíveis, como ensaios de PCR alelo-específica, podem ser úteis para detecção de mutações que conferem forte grau de resistência aos ITKs, beneficiando os pacientes portadores com uma janela de tempo para possível intervenção terapêutica. Dentro deste contexto, a detecção precoce devido à utilização de uma metodologia de maior sensibilidade apresenta um papel central para a mutação T315I, já que é a única mutação altamente resistente a todos os ITKs atualmente disponíveis na prática clínica.

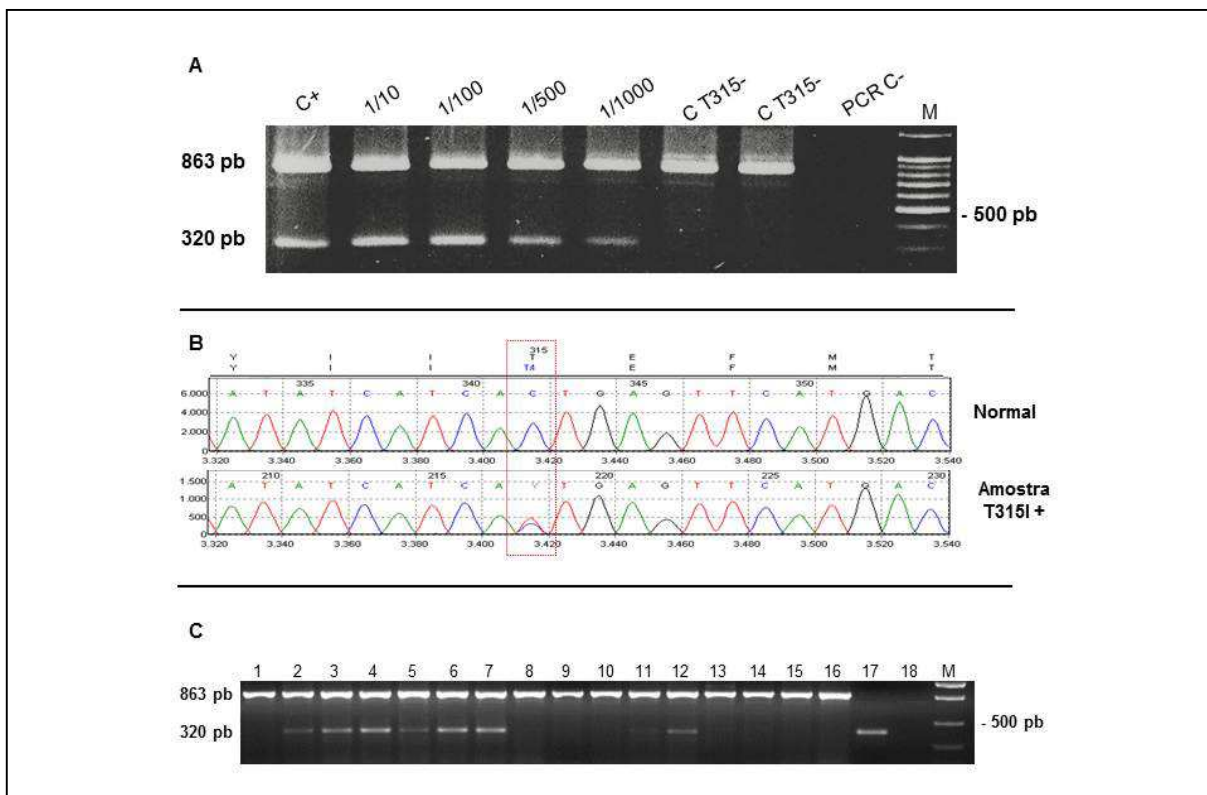
Assim, foi desenvolvido um ensaio de PCR-AS para identificar a mutação T315I, utilizando 3 *primers* em uma mesma reação: 2 externos (Abl-KF 5'-cgcaacaagcccactgtct -3' e Abl-KR 5'-tccacttcgtctgagatactggatt -3') e um terceiro específico para a mutação (AS-T315 5'-cgtagtcatgaactcaa -3'). O ensaio foi padronizado para um volume total de 50 µl, contendo 10 pmol dos *primers* Abl-KF e AS-T315, 3 pmol do *primer* Abl-KR, 1x de tampão de PCR (Invitrogen), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/l de cada dNTP, 6% de DMSO, 1.5U da enzima DNA polymerase Taq Platinum (Invitrogen) e 5 µl de cDNA.

As condições de amplificação foram 5 min a 94°C, seguido de 37 ciclos de 30 seg 94°C, 40 seg a 56.5°C e 1 min a 72°C, e extensão final 10 min a 72°C. Amostras de 15 pacientes com LMC com RCgC e RMM, e 10 pacientes com neoplasias hematológicas não-LMC foram utilizados como controles negativos. A escolha da temperatura de anelamento dos *primers* foi crítica para o sucesso do método, sendo 56,5°C a temperatura com melhor amplificação dos controles positivos T315I. Temperaturas maiores de 60°C não produziram amplificação, enquanto que temperaturas menores de 55°C mostraram bandas de amplificação inespecíficas no grupo controle não-LMC (n=10) [MANRIQUE *et al.*, 2011].

No intuito de avaliar o nível de sensibilidade do ensaio, foram realizados testes em triplicata com diluições seriadas de misturas de RNA de um paciente com LMC portador da mutação T315I e RNA da linhagem celular K562 (1/10, 1/100, 1/500, 1/1.000). As diluições foram retro-transcritas e avaliadas mediante o ensaio de PCR-AS. O nível mínimo de detecção do ensaio foi de  $10^{-3}$  (Fig. 5.5). A diluição 1/1.000 deu resultados positivos em 78% dos ensaios (Conf. Int 95% = 0,40-0,97), a diluição 1/500 em 89% (Conf. Int 95% = 0,51-0,99), entanto que as diluições 1/100, 1/10, e as amostras controle sem diluição, deram resultados positivos em 100% dos casos.

Os 126 pacientes com LMC selecionados para pesquisa de mutações foram avaliados pelo ensaio de PCR-AS. A mutação T315I foi detectada em 7/126 (5%) dos casos e em nenhuma das amostras controle (0/15). Em 6/7 dos casos positivos, a mutação foi detectada também por sequenciamento direto. No caso **20**, a mutação não foi detectada na primeira análise por sequenciamento. Com o dado positivo do PCR-AS, foi realizada uma segunda análise das sequencias, onde foi observado um pico muito pequeno, previamente considerado como *background* do ensaio de sequenciamento direto.

Em 3 dos casos portadores de mutação T315I (pts **20**, **21** e **95**) foi possível realizar o ensaio de PCR-AS de forma retrospectiva, e assim poder comparar o momento da detecção da mutação mediante este método com os resultados do sequenciamento direto. Nesses 3 casos, o PCR-AS detectou a presença da mutação T315I sempre em uma amostra anterior à detecção através do sequenciamento direto, mostrando assim a utilidade do ensaio na detecção precoce desta mutação.



**Figura 5.9: Detecção da mutação T315I.** **A:** Ensaio de sensibilidade para o PCR-AS. Linha 1: Controle positivo (C+) sem diluir; linha 2: diluição de C+/K562 1/10; linha 3: diluição de C+/K562 1/100; linha 4: diluição de C+/K562 1/500; linha 5: diluição C+/K562 1/1000; linhas 6 e 7: duas amostras de LMC BCR-ABL+ /T315-; linha 8: controle negativo de PCR. **B:** Esferograma representativo de uma sequência de um caso positivo para a mutação T315I. A caixa vermelha indica a base mutada. **C:** Linhas 1-4 pt **21**: a mutação foi detectada por sequenciamento direto na amostra da linha 3. ; Linhas 5-7 pt **20**: a mutação foi detectada por sequenciamento direto na amostra da linha 6. Linhas 8-12 pt **95**: a mutação foi detectada por sequenciamento direto na amostra da linha 12. Linhas 13 e 14: amostras não-LMC. Linha 15: linhagem celular K562. Linha 16: amostra de um caso de LMC portador da mutação F317L. Linha 17: amostra controle positivo T315I. Linha 18: controle negativo de PCR. M: marcador de peso molecular.

## 5.2 DISCUSSÃO

A pesquisa para identificação de mutações no DQ do gene BCR-ABL é rotineiramente utilizada em pacientes com LMC tratados com ITKs que não apresentam respostas ótimas de acordo com o tempo transcorrido desde o início do tratamento [BACCARANI *et al.*, 2006; 2009]. A presença de mutações no DQ é o parâmetro de maior associação com o fenótipo de resistência à terapia com ITK. Conseqüentemente, conhecer o status mutacional de um paciente constitui uma informação de base complementar para a definição de uma estratégia terapêutica individualizada para um paciente específico. Este parâmetro é fundamental se considerarmos a disponibilidade atual de utilizar diversos ITK-2G.

A frequência e tipo de mutação se associam ao fenótipo resistente em 30-60% dos casos resistentes ao IM, variando nas distintas séries analisadas. Segundo a LeukemiaNet, a pesquisa de mutações no DQ do gene BCR-ABL é recomendada em casos de falha terapêutica e/ou de resposta sub-ótima ao IM [SOVERINI *et al.*, 2011]. Dos pacientes com LMC-FC que apresentam falha ao tratamento com IM, estima-se que aproximadamente 29% sejam portadores de mutações. Diferenças na frequência de mutação entre os pacientes com resistência primária ou secundária foram observadas [SOVERINI *et al.*, 2006a; SOVERINI *et al.*, 2011].

Trabalhos recentes relatam que mutações no DQ do BCR-ABL são detectadas em ~ 16% dos respondedores sub-ótimos. Estas frequências podem variar de acordo à série estudada, já que é bem estabelecido que os pacientes com resposta citogenética sub-ótima compreendem um grupo muito heterogêneo, associado a evoluções clínicas diferenciadas. Ainda que um grupo minoritário seja portador de mutações, as recomendações atuais ressaltam que o conhecimento do status mutacional de um respondedor sub-ótimo é uma informação central para a definição da estratégia terapêutica.

Os resultados da pesquisa de mutações deste trabalho estão em concordância aos estimados pela LeukemiaNet [SOVERINI *et al.*, 2011]. No grupo de LMC-FC foram identificadas mutações em 15/48 (31%) dos pacientes que apresentaram falha terapêutica e em 6/60 (10%) dos que apresentaram uma resposta sub-ótima. Dos casos com LMC-FA analisados neste estudo, 46% apresentaram mutações no DQ. Assim, na nossa série, 97/126 (77%) dos casos que tiveram indicação para pesquisa de mutações, não apresentam mutações no DQ do gene BCR-ABL, sugerindo que outros mecanismos que não a presença de mutação, podem estar operantes nos pacientes deste estudo classificados como respondedores sub-ótimos ou com falha terapêutica.

Um aumento dos níveis de transcritos BCR-ABL de mais de 2 vezes foi associado com a presença de mutações, sendo proposto como valor de corte na monitorização molecular para se iniciar o estudo mutacional [BRANFORD *et al.*, 2004]. Estas observações não foram confirmadas por outros estudos, entretanto, foi proposto que este aumento deve ser observado em pelo menos 2 amostras consecutivas para ser considerado um indicador forte de presença de mutações no DQ do BCR-ABL [WANG *et al.*, 2006]. Mais ainda, o consórcio internacional recomenda a pesquisa de mutações apenas quando o aumento nos níveis de BCR-ABL resulta na perda da RMM, considerando qualquer outro aumento como uma situação de "cuidado" [SOVERINI *et al.*, 2011]. No presente trabalho, 2/5 (40%) dos pacientes que tiveram aumento dos níveis de BCR-ABL com perda da RMM foram positivos para a análise de mutações no DQ.

Mais de 100 mutações diferentes já foram descritas no DQ do gene BCR-ABL. As mais comumente identificadas em pacientes com LMC que apresentam resistência à terapia com IM são aquelas que envolvem os aminoácidos da posição 248-255. Particularmente, as mutações G250E, Y253H/F e E255K/V, compreendem em conjunto aproximadamente o 50%

das mutações detectadas nos casos resistentes ao IM. Outras das mais frequentes são as detectadas na região de ligação do inibidor, particularmente T315I e F317L, e no domínio catalítico da proteína, como as mutações M351T e F359I [BRANFORD *et al.*, 2007; APPERLEY, 2007]. O tipo e frequência das 35 mutações identificadas no presente estudo estão de acordo ao descrito na literatura, sendo as mais frequentes T315I (20%), F359I/V (11,4%) e M244V e E255K/V (8,7% de cada uma delas).

O *P-loop* é um domínio altamente conservado, onde frequentemente são identificadas mutações nos pacientes resistentes ao IM. Alguns estudos têm sugerido que as mutações do *P-loop* teriam particularmente um prognóstico adverso. Em um estudo realizado em pacientes com LMC, BRANFORD e colaboradores relataram que 13/27 dos pacientes portadores de mutações tinham mutações no *p-loop*, sendo que 12 destes 13 pacientes evoluíram para a FA e faleceram, em contraste com 3/14 pacientes com mutações em locais diferentes do *P-loop* [BRANFORD *et al.*, 2003]. Entretanto, outros trabalhos não confirmam estes achados [JABBOUR *et al.*, 2006].

Atualmente, com a introdução dos ITK-2G na prática clínica, um grande número dos pacientes com LMC resistentes ao tratamento com IM e portadores de mutações no *p-loop*, obtêm respostas satisfatórias após a mudança de inibidor. Assim, a questão atual parece não ser apenas a localização no *p-loop*, mas o tipo de mutação apresentada. Os ITK-2G, mais potentes e com químicas diferentes, parecem ser capazes de reverter o quadro de resistência ao IM produzido pela maioria das mutações, com exceção de um grupo pequeno e bem caracterizado composto, por exemplo, pelas mutações T315I, F317L, e E255K/V [MÜLLER *et al.*, 2009]. O valor adverso das mutações que ocorrem no *p-loop* parece estar mais associado ao uso do IM, que se une apenas a conformação inativa da proteína BCR-ABL, sendo menos críticas para o funcionamento dos ITK-2G. Particularmente, esta situação é mais

clara para o dasatinibe, que se une tanto com a forma ativa quanto inativa da proteína BCR-ABL [TOKARSKI *et al.*, 2006].

Através de ensaios *in vitro*, sabe-se que os distintos ITK-2G apresentam níveis variáveis de sensibilidade/resistência às diversas mutações, assim, conhecer o tipo de mutação apresentada por um paciente antes da mudança de tratamento para ITK-2G é uma informação que auxilia a escolha terapêutica. Entretanto, relatos de pacientes portadores de mutações tidas como de resistência intermediária que obtêm boas respostas com os distintos ITKs são crescentes na literatura, indicando que é dos estudos clínicos que virão as evidências definitivas do comportamento dos clones mutados.

Sete das 35 mutações (20%) detectadas no presente trabalho foram identificadas no *P-loop*. Destes 7 casos, 3 (42%) obtiveram respostas satisfatórias após tratamento com ITK-2G (os pacientes portadores das mutações E255K, E255V e G250E, identificadas durante o tratamento com IM), alcançando uma RCgC com valores de transcritos BCR-ABL entre 1-0,01%<sup>EI</sup>. Por outro lado, em dois casos com mutações no *p-loop*, a mutação T315I foi também identificada posteriormente. O clone portador da mutação do *p-loop* já não foi detectado por sequenciamento direto após poucos meses de terapia com o ITK-2G nestes 2 casos. Assim, na série estudada no presente trabalho, a introdução de um ITK-2G foi eficiente para erradicação do clone com mutação no *p-loop*, sendo que 5/7 eram mutações classificadas como de resistência intermediária a algum dos ITK-2G.

Embora a presença de mutações no DQ tenha sido descrita principalmente em pacientes com LMC-FA ou em pacientes com LMC-FC com falha terapêutica, alguns estudos sugerem que mutações podem ser encontradas virtualmente em todos os pacientes com LMC ao diagnóstico quando uma técnica de alta sensibilidade é utilizada [SOVERINI *et al.*, 2009a]. Além disso, sugerem que seja pouco provável que a maioria dessas mutações confira uma



vantagem à célula neoplásica sob a pressão seletiva dos ITKs. Assim, alguns autores colocam o conceito de que a utilização de técnicas de alta sensibilidade para procura de mutações não é recomendável, já que poderia levar a decisões terapêuticas precipitadas.

Entretanto, esta linha de pensamento parece estar mudando, sobre tudo à luz da utilização dos ITK-2G. Em um trabalho recente, PARKER e colaboradores, utilizando uma técnica de alta sensibilidade (limite de detecção 0.05-0.5%), mostraram o impacto da identificação precoce de mutações em pacientes que falharam à terapia com IM. Nesse estudo, os autores identificaram um total de 132 mutações em 64 pacientes. Após a mudança de tratamento para um ITK-2G, 84% dos clones com mutações detectadas em baixo nível aumentaram rapidamente, podendo ser detectadas por sequenciamento direto. Estes pacientes apresentaram uma menor probabilidade de obtenção de RCgC e de SLE, comparado com os pacientes sem mutações [PARKER *et al.*, 2011]. Assim, pareceria que a detecção de clones mutados em baixos níveis após falha ao IM ofereceria uma informação a ser considerada na seleção da terapia subsequente.

A nosso entender, a utilização de um método sensível de detecção deve ser considerada principalmente para a mutação T315I, uma vez que a sua detecção em baixos níveis poderia indicar uma conduta de acompanhamento clínico e laboratorial mais frequente, permitindo assim a intervenção terapêutica em uma situação de ainda baixa carga tumoral, principalmente tendo em conta que diversos inibidores específicos para a mutação T315I estão sendo desenvolvidos, e que pelo menos um (Ponatinib, ARIAD Pharmaceuticals) se encontra em fase de estudo clínico.

Neste contexto, nós desenvolvemos um ensaio de PCR-AS para a detecção da mutação T315I, que representa um ensaio fácil e conveniente para ser utilizado na rotina laboratorial para a procura rápida da mutação. O método se mostrou sensível, específico e reproduzível,

com uma sensibilidade de  $1 \times 10^{-3}$ , em contraste com a sensibilidade do sequenciamento direto (20%), o que permitiu detectar a mutação T315I ainda em presença de baixos níveis de carga tumoral. Além disso, esta metodologia é simplificada por não precisar um PCR adicional para avaliar a qualidade do cDNA, já que na mesma reação também é amplificado um fragmento de 863 pb, utilizado como controle interno de qualidade [MANRIQUE *et al.*, 2011].

Com este tipo de ensaio, a mutação T315I foi detectada em 7/126 pacientes resistentes ao IM e em nenhuma das amostras controle. Em um destes casos, a mutação não foi detectada na primeira análise por sequenciamento direto, sendo detectada somente em uma segunda análise, após o resultado do PCR-AS. A mutação T315I não foi detectada em amostras que apresentaram outras mutações. Este ensaio, junto com o sequenciamento direto, constitui uma estratégia eficaz para o acompanhamento de pacientes com LMC e detecção rápida de mutações.

Tem sido também relatado que a utilização de técnicas mais sensíveis é importante para identificar pacientes portadores de múltiplas mutações. Em um trabalho recente realizado em pacientes com LMC resistentes ao IM, foi mostrado que mediante a utilização deste tipo de abordagem, foi possível identificar um grupo portador de várias mutações que apresentaram um risco elevado de prognóstico adverso. Assim, a idéia proposta pelos autores é que em posse de informação precoce da presença de mutações por conta de uma maior sensibilidade, estes pacientes, que representaram 15.5% dos casos analisados nesse trabalho, poderiam beneficiar-se com um monitoramento mais frequente ou com a utilização de terapias experimentais para reduzir o risco elevado de falha aos ITK-2G [PARKER *et al.*, 2012].

Pacientes portadores de mais de uma mutação tem sido relatados frequentemente na literatura nos últimos anos, sendo proposto que pacientes resistentes ao IM que apresentam ao

menos uma mutação no DQ teriam uma maior probabilidade de adquirir uma segunda mutação sob a pressão seletiva dos ITK-2G [SOVERINI *et al.*, 2009b]. Desta maneira, pareceria provável que neste sub-grupo de pacientes, uma alta instabilidade genética poderia promover rapidamente o aparecimento de várias mutações, que seriam ou não selecionadas dependendo do ITK-2G utilizado. A identificação de duas mutações no mesmo clone BCR-ABL, as chamadas "*compound mutations*", tendem a aumentar a atividade oncogênica do clone BCR-ABL+.

Assim, a identificação e monitoramento de pacientes com dupla mutação mediante técnicas mais sensíveis e/ou que permitam a quantificação dos clones e a construção de uma cinética ao longo do tratamento ocupa um papel central nestes casos. Diversos relatos na literatura descrevem padrões diferenciados de comportamento dos clones mutados [KHORASHAD *et al.*, 2008b]. Na nossa série, 6/29 casos mutados apresentaram duas mutações, sendo detectados 3 padrões distintos em relação ao tipo e momento de detecção da mutação. Um dos padrões observados reflete a detecção transiente de um dos clones mutados (pts **206** e **207**), muitas vezes associado à mudança de inibidor. Um outro comportamento observado mostra à persistência de detecção de ambas as mutações, sendo associado, de uma forma geral, à presença de mutações como T315I ou F317L (pts **208** e **212**).

O terceiro padrão observado esteve relacionado com o aparecimento de uma segunda mutação, a T315I, identificada após poucos meses de terapia com ITK-2G, em um momento em que os pacientes começavam a responder à nova terapia e o clone portador da primeira mutação identificada não era mais detectado. Este padrão de comportamento dos clones mutados e a recaída em tratamento com ITK-2G pela presença de uma nova mutação é frequentemente relatada na literatura [KHORASHAD *et al.*, 2008b; SOVERINI *et al.*, 2009b]. A cinética dos clones mutados através da utilização dos ensaios de piro-

sequenciamento no paciente **98** permitiu inferir que muito provavelmente, as 2 mutações encontravam-se em dois clones BCR-ABL distintos, já que enquanto um representava o 80% da carga tumoral, o outro permaneceu indetectável.

Estes resultados levantam a questão do momento de formação do clone T315I, já que o fato da mutação ter sido detectada pouco tempo após o início da terapia com ITK-2G implica que, muito provavelmente, ele existia e foi rapidamente selecionado pela presença do inibidor. O mecanismo preciso que vincula o aparecimento de um clone com uma mutação resistente com os eventos subsequentes não é clara, entretanto, este tipo de situações evidencia a necessidade de detecção precoce de um clone resistente emergente com o objetivo de erradicá-lo o antes possível.

Além da importância na avaliação da cinética dos clones mutados em pacientes portadores de mais de uma mutação, as técnicas que permitem a quantificação de mutações são também importantes no acompanhamento de pacientes que apresentam apenas uma mutação. O comportamento clínico diferenciado observado entre pacientes portadores de uma mesma mutação sugere que a presença de um determinado clone mutado não seria condição única e suficiente para predição precoce de resposta e/ou resistência à terapia com ITKs. De fato, alguns trabalhos que analisaram a cinética dos clones mutado em pacientes com LMC, mostraram que o aparecimento da resistência nem sempre está relacionado ao aumento do clone positivo para a mutação [KHORASHAD *et al.*, 2006]. Assim, o conhecimento do comportamento cinético do clone portador da mutação é uma informação adicional relevante.

Por outro lado, o monitoramento da cinética de mutações como F317L e T315I, descritas de sensibilidade intermediária e/ou altamente resistente aos ITK-2G, pode ser considerado chave para a correta avaliação da estratégia terapêutica. No presente trabalho, a quantificação dos clones mutados no pt **189**, portador da mutação F317L, permitiu identificar

que, mesmo durante o período em que foi possível detectar a mutação pelo sequenciamento direto, o clone F317L não era majoritário, chegando a níveis máximos de 40%. Consequentemente, os altos níveis de transcritos BCR-ABL observados até a mudança de tratamento com ITK-2G, não seriam provocados pelo clone portador da mutação. Assim, neste caso fica evidente que outros fatores, que não a presença da mutação F317L, estão relacionados com a resistência ao IM.

FABER e colaboradores descreveram pela primeira vez um paciente F317L positivo que alcançou e manteve uma RCgC e RMM com dasatinib após falha ao IM, e, recentemente, ESCAZAN e colaboradores e OYEKUNLEA e colaboradores relataram mais 2 novos casos com comportamento clínico semelhante [FABER *et al.*; 2010; ESCAZAN *et al.*, 2011; OYEKUNLEA *et al.*, 2011]. Além disso, POTENZA e colaboradores relataram um caso de LLA Ph+ onde a mutação F317L foi identificada durante a terapia com IM. Curiosamente, a mutação ficou indetectável sob a administração do tratamento combinado de IFN- $\alpha$  e IM, e o paciente alcançou uma RMC logo após iniciar tratamento com dasatinibe [POTENZA *et al.*, 2009]. Um quadro de linfocitose e/ou derrame pleural foi identificado em alguns desses pacientes anteriormente mencionados, e os autores propõem que essas situações clínicas possam ter contribuído para a eficácia terapêutica do dasatinibe, sugerindo possíveis efeitos imunomoduladores do medicamento.

No caso descrito em nosso trabalho, apesar de nunca ter sido detectada linfocitose, a paciente relatou dor no peito, mas sem febre e níveis normais de gasometria arterial, eletrocardiograma e eco-cardiograma. As radiografias de tórax também mostraram estavam normais (não disponível para revisão). Embora a paciente mantivesse uma RHC estável durante todo o acompanhamento, o nível de BCR-ABL%<sup>EI</sup> se permaneceu elevado, com detecção da mutação. Nossos dados contribuem para a ideia de que a presença da mutação

F317L não sempre se traduz em um prognóstico adverso em pacientes com LMC tratados com dasatinibe, ressaltando a importância do conhecimento e descrição destes casos para um melhor entendimento do real papel dos clones mutados no tratamento e resposta da LMC.

Por outro lado, a cinética do clone T315I+ no pt **21**, permitiu observar que a estabilidade observada nos níveis de transcritos BCR-ABL do paciente a partir do momento em que a terapia com o IM foi suspensa, foi acompanhada por uma relativa estabilidade na quantidade do clone mutado, em torno de 70%. Diversos relatos sugerem que a cinética dos clones mutados podem ser alteradas quando a pressão seletiva do inibidor é retirada. Em um trabalho recente, HANFSTEIN e colaboradores mostraram que a interrupção do tratamento com ITKs pode levar à diminuição do clone portador da mutação T315I até níveis muito baixos, oferecendo uma alternativa terapêutica, sempre que acompanhado de um frequente monitoramento da cinética do clone mutado [HANFSTEIN *et al.*, 2011].

Fica cada vez mais evidente a necessidade de desenvolvimento de plataformas que permitam monitorar o tratamento dos pacientes com LMC em uso de ITKs através de informações integradas que incluam, por exemplo, a quantificação da carga tumoral, a avaliação da presença de mutações e o comportamento cinético dos clones mutados vs *wild-type* ao longo do tratamento. A construção deste tipo de plataformas permitirá um entendimento mais completo da situação particular de cada paciente, possibilitando a construção de um algoritmo individual e adaptado de tratamento para cada caso, o que sem dúvidas se traduzirá em um enorme benefício terapêutico para os pacientes com LMC.

## 6. MECANISMOS EPIGENÉTICOS: O PAPEL DOS MIRNAS NA LMC

### 6.1 RESULTADOS

#### 6.1.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs maduros por *arrays* de TLDA

##### 6.1.1.1 Seleção de pacientes e amostras

Para análise de expressão de miRNAs maduros por *arrays* de TLDA foram selecionados 17 pacientes com LMC-FC Ph+ tratados com IM. Os critérios de seleção incluíram (i) disponibilidade de amostras ao diagnóstico, (ii) dados clínicos e laboratoriais completos e (iii) um tempo mínimo de 24 meses de seguimento após o início do tratamento com ITKs. O grupo estudado incluiu 11 homens e 6 mulheres, com uma mediana de idade de 40 anos (18-73). Os pacientes foram discriminados de acordo ao tempo transcorrido do diagnóstico da doença até o início do tratamento com IM (FCT >12 meses desde o diagnóstico) em FCP (n=13) ou FCT (n=4). Antes do IM, 12 pacientes receberam IFN- $\alpha$  por >1 mês. Cinco pacientes receberam IM como primeira linha de tratamento. O tempo médio de acompanhamento desde o diagnóstico até o último dado disponível foi de 55 meses (18-112).

Quando classificados de acordo aos critérios de resposta recomendados pela LeukemiaNet, dez pacientes foram caracterizados como respondedores ótimos (Resp-IM) (RCgC em até 12 meses de IM 400mg/dia) e 7 como resistentes ao IM (Resist-IM) (Tabela 6.1) [BACCARANI *et al.*, 2006; 2009]. Seis dos 7 pacientes resistentes apresentavam 100% Ph+ aos 6 meses e/ou >35% Ph+ após 12 meses de tratamento de IM, e 1 paciente perdeu a RCgC após 5 meses de tê-la alcançado. O tempo médio de uso de IM dos pacientes classificados como respondedores foi de 45 meses (32-87), com manutenção de uma RCgC estável durante uma mediana de acompanhamento de 30 meses (24-79) a partir da obtenção desta.

Pt	Idade	Sexo	Classificação	Uso IM (meses)	Melhor Rta IM	ITK-2G	Uso do ITK-2G (meses)	Melhor Rta ITK-2G	Mutação
1	40	M	RCgC com 1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	50	1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	Não	NA	NA	Não
2	29	F	RCgC com 1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	42	1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	Não	NA	NA	Não
3	31	F	RCgC com 1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	56	1-0.1% BCR-ABL <sup>EI</sup>	Não	NA	NA	Não
4	49	M	RCgC com RMM	62	RMM	Não	NA	NA	Não
5	67	F	RCgC com RMM	48	RMM	Não	NA	NA	Não
6	51	F	RCgC com RMM	68	RMM	Não	NA	NA	Não
7	21	M	RCgC com RMC	32	RMC	Não	NA	NA	Não
8	41	F	RCgC com RMC	32	RMC	Não	NA	NA	Não
9	48	M	RCgC com RMC	77	RMC	Não	NA	NA	Não
10	39	M	RCgC com RMC	87	RMC	Não	NA	NA	Não
11	35	M	100% Ph+ aos 6 meses com EI>10%	15	RCgP	Sim	DND	DND	Não
12	43	M	100% Ph+ aos 6 meses com EI>10%	7	RHC	Sim	15	RCgP	Não
13	23	M	Perda da RCgC, nunca RMM	38	RCgC	Sim	6	RMM	Não
14	18	M	>35% Ph+ aos 12 meses com EI>10%	15	RCgM	Sim	20	RMM	G250E
15	28	F	>35% Ph+ aos 12 meses com EI>10%	10	RCgM	DND	DND	DND	Não
16	52	M	100% Ph+ aos 6 meses com EI>10%	6	RHC	Sim	6	RMM	Não
17	73	M	100% Ph+ aos 6 meses com EI>10%	63	RCgP	Sim	12	RCgP	M351T§
18	63	F	NA	41	RCgC	Sim	3	RHC	F486S
19	54	F	NA	9	RHC	Sim	9	RHC	F359I§
20	24	M	NA	39	RCgP	Sim	24	RHC	Y315I
21	25	M	NA	12	RCgP	Não	NA	NA	T315I

Pt: numero do paciente. IM: imatinibe. Rta: resposta. ITK-2G: inibidor tirosina quinase de segunda geração. M: masculino, F: feminino. RCgP: resposta citogenética parcial. RCgC: resposta citogenética completa. RCgM: resposta cito genética maior. RHC: resposta hematológica completa. RMM: resposta molecular maior. §: óbito. Ph: Philadelphia. DND: dado não disponível. NA: não aplicável.



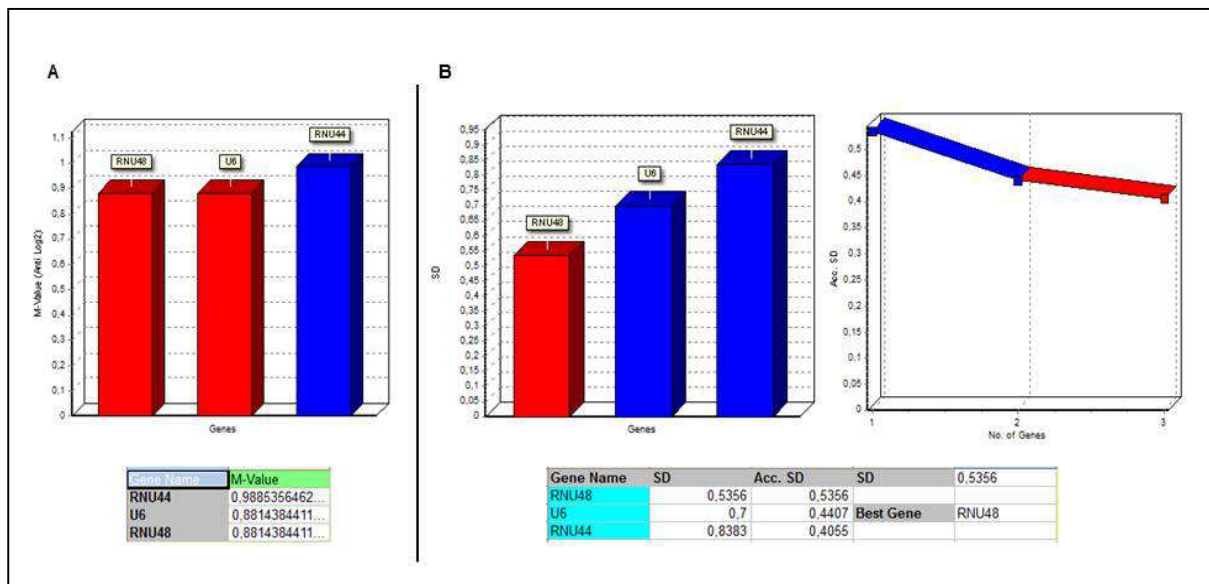
Todos os pacientes classificados como resistentes utilizaram ITK-2G após o tratamento com IM. Além das 17 amostras ao diagnóstico, 8 amostras de 4 pacientes resistentes (pts **12**, **13**, **15** e **16**) coletadas durante diferentes momentos do tratamento com ITKs foram também estudadas por *arrays* de TLDA (*vide seção 6.1.1.4*). Um *pool* de linfócitos de 5 doadores sadios foi utilizado como controle de expressão de miRNAs (calibrador). Adicionalmente, 4 pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL (pts **18**, **19**, **20** e **21**) foram incluídos para a análise de expressão por ensaios *singles* de RT-qPCR (*vide seção 6.1.2.1*).

#### 6.1.1.2 Escolha do controle de expressão endógeno

O primeiro passo para a análise de expressão dos miRNAs foi escolher o controle endógeno mais adequado para o nosso estudo. Os *arrays* de TLDA contêm 3 RNAs pequenos para serem utilizados como controles de expressão endógeno: RNU44, RNU48 e U6. Dois métodos estatísticos distintos foram utilizados para esta escolha: os algoritmos geNorm e o NormFinder. O algoritmo geNorm calcula e compara o valor M dos genes candidatos, assumindo que estes não são co-regulados, eliminando o maior. O valor M descreve a variação do gene comparado com todos os outros candidatos. O processo é repetido até que reste apenas um par de genes, que são os recomendados para a análise [VANDESOMPELE *et al.*, 2002]. O algoritmo NormFinder, na sua busca pelo melhor gene de referência, incorpora a informação da variação de cada gene em grupos de amostras, calculando a variação intra-grupo e a variação entre-grupos [ANDERSEN *et al.*, 2004].

As análises realizadas tanto com o geNorm quanto com o NormFinder mostraram que os três controles endógenos se comportaram de maneira satisfatória. Entre tanto, o RNU48 apresentou os melhores resultados: o geNorm calculou um valor  $M=0,8814$  e o NormFinder um valor de desvio standard de  $SD=0,49$  (Fig. 6.1). Assim, o RNU48 foi o endógeno

escolhido para normalização dos dados de expressão de miRNAs de LMC obtidos a partir das placas de TLDA e de ensaios simples de RT-qPCR (*vide seção 6.1.1.3*).



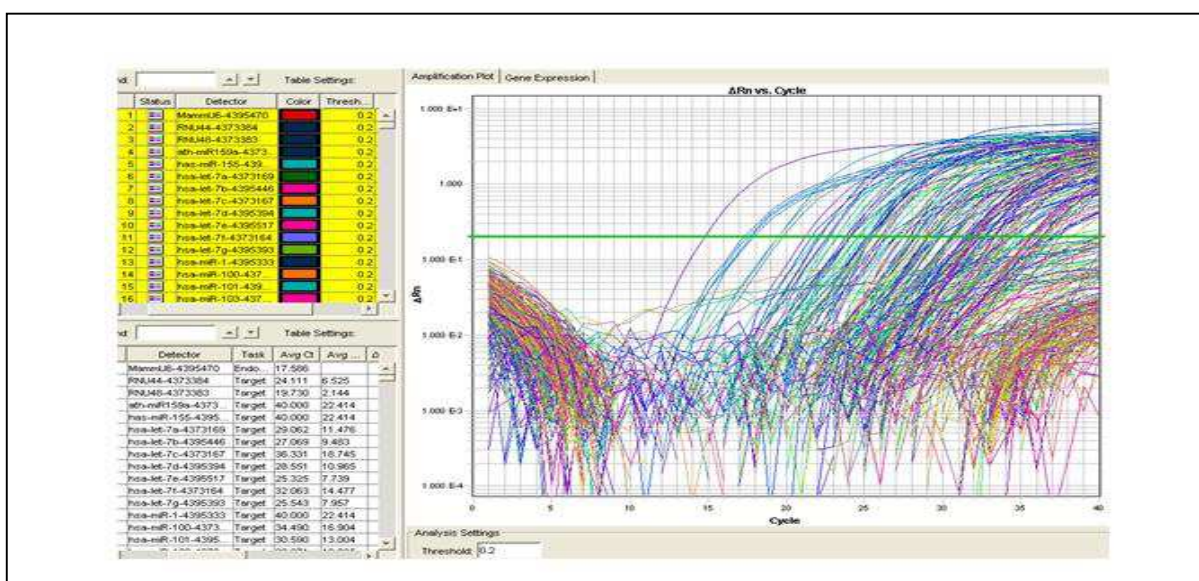
**Figura 6.1: Escolha do gene de referencia.** A: Os resultados da análise com o algoritmo geNorm indicaram que o melhor par de genes para serem utilizados como controle endógeno de expressão eram RNU48 e U6 (em vermelho). B: O algoritmo NormFinder mostrou que a melhor escolha estava representada pelo gene RNU48 (em vermelho), que apresentou um desvio standard menor. M-value: valor M; SD: desvio standard; Acc SD: desvio standard acumulado.

### 6.1.1.3 Expressão de miRNAs maduros: análise do seu papel como marcador preditivo

O RNA total foi obtido com sucesso em todas as amostras dos pacientes com LMC utilizadas para esta parte do estudo. De maneira geral, as concentrações de RNA obtidas variaram dentro de valores de 0.9-2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com uma média 1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os valores de Cq obtidos para o gene constitutivo em todas as amostras foram entre 18,5 e 22,3 (com média de 19,8) valores considerados como indicadores satisfatórios da qualidade do miR-cDNA obtido.

Os resultados obtidos através da utilização de *arrays* de TLDA mostraram que foi possível medir a expressão de 211 miRNAs maduros em todas as amostras estudadas. Valores de Cq  $\geq 38$  foram considerados além do limite de detecção da técnica, pelo que foram excluídos da análise. De uma forma geral, todas as amostras analisadas expressaram miRNAs característicos de células hematopoiéticas, como por exemplo, miR-142, miR-146, miR-150,

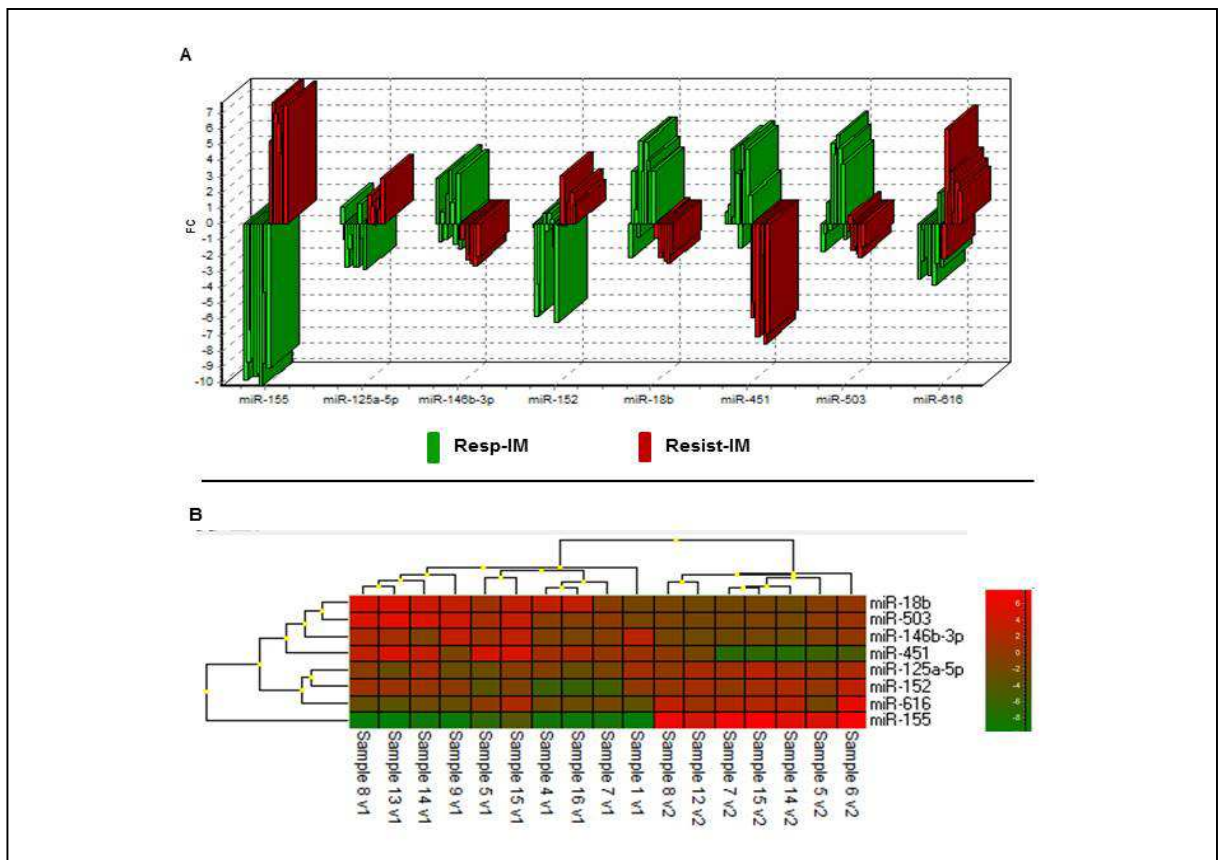
miR-155, miR-181, miR-222 e miR-223. Em contraste, o miR-105 (característico do epitélio), miR-10b (característico de baço e intestino), miR-137 (característico do sist. nervoso central) e miR-147 (característico epitélio do cólon), não foram encontrados expressos nas amostras estudadas. Um *plot* de amplificação típico observado em cada corrida de RT-qPCR se mostra na Fig. 6.2.



**Figura 6.2: Perfil de expressão de miRNAs maduros por placas de TLDA.** A figura mostra um gráfico típico de amplificação de expressão de miRNAs maduros analisados por placas de TLDA. O valor *threshold* foi setado em 0.2, como recomendado para placas TLDA. Na parte esquerda da figura aparecem alguns dos dados de medição fornecidos pelo aparelho ao finalizar a corrida.

No intuito de analisar uma possível correlação entre a expressão dos miRNAs ao diagnóstico e a obtenção da resposta ao IM, foi realizada uma análise supervisionada comparando a expressão de miRNAs em amostras ao diagnóstico entre os grupos de pacientes Resp-IM e Resist-IM. O perfil de expressão do *pool* de amostras de doadores foi utilizado como calibrador. Esta análise mostrou um grupo de 8 miRNAs diferencialmente expressos entre os dois grupos: miR-155, miR-18b, miR-616, miR-125a-5p, miR-503, miR-451, miR-146b-3p e miR-152 (Fig. 6.3). Para demonstrar se a utilização de apenas estes oito miRNAs poderia discriminar os dois grupos apropriadamente, foi realizada uma análise de *clusters* supervisionada baseada no método de *average-linkage* com correção Euclidiana.

Esta análise gerou um dendrograma onde os grupos Resp-IM e Resist-IM apareceram claramente separados, sugerindo que o perfil de expressão destes 8 miRNAs poderia ser utilizado como marcador precoce preditivo da resposta terapêutica de um paciente em uso de IM (Fig. 6.3). O valor médio de diferença entre cada grupo assim como o valor  $p$  calculado para cada miRNA, são apresentados na Tabela 6.2. Para manter um risco de erro tipo I de até 0,05, o valor de *cut-off* do  $p$  foi ajustado para 0,0058. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando foi analisada a diferença do perfil de expressão de miRNAs maduros no grupo dos Resp-IM em relação aos diferentes níveis de resposta molecular alcançada (1-0.1% BCR-ABL<sup>EI</sup>, RMM ou RMC) ( $p = >0,05$ ). Assim, o perfil de miRNAs ao diagnóstico foi correlacionado apenas para o tipo de resposta citogenética alcançada pelos pacientes em uso de IM.



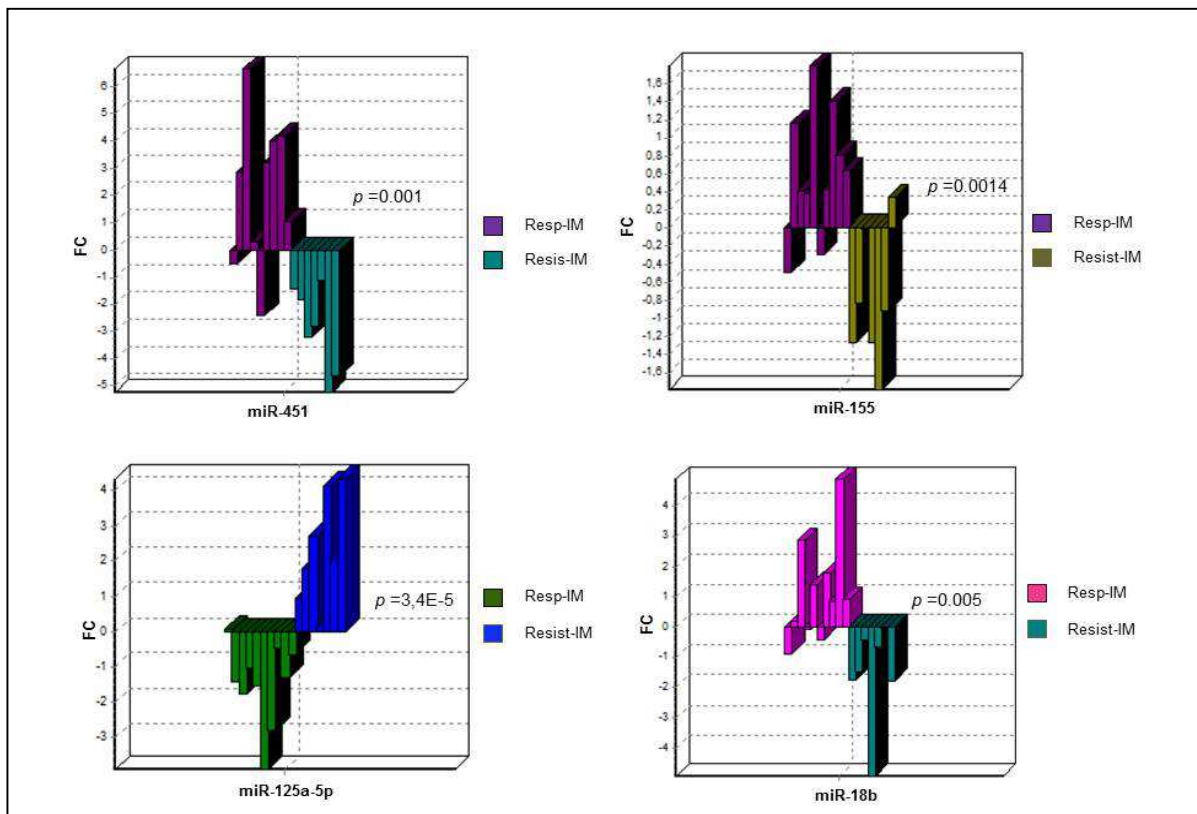
**Figura 6.3:** Análise supervisionada de expressão de miRNAs entre Resp-IM e Resist-IM. A: gráfico de expressão dos miR-155, miR-125a-5p, miR-146b-3p, miR-152, miR-18b, miR-451, miR-503 e miR-616. Resp-IM: grupo com RCgC; Resist-IM: grupo sem RCgC. B: dendrograma demonstrando a separação entre os quando utilizada a expressão dos 8 miRNAs. FC: *fold change*. Os valores de FC apresentados são em relação aos níveis apresentados pelo pool de doadores saudáveis, utilizado como calibrador.

**Tabela 6.2: miRNAs diferencialmente expressos em amostras diagnóstico de Resp-IM e Resist-IM**

miRNA	Teste K-S	Diferença média entre grupos (FC)	<i>p</i>	<i>p<sub>c</sub></i> (Benjamini-Hochberg)
miR-155	Sim	-14,955	1E-8	1E-8
miR-18b	Sim	4,312	0,000162	9,6E-5
miR-616	Sim	-4,472	0,000200	0,002474
miR-125a-5p	Sim	-2,347	0,001650	0,001668
miR-503	Sim	3,515	0,003847	0,001668
miR-451	Sim	5,723	0,00002	0,0001
miR-146b-3p	Sim	2,518	0,005336	0,002285
miR-152	Sim	-3,491	0,007155	0,002474

Teste K-S: teste de normalidade Kolomogorov-Smirnov; FC: fold change; *P<sub>c</sub>*: valor *p* corrigido. O valor *p* foi obtido através do teste-*t* de 2caudas.

Para confirmação das diferenças observadas entre os grupos através dos dados gerados com os *arrays*, foram realizados, nas mesmas amostras, ensaios *singles* de expressão de cada miRNA de interesse por RT-qPCR. A padronização do protocolo para estes ensaios foi realizada com o miRNA-222, escolhido por encontrar-se altamente expresso em todas as amostras de LMC analisadas. O gene utilizado como controle endógeno para estes ensaios também foi o RNU-48. Foram confirmadas as diferenças de expressão entre os grupos Resp-IM e Resist-IM ao diagnóstico para os miR-155, miR-451, miR-18b, miR-125a-5p (*p*= 0,0014; 0,001; 0,005 e 3,4E-5, respectivamente, teste-*t* de 2caudas) (Fig. 6.4). Entretanto, os ensaios *singles* não reproduziram as diferenças observadas nos *arrays* para os miR-146b-3p, miR-152, miR-616 e miR-503 (*p*= 0,08; 0,88; 0,89 e 0,9, respectivamente, teste-*t* de 2caudas). Os valores de *fold change* (FC) dos miRNAs com diferenças significativas confirmadas mediante os ensaios de expressão *singles* estão detalhados na Tabela 6.3.



**Figura 6.4: Confirmação por ensaios singles das diferenças observadas.** Os gráficos mostram a expressão diferenciada dos miR-451, miR-155, miR-125a-5p e miR-18b em amostras ao diagnóstico nos pacientes classificados como respondedores e resistentes. Estes dados foram confirmados a traves de ensaios simples de RT-qPCR. IM: imatinib; Resp-IM: respondedores ao IM; Resist-IM: resistentes ao IM. FC: *fold change*.

**Tabela 6.3: Valores de FC dos miRNAs -451, -155, -125a-5p e -18b nas 17 amostras ao diagnóstico**

Resp-IM (Pts)	miR-451	miR-155	miR-125a-5p	miR-18b	Resist-IM (Pts)	miR-451	miR-155	miR-125a-5p	miR-18b
1	-0,505	-0,490	0,045	-0,899	11	-1,430	-1,260	0,965	-1,739
2	2,879	1,159	-1,414	0,215	12	-1,850	-0,825	1,815	-1,469
3	6,644	0,409	-1,774	2,865	13	-3,195	-0,010	2,715	-0,414
4	0,304	0,394	-1,064	-0,074	14	-1,120	-1,265	0,155	-4,934
5	0,201	1,794	-1,534	1,405	15	-2,805	-1,785	4,155	-0,669
6	-2,425	-0,290	-3,924	-0,414	16	-5,220	-0,915	2,065	-0,029
7	3,229	0,429	-2,814	1,795	17	-4,640	0,334	4,345	-1,769
8	4,004	1,404	-0,464	0,850					
9	4,189	0,809	-1,324	4,895					
10	1,029	0,644	-0,634	0,915					
<b>Valor Médio (FC)</b>	1,95	0,62	-1,49	1,15	<b>Valor Médio (FC)</b>	-2,89	-0,81	2,31	-1,57

IM: Imatinib; FC: *fold change*; Pts: pacientes; Resp-IM: grupo respondedor ao IM; Resist-IM: grupo resistente ao IM. Os valores de FC foram obtidos dos ensaios *singles* de expressão nas amostras diagnóstico. O valor de FC indicado é relativo aos doadores sadios.

#### 6.1.1.4 Análise da variação do perfil de miRNAs durante o tratamento da LMC com ITKs

No intuito de identificar padrões de variação de expressão de miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs em relação à resposta, foram estudadas amostras sequenciais coletadas em distintos momentos do tratamento de 4 dos pacientes classificados

como Resist-IM (Tabela 6.4). Estes pacientes foram escolhidos por apresentarem diferentes padrões de respostas aos ITKs, o que permitiu realizar uma análise comparativa em relação à expressão dos miRNAs em diferentes situações de resposta.

As amostras selecionadas incluíram, além das 4 amostras ao diagnóstico (100% Ph+) de cada caso, 3 amostras em estágio de não resposta ao IM (100% Ph+ e >10% BCR-ABL<sup>EI</sup>) (pts **12**, **15** e **16**), 1 amostra em RCgC em uso IM (0% Ph+ com 1% BCR-ABL<sup>EI</sup>) (pt **13**), 1 amostra com perda da RCg com IM (90% Ph+ e >10% BCR-ABL<sup>EI</sup>) (pt **13**), 2 amostras em RCgC com ITK-2G (0% Ph+ com 0,6-1,2% BCR-ABL<sup>EI</sup>) (pts **12** e **16**) e 1 amostra em estágio de não resposta ao ITK-2G (100% Ph+ e >10% BCR-ABL<sup>EI</sup>) (pt **12**). Para esta análise, as 12 amostras foram agrupadas em 3 categorias: diagnóstico (n=4), resposta (n=3) e recaída e/ou não-resposta (n=5). Os resultados desta análise foram expressos em relação ao *pool* de doadores sadios.

**Tabela 6.4: Pacientes e amostras selecionadas para análise da variação da expressão de miRNAs durante o tratamento da LMC com ITKs**

Pacientes analisados com amostras sequenciais						
Paciente	Dg	R - IM	Não - R - IM	Recaída com IM	R - Dasa	Não - R - Dasa
<b>12</b>	X		X			X
<b>13</b>	X	X		X	X	
<b>15</b>	X		X			
<b>16</b>	X		X		X	

IM: imatinibe; Dg: diagnóstico; R - IM: resposta com IM; Não - R - IM: não resposta com IM; R - Dasa: resposta com dasatinibe; Não - R - Dasa: não resposta com dasatinibe.

Como uma primeira abordagem de análise dos dados gerados com os *arrays*, foi investigado o padrão de expressão apresentado pelos miRNAs que apresentaram correlação confirmada com a obtenção de RCgC: miR-155, miR-18b, miR-125a-5p e miR-451. O miR-451 foi o único que apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparada a variação entre amostras diagnóstico vs. resposta ( $p=0,005$ ; teste-*t* de 2 caudas, com valor de *cut-off* do *p* ajustado para 0,012) (Fig. 6.5). Este resultado demonstra uma

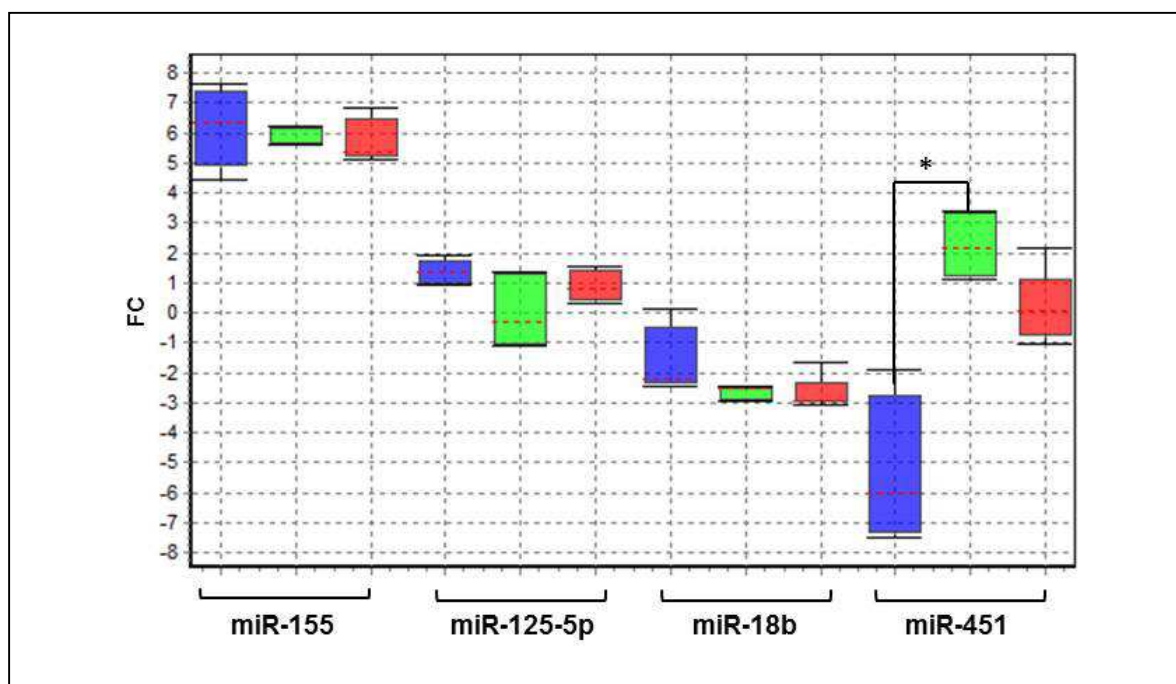


associação entre um aumento dos níveis de expressão do miR-451 e a obtenção de uma RCgC durante o tratamento com ITKs. A análise do padrão de expressão dos outros miRNAs não foi significativa ( $p = >0,012$ ) (diagnóstico vs. resposta: miR-125a-5p  $p = 0,09$ ; miR-18b  $p = 0,26$  e miR-155  $p = 0,66$ ; resposta vs. recaída e/ou não-resposta: miR-451  $p = 0,05$ ; miR-125a-5p  $p = 0,21$ ; miR-18b  $p = 0,82$  e miR-155  $p = 0,91$ ).

Quando esta análise foi realizada com os dados de expressão dos 384 miRNAs obtidos do *array* de TLDA, foi observado que um grupo de 29 miRNAs apresentavam um padrão de variação de expressão similar ao identificado para o miR-451. Este padrão de expressão se mostrou inversamente relacionado com a carga tumoral, ou seja, baixa expressão dos miRNAs ao diagnóstico, um aumento da expressão na obtenção de uma RCgC e uma diminuição do nível de expressão em uma situação de recaída e/ou não resposta com terapia de ITKs. Embora a maioria das comparações não tenham resultado em diferenças estatisticamente significativas, muitas das associações mostraram valores bem próximos (*borderline*). O valor de *cut-off* do  $p$  foi ajustado para 0,0017, a fim de manter um risco de erro tipo I de até 0,05.

O comportamento cinético similar apresentado por estes 29 miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs indicam que sua expressão pode ser co-regulada e que alguns destes miRNAs poderiam estar relacionados com mecanismos de resposta e/ou resistência aos ITKs (Fig. 6.6). Os valores de significância (valor  $p$ ) da comparação entre os grupos, diagnóstico vs. resposta, e resposta vs. recaída e/ou não-resposta, para estes 29 miRNAs são apresentados com detalhe na Tabela 6.5.



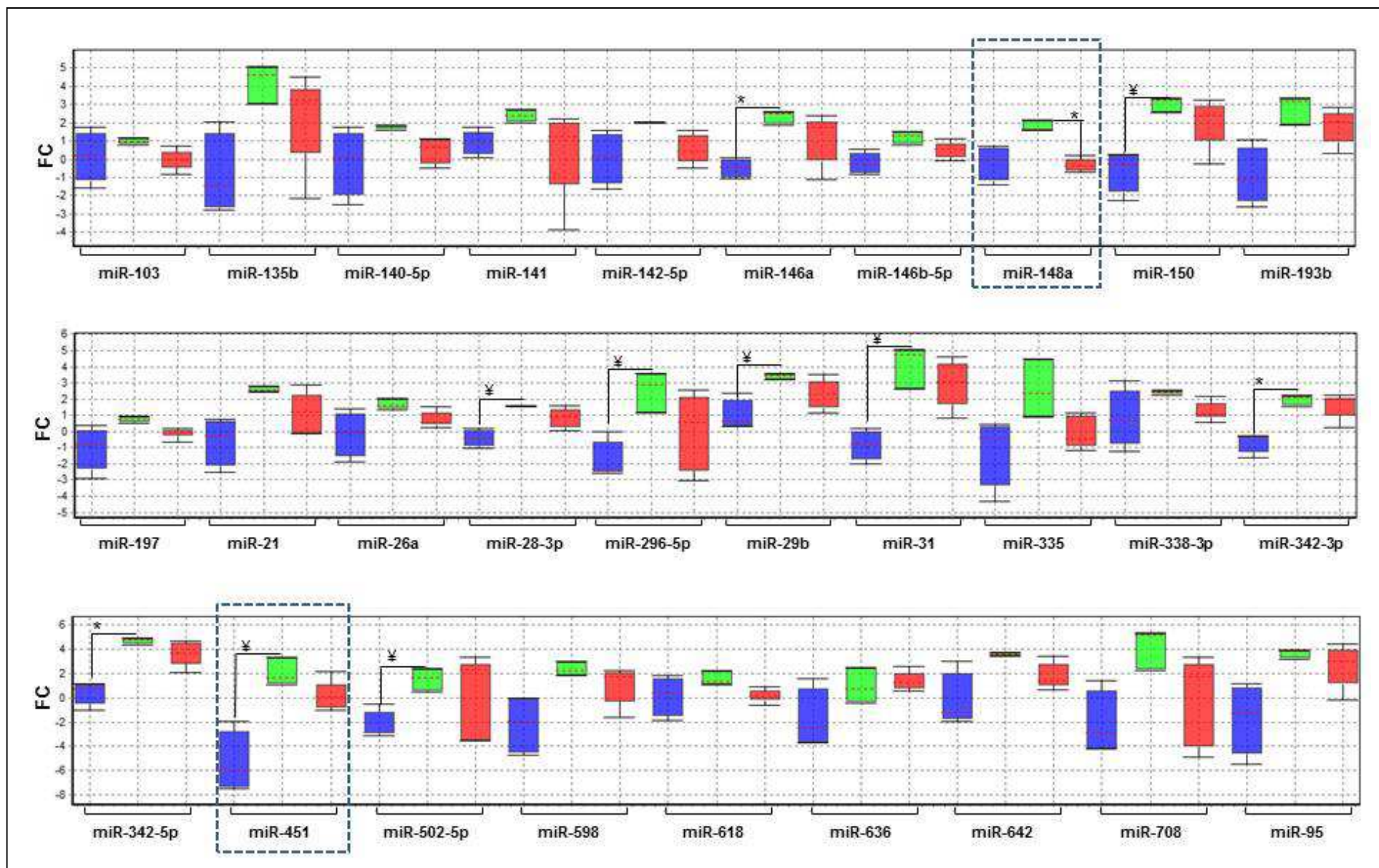


**Figura 6.5: Padrão de expressão dos miR-155, -125a-5p, -18b e -451 durante o tratamento com ITKs.** A figura mostra a variação da expressão durante o tratamento da LMC dos 4 miRNAs que apresentaram um valor preditivo para obtenção da resposta citogenética ótima com tratamento com IM. As amostras estudadas pertencem a 4 pacientes classificados como Resist-IM. Azul: amostras ao diagnóstico; verde: amostras em estágio resposta; vermelho: amostras em estágio de recaída e/ou não resposta.\*: diferença estatisticamente significativa, valor  $p=0,005$  (valor  $p$  ajustado para 0,012 para assegurar um erro de tipo I de até 0,05). FC: *fold change*.

**Tabela 6.5: Valores de significância dos 29 miRNAs com padrão de expressão similar durante o curso da LMC em tratamento com ITKs**

miRNA	Dg vs. Resp Valor $p$	Resp vs. NãoResp/Recaída Valor $p$	miRNA	Dg vs. Resp Valor $p$	Resp vs. NãoResp/Recaída Valor $p$
miR-103	0,3585	0,0283	miR-296-5p	0,0058*	0,1454
miR-135b	0,0156	0,2715	miR-31	0,0022*	0,2835
miR-140-5p	0,1559	0,0314	miR-335	0,0603	0,0361
miR-141	0,0197	0,2583	miR-338-3p	0,1945	0,0191
miR-142-5p	0,0683	0,0244	miR-342-3p	<b>0,0015</b>	0,5134
miR-146a	<b>0,0006</b>	0,2102	miR-342-5p	<b>0,0008</b>	0,1756
miR-146b-	0,0168	0,0660	miR-451	0,0059*	0,0744
miR-148a	0,0265	<b>0,0001</b>	miR-502-5p	0,0068*	0,5484
miR-150	0,0038*	0,2619	miR-598	0,0280	0,2326
miR-193b	0,0140	0,1869	miR-618	0,2420	0,0186
miR-197	0,0853	0,0101	miR-642	0,0336	0,0332
miR-21	0,0194	0,1035	miR-636	0,1582	0,5982
miR-26a	0,0867	0,0311	miR-708	0,0159	0,1062
miR-28-3p	0,0022*	0,0968	miR-95	0,0275	0,3751
miR-29b	0,0078*	0,0900			

O valor de *cut-off* do  $p$  ajustado para 0,0017. Os valores estatisticamente significativos são sinalizados em negrito. \*: valores considerados *borderline*.



**Figura 6.6: Padrão de expressão similar apresentado por 29 miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs.** Azul: amostras ao diagnóstico; verde: amostras em estagio resposta; vermelho: amostras em estagio de recaída e/ou não resposta. \*: diferença estatisticamente significativa; ¥: diferencia estatística considerada *borderline* (valor *p* ajustado para 0,0017 para assegurar um erro de tipo I de até 0,05). FC: *fold change*. Os miRNAs sinalizados com caixas azuis foram escolhidos para serem estudados mais detalhadamente (*vide seção 7.2.1 e 7.1.3*).

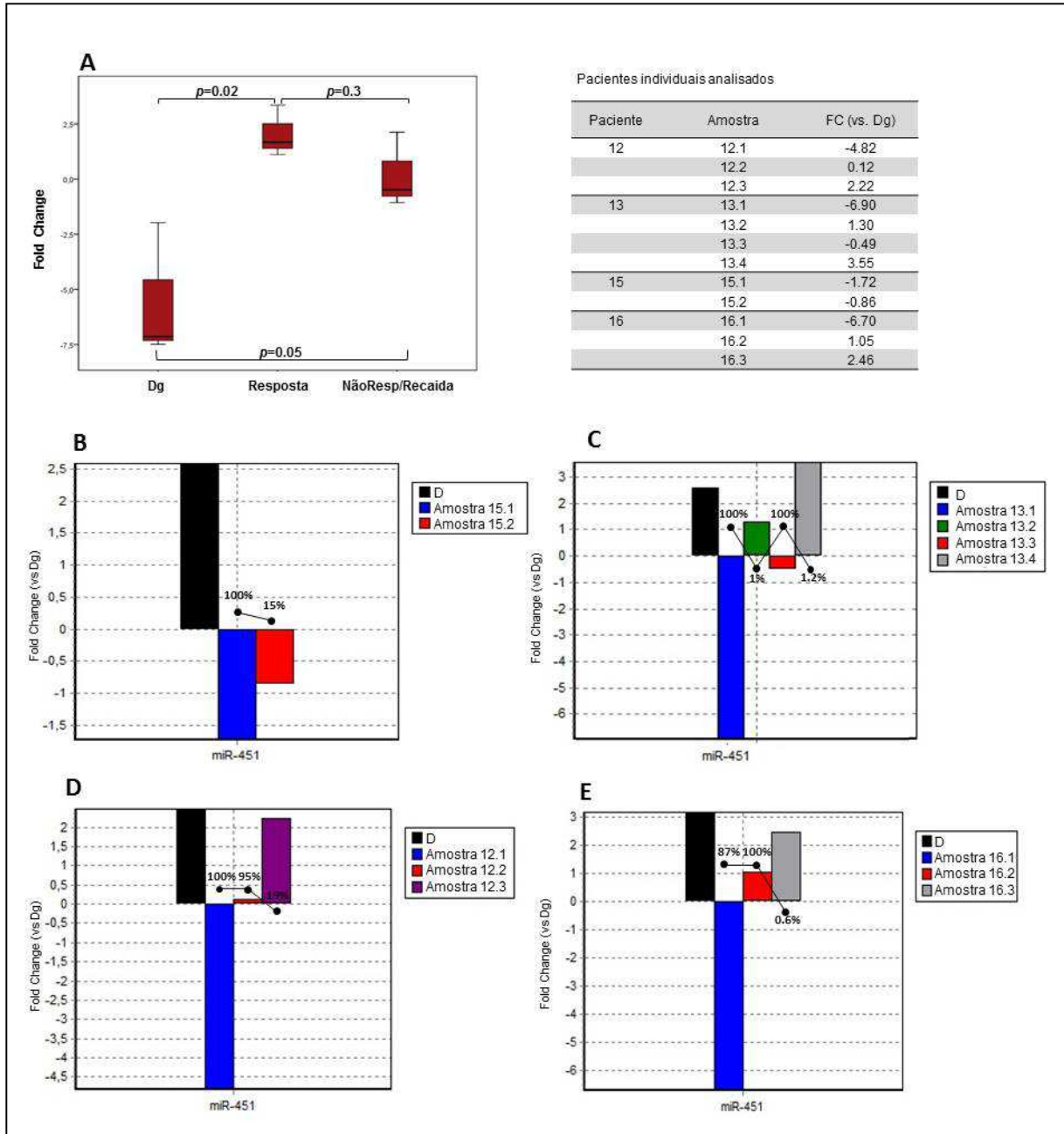
## 6.1.2 Análise do padrão de expressão do miR-451

### 6.1.2.1 Análise do padrão de expressão do miR-451 em pacientes individuais

Com base nos resultados gerados a partir dos *arrays* de TLDA em relação ao valor preditivo da resposta ao IM dos níveis de expressão do miR-451 ao diagnóstico e à variação do perfil de expressão deste miRNA observado durante o tratamento com ITKs, decidiu-se investigar com amplitude o papel do miR-451 na LMC. Para isto, a expressão do miR-451 foi analisada mediante ensaios de expressão *singles* por RT-qPCR em amostras do diagnóstico e do acompanhamento de pacientes resistentes ao IM e não portadores de mutações no DQ com padrões de resposta diferentes aos ITKs (pts **12**, **13**, **15** e **16**) [SCHOLL *et al.*, 2011]. O padrão de correlação inversa observado nos *arrays* foi confirmado nos grupos de amostras ao diagnóstico, resposta e recaída/não-resposta. A relação inversa entre os níveis de expressão do miR-451 e a quantidade de células Ph<sup>+</sup> é evidente nos grupos de diagnóstico e de resposta, entretanto, é menos clara no grupo de amostras de recaída/não-resposta, onde a expressão do miRNA-451 e a carga tumoral estão elevadas ( $p=0,02$ ;  $p=0,05$  e  $p=0,3$ ; teste-*t* de 2 caudas) (Fig. 6.7A).

Para discriminar melhor a relação entre a expressão do miR-451 e a carga tumoral, a expressão do miRNA foi analisada em cada paciente separadamente para obtenção de uma cinética de expressão individual ao longo da terapia. Para isto, o nível de expressão do miRNA nas amostras coletadas em momentos de resposta diferentes durante o tratamento com ITKs foi comparado com o nível de expressão apresentado na amostra diagnóstico do próprio paciente (Fig. 6.7 B-E). Nos casos **13** e **15**, a relação entre a expressão do miR-451 e os níveis de BCR-ABL%<sup>EI</sup> foi sempre inversa (Fig. 6.7 B-C). Entretanto, os casos **12** e **16** mostraram um aumento da expressão do miR-451 apesar da presença de um elevado número de células Ph<sup>+</sup> e/ou de transcritos BCR-ABL. Isto foi observado em ambos os pacientes, em

amostras coletadas durante a terapia com IM e também em situação de resposta diferente ao dasatinibe (Fig. 6.7 D-E).



**Figura 6.7: Expressão do miRNA-451 em amostras seriadas de LMC em tratamento com ITKs.** A: Gráfico Box e Whisker representando a expressão do miR-451 durante o curso do tratamento de da LMC de 4 pacientes. Dg: amostra diagnóstico; Resposta: amostras com 0%Ph+; NãoResposta/Recaída: amostras com 100% Ph+. B-E: Perfil de expressão do miR-451 durante o tratamento de cada paciente individual. Barras: Pretas: amostra representando o valor relativo de doadores saudios; Azul: amostra diagnóstico; Verde: amostra em resposta ao IM (0%Ph+ com 1% BCR-ABL<sup>El</sup>); Vermelho: amostra em não resposta ou da recaída (100%Ph+ e >10% BCR-ABL<sup>El</sup>); Cinza: amostras em resposta ao dasatinibe (0%Ph+ com 0.6-1.2% BCR-ABL<sup>El</sup>); Roxo: amostra em não resposta ao dasatinibe (100%Ph+ e >10% BCR-ABL<sup>El</sup>). B: Pt 15, C: Pt 13, D: Pt 12, E: Pt 16. Os pontos pretos indicam a medição dos níveis de BCR-ABL%<sup>l</sup> medidos por RT-qPCR. A tabela mostra a diferença de expressão de cada paciente individualmente, os resultados estão Eapresentados como expressão do *fold change* (FC) de cada paciente em relação ao próprio diagnóstico de acordo ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . D: doadores.

Em concordância com nossas observações, fortes evidências sugerem a existência de um *loop* de regulação recíproco entre o miR-451 e o BCR-ABL [LOPOTOVÁ *et al.*, 2011]. Apesar das limitações devido ao pequeno tamanho da amostra, estes resultados sugerem que outras moléculas mediadoras podem estar envolvidas no funcionamento do *loop* de regulação recíproco entre o miR-451 e o BCR-ABL, já que o padrão inverso não é observado em todas as situações (casos **12** e **16** discutidos anteriormente).

#### 6.1.2.2 Análise da expressão do miR-451 em pacientes portadores de mutações no DQ

Em dois casos do grupo de amostras classificadas como Resist-IM incluídos nos *arrays* de TLDA foram identificadas mutações no DQ do gene BCR-ABL. Nesses casos (pts **14** e **17**), as mutações no DQ foram detectadas ao momento da resistência, não estando presentes nas amostras do diagnóstico de ambos os pacientes. Na análise da expressão do miR-451 nas amostras do diagnóstico destes 2 casos, foi observado que os níveis do miR-451 pareciam estar relacionados com o grau de resistência ao IM conferido pelo tipo de mutação, segundo dados de ensaios *in vitro*.

O pt **17** apresentou a mutação M351T, estabelecida como sensível ao IM por ensaios *in vitro* [O'HARE *et al.*, 2007]. Diferente do esperado pela presença desta mutação, este paciente, em uso de IM, evoluiu muito rapidamente para a FA e faleceu, não respondendo tampouco à terapia com ITK-2G. Vale destacar que, neste caso, os níveis de expressão do miR-451 apresentados ao diagnóstico foram muito baixos em comparação com os doadores sadios (valor de *fold change* -4,640). Em contraste, a mutação G250E, identificada no caso número **14**, é descrita em ensaios *in vitro* como capaz de conferir resistência intermediária ao IM. Após mudar para uma terapia com ITK-2G, o paciente alcançou uma RCgC em 5 meses de tratamento. Curiosamente, o nível de expressão do miR-451 deste paciente ao diagnóstico foi muito próximo dos níveis apresentados pelos doadores sadios (valor de *fold*

*change* -1,120). O paciente continua atualmente mantendo níveis baixos de expressão do miR-451, ainda em RCgC com ITK-2G. Estes 2 casos ilustram uma evolução clínica diferente do esperado em relação às mutações apresentadas, podendo ser "revisitados" no contexto de uma expressão diferenciada de um miRNA particular.

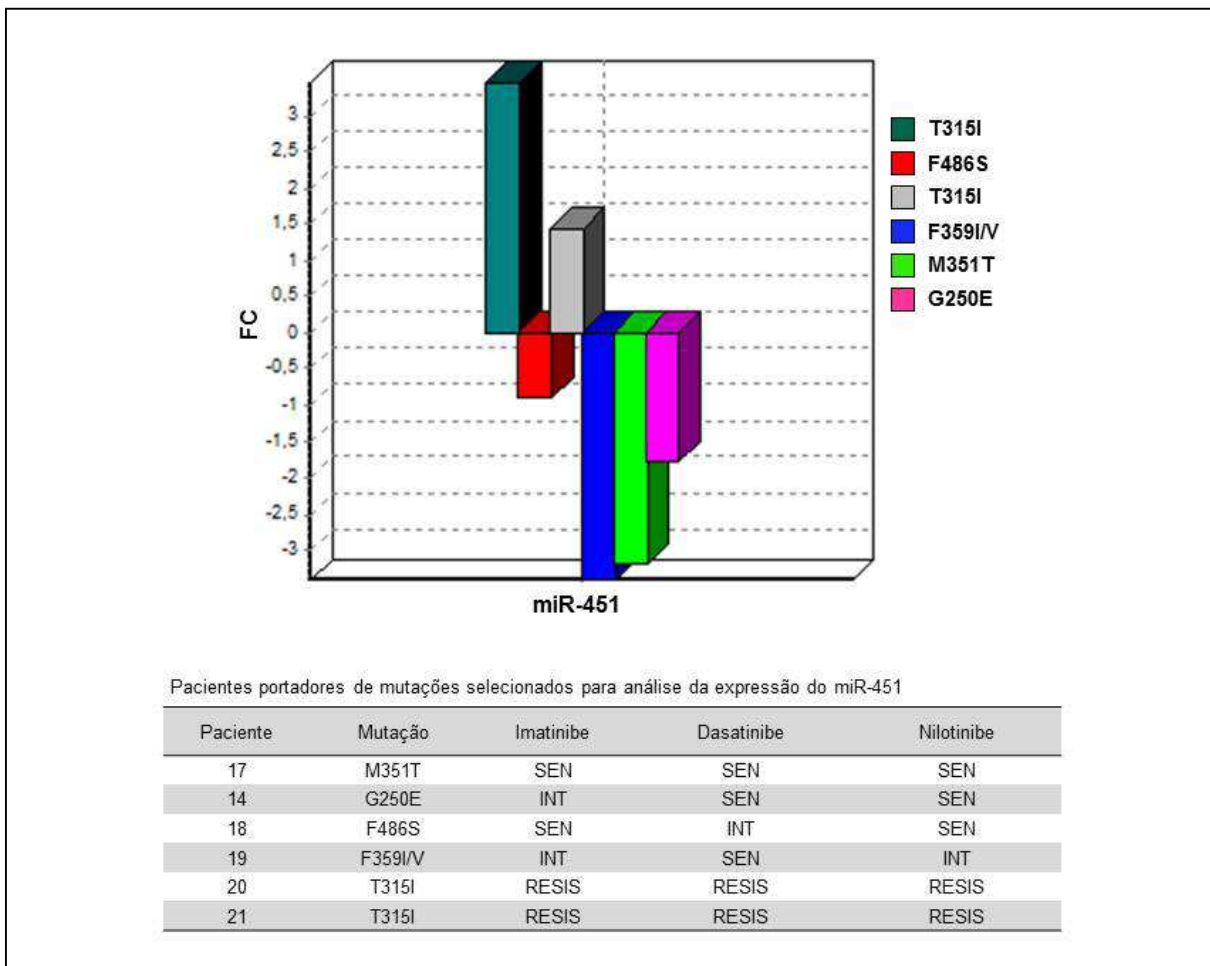
Para melhor avaliação da possível relação entre a expressão do miR-451, o tipo de mutação e a resposta alcançada com os ITKs, o grupo de casos Resist-IM que apresentaram mutações ao longo do tratamento foi ampliado. Assim, a expressão do miR-451 foi analisada em amostras do diagnóstico e de acompanhamento em um grupo de pacientes portadores de mutações no DQ (Fig. 6.8).

Como uma primeira abordagem, foi analisado o nível de expressão do miR-451 nas amostras do diagnóstico de 6 casos resistentes ao IM e portadores de mutação (Fig. 6.8). Esta análise mostrou que os dois pacientes com a mutação T315I, apresentaram níveis altos de expressão do miR-451 ao diagnóstico em relação aos doadores (pts **20** e **21**). Os casos com mutações descritas como sensíveis ou com sensibilidade intermediária aos diferentes ITKs em estudos *in vitro*, apresentaram níveis baixos de expressão do miRNA ao diagnóstico. Interessantemente, os 2 casos com menor nível de expressão do miR-451, foram pacientes que não responderam ao tratamento com ITKs e vieram a falecer independentemente do grau de resistência conferido pela mutação (casos **17** e **19**, portadores das mutações M351T e F359I/V, respectivamente) (Fig. 6.8).

A análise da expressão do miR-451 nas amostras coletadas durante o acompanhamento destes pacientes permitiu construir uma cinética individual de expressão do miRNA ao longo do tratamento, utilizando a própria amostra do diagnóstico como calibrador (Tabela 6.6). A relação entre a expressão do miR-451 durante o tratamento com ITKs e a resposta obtida pelos pacientes portadores de mutações variou em cada caso, sem apresentar



um padrão definido, entretanto, de uma forma geral, níveis baixos de expressão do miR-451 (valores de FC <1) estiveram relacionados com uma resposta deficiente à terapia com ITKs (Tabela 6.6). Estas observações reforçam a ideia de que os níveis do miR-451 ao diagnóstico poderiam ser um fator preditivo da resposta ao IM, e que o nível de expressão ao longo do tratamento poderia estar relacionado com a resposta global à terapia, como um parâmetro complementar à presença de mutações no DQ. Além disso, evidenciam ainda mais a natureza multifatorial do fenômeno de resistência aos ITKs, colocando os miRNAs, em particular o miR-451, como um possível parâmetro associado ao fenótipo resistente.



**Figura 6.8: Nível de expressão do miR-451 em amostras diagnósticas de pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL.** Os resultados estão apresentados como expressão do *fold change* de cada paciente em relação aos níveis apresentados por doadores saudáveis de acordo ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Barras: verde escuro: paciente 21 (FC: 1,4); vermelho: paciente 18 (FC: -0,9), cinza: paciente 20 (FC: 3,4); azul: paciente 19 (FC: -3,4); verde claro: paciente 17 (FC: -3,1); rosa: paciente 14 (FC: -1,8). FC: *fold change*. SEN: sensível. INT: sensibilidade intermediária. RESIS: resistente.

**Tabela 6.6: Expressão do miR-451 durante o acompanhamento de pacientes portadores de mutações**

Pt	Mutação	Amostra	FC	Pt	Mutação	Amostra	FC
20	T315I	D	1,818	18	F486S	D	-0,815
		20.1	0,833			18.1	0,199
		20.2	-2,651			18.2	0,879
21	T351I	D	-0,159	19	F359I/V	18.3	-0,264
		21.1	-0,959			D	-1,741
		21.2	-1,364			19.1	1,698
		21.3	2,926			19.2	0,043
17	M351T	D	-1,866	14	G250E	D	0,488
		17.1	3,408			14.1	-1,096
		17.2	-1,541			14.2	0,608

D: diagnóstico. FC: *fold change*, expresso em relação ao nível do diagnóstico de cada paciente.

### 6.1.3 Análise do padrão de expressão do miR-148a em pacientes individuais

Como descrito anteriormente, os dados obtidos a partir dos *arrays* de TLDA de amostras ao diagnóstico, não indicaram um papel preditivo do miR-148a para obtenção de uma RCgC com IM. Entretanto, os resultados gerados em relação à variação do perfil de expressão dos miRNAs durante o tratamento com ITKs (pts **12**, **13**, **15** e **16**), mostraram uma expressão diferenciada do miR-148a entre os grupos de amostras, com uma diferença muito significativa entre o grupo de resposta em comparação ao grupo de recaída/não-resposta: diagnóstico vs. resposta  $p= 0,02$ ; e resposta vs. recaída/não-resposta  $p= 0,0001$  (teste- $t$  de 2 caudas, com valor de *cut-off* do  $p$  ajustado para 0,017) (Fig. 6.6).

O padrão de variação do miR-148a durante o tratamento, foi similar ao descrito para o miR-451, ou seja, inversamente relacionado com a quantidade de células Ph+. Entretanto, a variação entre a resposta e a recaída/não-resposta foi ainda maior para o miR-148a do que a encontrada para o miR-451. Os resultados observados na análise dos dados dos *arrays* foram confirmados através de ensaios *singles* de RT-qPCR: diagnóstico vs. resposta  $p= 0,006$ , e resposta vs. recaída/não resposta e  $p= 0,0005$  (teste- $t$  de 2 caudas) (Fig. 6.9).

Para discriminar melhor a relação entre a expressão do miR-148a e a carga tumoral, a expressão deste miRNA foi analisada separadamente para obtenção de uma cinética de expressão para cada paciente ao longo do tratamento com ITKs, comparando o nível de

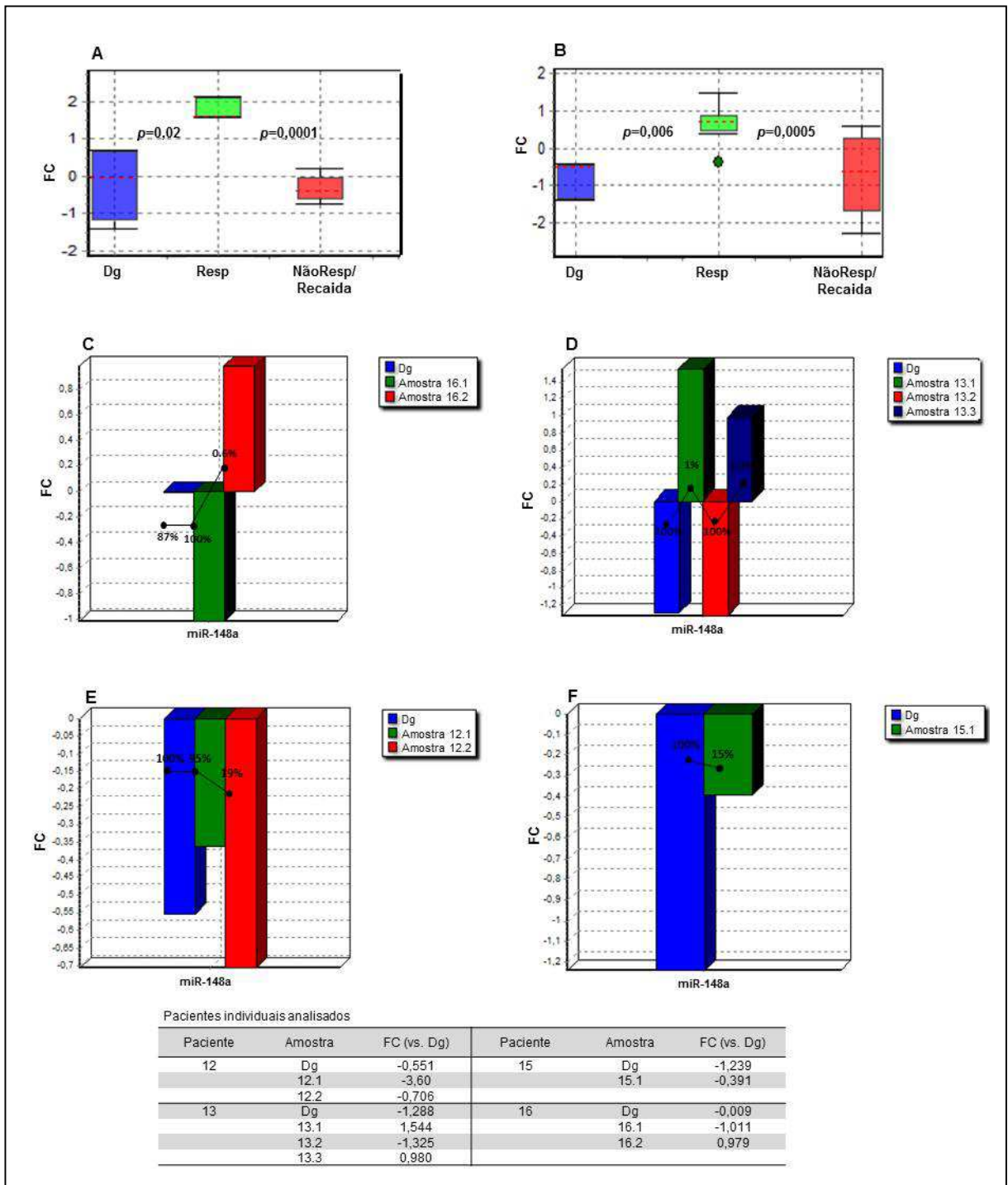


expressão do miRNA nas amostras do acompanhamento com o nível de expressão apresentado na amostra diagnóstica do próprio paciente (Fig. 6.9 C-F).

Esta análise mostrou que no caso do miR-148a, em contraste com o observado no miR-451, a relação entre a expressão do miRNA e os níveis de BCR-ABL%<sup>EI</sup> foi sempre inversa, sendo observado em todos os casos e amostras, independentemente do ITK utilizado. Estes resultados sugerem que este miRNA poderia ter um envolvimento central com os mecanismos de resistência e/ou resposta operantes no tratamento da LMC com ITKs.

Diferentemente do observado para o miR-451, não foi identificada nenhuma relação entre os níveis de expressão ao diagnóstico do miR-148a e tipo de resposta obtido com tratamento com inibidores em pacientes portadores de mutações no DQ do gene BCR-ABL que conferem distinto grau de resistência aos ITKs. Da mesma maneira, a construção de uma cinética individual de expressão do miRNA ao longo do tratamento com ITKs não apresentou um padrão definido em relação à carga tumoral e o momento de aparecimento da mutação.

Estas observações mostram que a correlação inversa observada entre a expressão do miR-148a e a carga tumoral é bem clara em situações de baixa ou alta carga tumoral (100% Ph+ ou 0% Ph+), entretanto, o padrão inverso não é distinguível quando os pacientes apresentam níveis intermediários de respostas, como os observados nos pacientes portadores de mutações aqui estudados. Assim, para definir como se comporta a variação da expressão do miRNA dentro da nuance de carga tumoral que os pacientes apresentam no tempo desde o início da terapia com ITKs até a obtenção de uma RCgC, é necessário realizar estudos de expressão em amostras seriadas com pouco tempo de intervalo.



**Figura 6.9: Expressão do miRNA-148a em amostras seriadas de LMC em tratamento com ITKs.** A e B: Gráfico Box e Whisker representando a expressão do miR-148 durante o curso do tratamento de da LMC de 4 pacientes. Dg: amostra diagnóstico; Resp: amostras com 0%Ph+; NãoResp/Recaída: amostras com 100% Ph+; dados obtidos mediante o array de TLDA (A) e confirmação mediante ensaios simples de RT-qPCR. C-F: Perfil de expressão do miR-148a durante o tratamento de cada paciente individual. C: Paciente 16, D: Paciente 13, E: Paciente 12, F: Paciente 15. Os pontos pretos indicam a medição dos níveis de BCR-ABL%<sup>EI</sup> medidos por RT-qPCR. A tabela mostra a diferença de expressão de cada paciente individualmente. Os resultados estão apresentados como expressão do *fold change* de cada paciente em relação ao próprio diagnóstico de acordo ao método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 6.1.4 Análise *in silico* para determinação de possíveis alvos do miR-148a

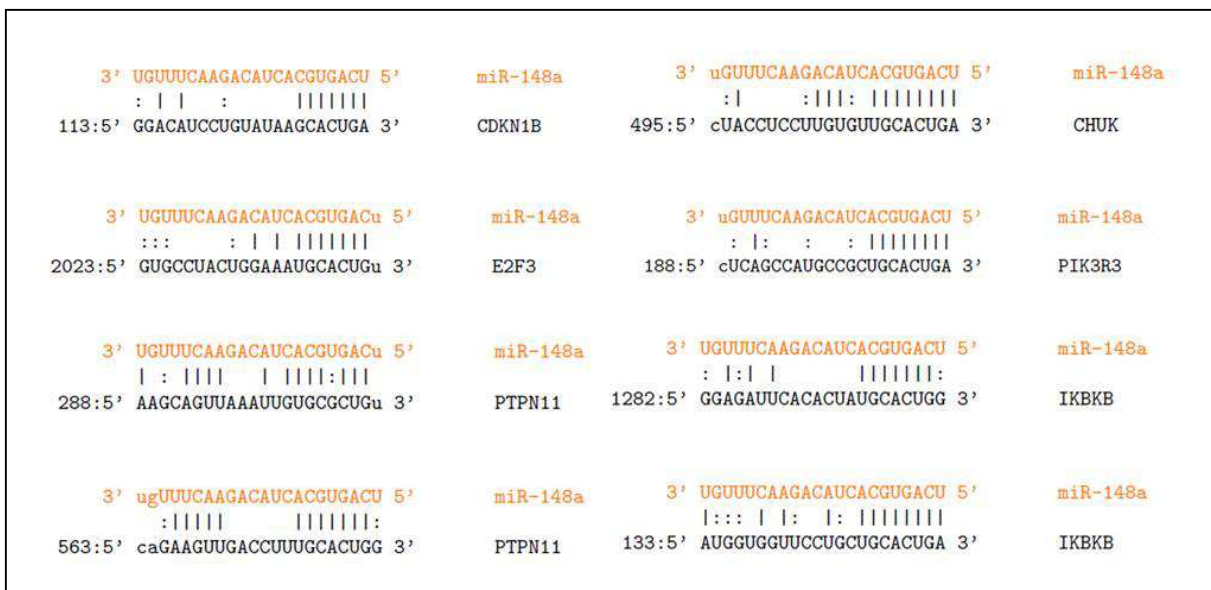
Os resultados obtidos nas análises do perfil de expressão do miR-148a durante o curso da LMC e sua invariável relação inversa com a quantidade de células BCR-ABL+, tanto em pacientes em tratamento com IM e/ou com ITK-2G, indicam que este miRNA poderia ter um papel central na regulação de genes relacionados com o aparecimento de resistência na LMC. Assim, foi realizada uma busca com ferramentas *in silico* através de diversas bases de dados, para análise dos possíveis alvos do miR-148a que poderiam estar relacionados com os mecanismos de resistência aos ITKs. Utilizando os algoritmos das bases de dados PicTar, PITA, RNA22, Targetscan e Miranda, foram identificados um total de 525 genes possivelmente regulados pelo miR-148a. Primeiramente, os 525 genes foram agrupados por pertencerem ou não a diferentes vias de sinalização celular e/ou pela descrição prévia de seu envolvimento com diversos tipos de neoplasias. Desta maneira, foram selecionados um total de 311 genes segundo sua relação com processos chaves do funcionamento celular ou por pertencer a diferentes vias de transdução de sinais relacionadas com diferentes tipos de câncer.

Dentre estes 311 genes, 6 genes foram encontrados com relação direta com a LMC: E2F3, PIK3R3, CHUK, IKBKB, PTPN11 e CDKN1B ( $p=0,002$ , FDR=0,02). O papel central destas proteínas na regulação da proliferação celular e sobrevivência da célula é bastante conhecido. A função de cada uma destas proteínas é apresentada na Tabela 6.7. A regulação da expressão gênica mediada por miRNAs implica o reconhecimento de uma porção da sequência do RNAm por parte do miRNA, chamada de sequência semente ou sequência *seed*. As sequências de reconhecimento podem encontrar-se em qualquer lugar do gene, entretanto, de uma forma geral, as sequências semente localizadas na porção 3'UTR dos genes alvos são descritas como as de maior potencial regulador. Assim, as sequências sementes para o miR-

148a nos 6 genes anteriormente descritos foram analisadas (Fig. 6.10). A identificação das sequências *seed* foi baseada na predição das mesmas pelos algoritmos das 5 bases de dados utilizadas, sendo que aquelas preditas por 4 algoritmos ou menos foram descartadas. Todas as sequências preditas escolhidas localizaram-se na porção gênica 3'UTR, apresentando altas forças de ligação (em todos os casos <-10). Para os genes CDKN1B, CHUK, E2F3 e PIK3R3 foram identificadas uma sequência *seed* para cada gene, entretanto, nos genes PTPN11 e IKBKB foram identificadas duas sequências *seed* por gene.

**Tabela 6.7: Função dos genes preditos como alvos do miR-148a com importância na LMC**

Gene	Outros Nomes	Função
<b>E2F3</b>	E2F-3, KIAA0075	Membro da família de fatores de transcrição E2F. Papel crucial no controle do ciclo celular e da ação de supressores de tumor. Se liga especificamente à pRB de uma forma dependente do ciclo celular.
<b>PIK3R3</b>	P55, p55-GAMM	Unidade reguladora das proteínas quinases da Classe I PI 3. As proteínas PI3-K classe I ativam a proteína quinase B (AKT) na via PI3K/AKT/mTOR.
<b>CHUK</b>	IKK- $\alpha$ , IKK1, IKKA	Membro da família de proteínas serina / treonina quinase. IKK- $\alpha$ também tem sido relatada de regular a proteína do ciclo celular ciclina D1 em forma independente de NF- $\kappa$ B.
<b>IKBKB</b>	IKK- $\beta$ , IKK2, IKKB	IKK- $\beta$ serve como uma subunidade de proteína quinase I $\kappa$ B. Sua atividade produz ativação da via NF- $\kappa$ B. A IKK- $\beta$ ativa fosforila a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , que se liga a NF- $\kappa$ B para inibir a sua função.
<b>PTPN11</b>	PTP-1D, SHP-2	Proteína tirosina-fosfatase, conhecidas por regular uma variedade de processos, incluindo o crescimento celular, diferenciação, e transformação oncogênica.
<b>CDKN1B</b>	CDKN1B, P27KIP1	Proteína que pertence à família de quinases Cip / Kip de inibidores dependente de ciclina (CDK). Importante proteína inibidora do ciclo celular.



**Figura 6.10: Sequências semente preditas para reconhecimento do miR-148a.** Na figura se apresentam as sequências de reconhecimento do miR-148a com os alvos preditos mediante ferramentas *in silico*: CDKN1B, CHUK, E2F3, PIK3R3, PTPN11 e IKBKB. Todas as energias de ligação preditas para o heteroduplex foram maior a -10, valor considerado mínimo para uma ligação forte: CDKN1B -24,2; CHUK -21,7; E2F3 -23,3; PIK3R3 -25,3; PTPN11 -27,0 e -25,9 e IKBKB -28,5 e -25,2.

## 6.1.5 Ensaios funcionais para o miR-148a

### 6.1.5.1 Ensaio de transfecção com precursores pre-miR

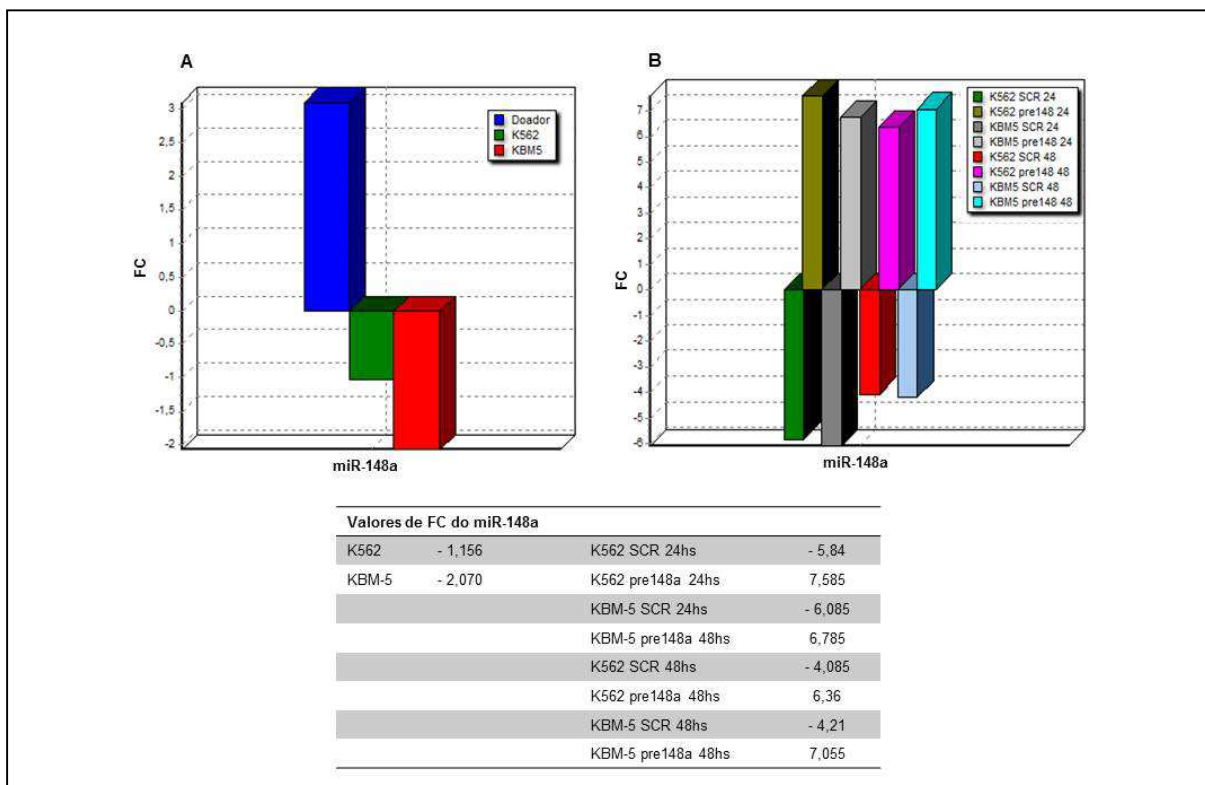
No intuito de elucidar o papel do miR-148a na LMC, foram realizados ensaios de transfecção com precursores pre-miR em células em cultura. Para isto, foram utilizadas as linhagens celulares K562 e KBM-5, derivadas de pacientes com LMC. Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Terapia Experimental do MD Anderson Câncer Center, Houston, Texas, em colaboração com o Dr George Calin.

Primeiramente, foi determinado o nível de expressão do miR-148a nas duas linhagens estudadas. Alíquotas das linhagens em cultura sem nenhum tratamento foram utilizadas para extração de RNA total, posterior síntese do miR-cDNA-148a e medição da expressão por ensaios *singles* de RT-qPCR. Ambas as linhagens apresentaram níveis muito baixos de expressão do miR-148a em comparação com os níveis apresentados pelo *pool* de amostras de doadores saudáveis (valores de FC -1,156 e -2,070 para as linhagens K562 e KBM-5, respectivamente) (Fig. 6.11A e tabela da figura). Este resultado reforça o conceito da relação inversa entre expressão do miR-148a e a carga tumoral, indicando que a regulação da expressão deste miRNA poderia ocupar um papel central dentro do mecanismo patogênico da LMC.

Os ensaios de transfecção com precursores pre-miR foram realizados no intuito de avaliar o efeito da sobre-expressão do miR-148a em linhagens celulares de LMC que expressam níveis muito baixos deste miRNA. Os ensaios tiveram duração de 96 hs, tempo após o qual as culturas transfectadas com o pre-miR-148a ou com o controle negativo (*scramble*) foram sacrificadas. Após 24 e 48hs de tratamento, alíquotas de ambas as linhagens

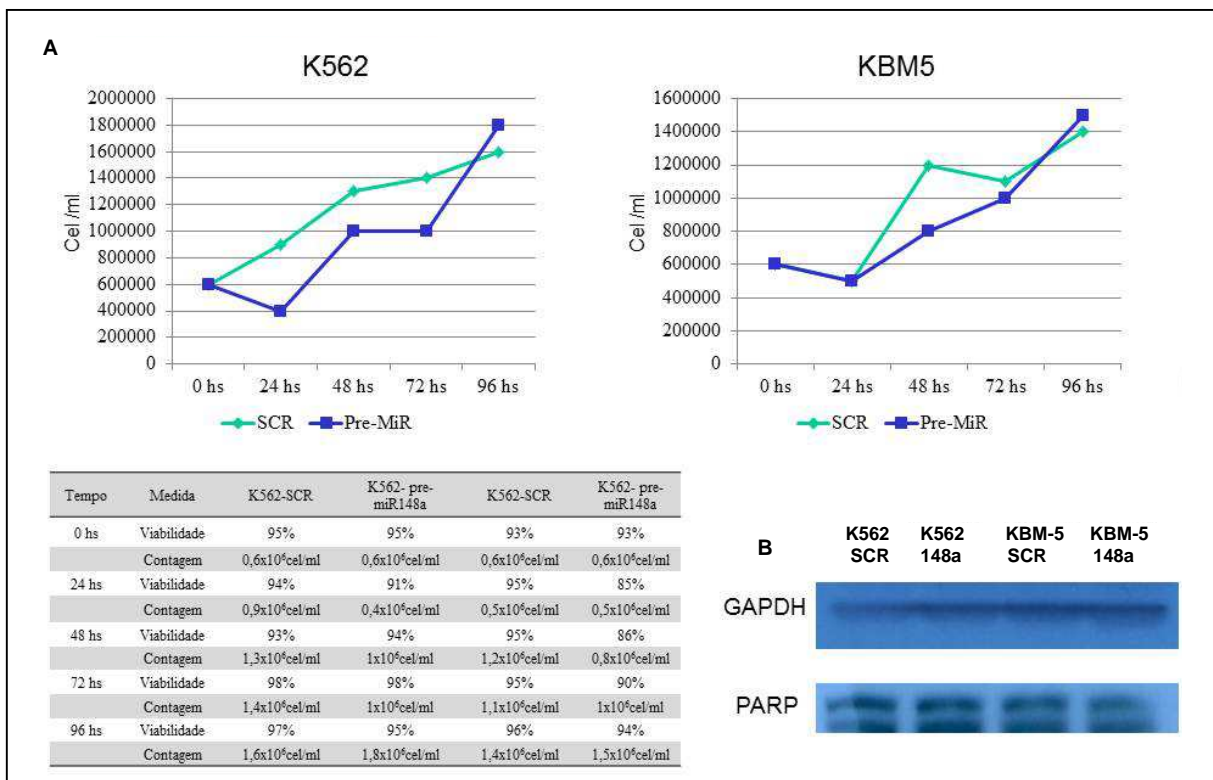
celulares foram separadas para obtenção de RNA total, para aferição dos níveis de expressão do miR-148a maduro após a transfecção.

De maneira geral, as concentrações de RNA obtidas variaram dentro da faixa de 2.4-3.7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com uma média de 2.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O valor de Cq obtido para o gene constitutivo (RNU48) em todas as amostras foi de 19,6 a 21,2, valores estes considerados como indicadores satisfatórios da qualidade do miR-cDNA obtido. A presença do miR-148a maduro foi confirmada através de ensaios de *singles* RT-qPCR nas culturas de células transfectadas com o pre-miR-148a após 24 e 48 hs da transfecção (valor médio do FC 6,94). Em contraste, nas culturas de células transfectadas com o controle negativo (*scramble*) o nível de expressão do miR-148a foi muito baixo (valor médio do FC -5,05) (Fig. 6.11B e tabela da figura).



**Figura 6.11: Ensaios de transfecção com o pre-miR-148a.** **A:** avaliação da expressão do miR-148a nas linhagens celulares K562 e KBM-5 sem nenhum tratamento. O gráfico mostra que em ambas as linhagens a expressão do miR-148a é muito baixa em comparação com os níveis apresentados pelos doadores saudáveis. **B:** o gráfico mostra uma alta expressão do miR-148a nas culturas das linhagens K562 e KBM-5 transfectadas com o pre-miR-148a, em contraste com a baixa expressão nas culturas transfectadas com o *scramble*. FC: *fold change*. SCR: *scramble*. Pre-148: pre-miR-148a.

O número de células e a viabilidade celular foram avaliadas diariamente. Os valores obtidos após 24, 48, 72 e 96 hs de cultura são apresentados na tabela da Fig. 6.12. Os resultados obtidos durante o transcurso do ensaio nas culturas controle (transfectadas com o precursor *scramble*) e nas culturas transfectadas com o pre-miR-148a mostraram que a viabilidade celular foi similar entre os tratamentos para cada linhagem, apresentando valores sempre >80%. Da mesma maneira, a taxa de crescimento de ambas as linhagens com os distintos tratamentos também foi similar (Fig. 6.12). Estes ensaios iniciais de transfecção indicaram que a presença do miR-148a maduro nas células não apresentou um efeito em relação à viabilidade e a proliferação das linhagens K562 e KBM-5. Além disso, um *western-blot* realizado com extrato de proteínas coletadas após 96hs da transfecção com precursores, também não identificou diferenças na apoptose entre os diferentes tratamentos em ambas as linhagens (Fig. 6.12).



**Figura 6.12: Avaliação do número e viabilidade celular durante o ensaio de transfecção com o pre-miR-148a. A:** Os gráficos mostram a curva de crescimento celular das linhagens celulares K562 e KBM-5 durante os ensaios de transfecção com o pré-miR-148a e o controle *scramble*. **B:** Gel de western-blot para avaliação de apoptose. O resultado não mostrou diferenças entre as células transfectadas com o pré-miR-148a e o *scramble*. SCR: *scramble*. Pre-148: pre-miR-148a. PARP: anticorpo para detecção de atividade apoptótica.

#### 6.1.5.2 Ensaio com o agente demetilante 5-aza-2'deoxyctidina (5-Aza)

Diversas evidências sugerem que a expressão do miR-148a é regulada por metilação do DNA em tecidos tumorais. Em um trabalho publicado por LUJAMBIO e colaboradores foi mostrado que a expressão do miR-148a é regulada através de hipermetilação de uma ilha CpG próxima ao gene do miRNA, no cromossomo 7p15.2, em diversos tipos de tumores sólidos [LUJAMBIO *et al.*, 2008]. No intuito de confirmar se na LMC a expressão do miR-148a é também regulada por metilação do DNA, foram realizados ensaios com o agente demetilante 5-Aza nas linhagens K562 e KBM-5.

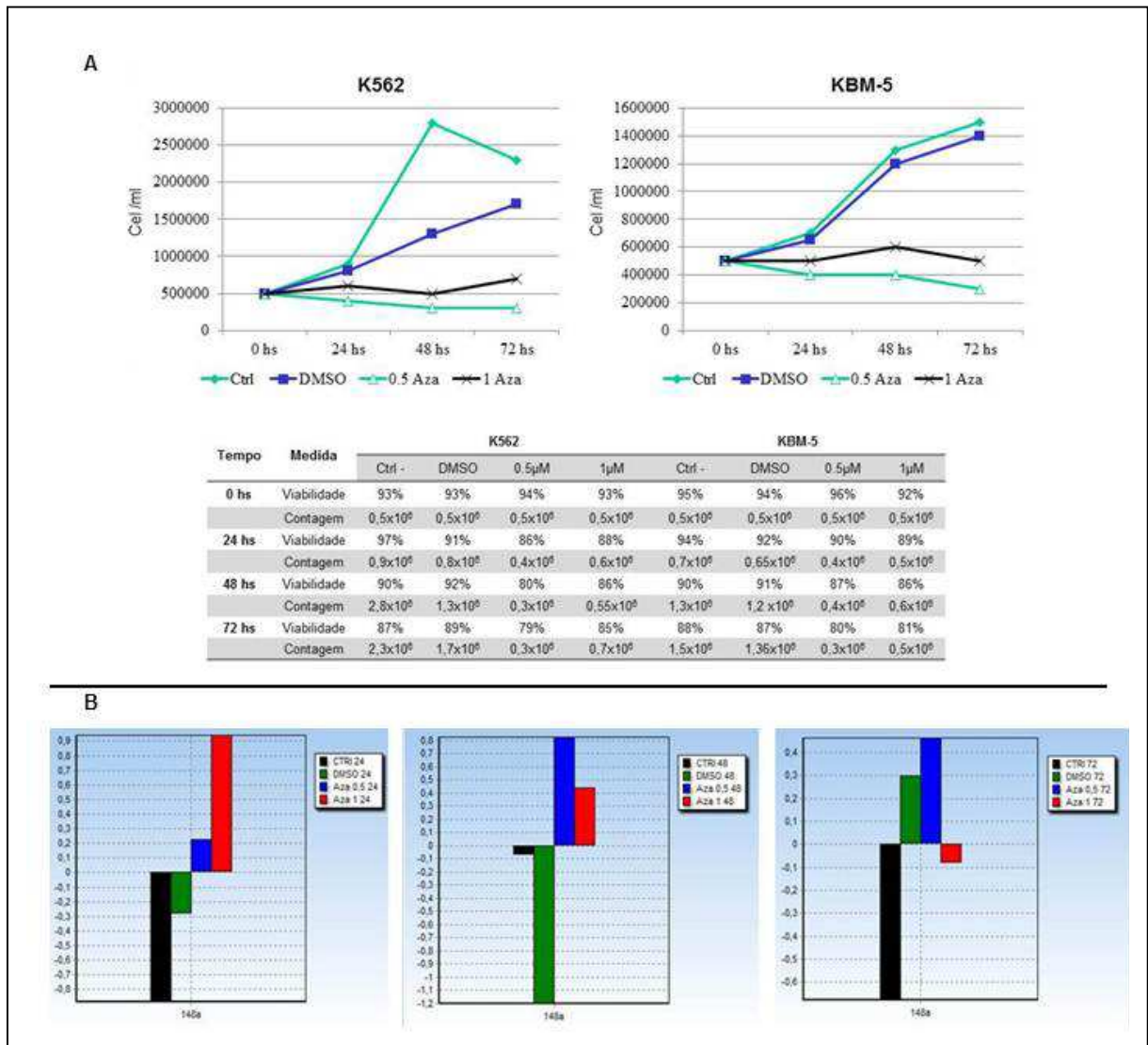
Para isto, alíquotas contendo  $0.5 \times 10^6$  células/mL de cada linhagem foram incubadas por 72 hs com o agente 5-Aza. No ensaio, as células foram incubadas com duas concentrações diferentes de 5-Aza, 0,5uM e 1uM. Estas concentrações foram escolhidas por terem sido previamente descritas como as mais apropriadas para utilização em ensaios com 5-Aza para avaliação de expressão de alvos nas linhagens estudadas [YOUSSEF *et al.*, 2004]. Neste ensaio, foram preparadas também 2 culturas de células com  $0.5 \times 10^6$  células/mL de cada linhagem para serem utilizadas como controles negativos da ação do 5-Aza, uma contendo a solução salina PBS e outra contendo DMSO, utilizado como veículo do agente demetilante.

Os resultados relativos à viabilidade e quantidade de células no decorrer do tratamento de todas as culturas são apresentados na tabela da Fig. 6.13. Os resultados mostram que na presença do 5-Aza, as células cresceram em uma taxa muito menor quando comparadas aos controles (Fig. 6.13A). A viabilidade celular também foi menor nas células tratadas com o agente demetilante, entretanto a viabilidade nunca foi < 80%.

Após 24hs, 48hs e 72hs de cultura, uma alíquota representativa de cada tratamento foi separada para extração de RNA total e síntese do miR-cDNA-148a. Os resultados de RT-



qPCR mostraram que efetivamente na presença do 5-Aza, houve um aumento de expressão do miR-148a (Fig. 6.13B). Estes dados proporcionam uma evidência indireta de que também na LMC a expressão deste miRNA é regulada por metilação do DNA.



**Figura 6.13: Ensaios de demetilação com o agente 5-Aza. A:** Os gráficos mostram a curva de crescimento celular das linhagens celulares K562 e KBM-5 durante os ensaios de demetilação. **B:** avaliação da expressão do miR-148a na linhagem K562 durante o tratamento com o agente 5-Aza após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Os gráficos mostram que nas culturas com o agente demetilante houve um aumento da expressão do miR-148a. Valores de FC após 24hs: controle (CTRL): -0,8; DMSO: -0,27; Aza 0,5µM: 0,22; Aza 1µM: 0,94. Valores de FC após 48hs: controle (CTRL): -0,06; DMSO: -1,2; Aza 0,5µM: 0,82; Aza 1µM: 0,44. Valores de FC após 72hs: controle (CTRL): -0,6; DMSO: 0,29; Aza 0,5µM: 0,46; Aza 1µM: -0,08.

## 6.2 DISCUSSÃO

Durante os últimos anos, tem ficado cada vez mais evidente que o estudo dos perfis de expressão de miRNAs e o entendimento da regulação da sua expressão são peças chave dentro do quebra-cabeça dos processos subjacentes ao câncer e aos mecanismos de resposta à diferentes terapias. Nos dias de hoje, diversas metodologias bem estabelecidas, como *microarrays*, *northern-blot*, RT-qPCR ou hibridação *in situ*, são amplamente utilizadas para o estudo dos miRNAs. Entretanto, o estudo destes RNAs não codificantes constitui um desafio *per se*, já que seu pequeno tamanho (19-25 nt) e a grande semelhança de sequência com seus RNAm alvos, dificultam sua detecção de forma acurada. Estas características têm constituído importantes obstáculos técnicos, levando à necessidade de adaptar e/ou desenvolver novas metodologias para seu estudo, colocando assim a escolha da plataforma a ser utilizada para cada pesquisa em particular e dos métodos de análise de dados a serem aplicados, como uma questão central para obtenção de resultados consistentes.

A escolha da metodologia a ser utilizada para o estudo do perfil de miRNAs na LMC constituiu um ponto importante de discussão neste projeto de doutorado. A literatura mostra, através da experiência obtida dos estudos de perfis de expressão total ou GEP (do inglês *Gene Expression Profile*) e mais recentemente, com os dados obtidos através dos *arrays* para estudo de perfis de metilação do DNA, que a utilização de plataformas distintas, ou mesmo a aplicação de diferentes algoritmos de análise de dados, influenciam consideravelmente o resultado final [YAUK & BERND, 2007; SUN *et al.*, 2011].

As variações de resultados encontrados com a utilização de diferentes plataformas podem ser atribuídas a diferentes fontes, incluindo a seleção e preparo da amostra, hibridização e intensidade do sinal gerado, entre outros. No entanto, a normalização dos dados é um passo essencial para reduzir os erros e converter os dados brutos em resultados válidos.

De uma forma geral, nos estudos de expressão genica realizados por microarrays, os métodos de normalização partem das premissas de que o total de transcritos é abundante e que a expressão da maioria dos genes avaliados é constante. Entretanto, os microarrays construídos para o estudo dos miRNAs são geralmente de baixa densidade, já que o número total de miRNAs conhecidos é relativamente pequeno (~1000). Assim, os métodos de normalização baseados nas características mencionadas não são perfeitamente aplicáveis aos miRNAs, isso resulta em que atualmente grandes esforços sejam dedicados a desenhar algoritmos específicos para normalização de dados de expressão de miRNAs obtidos com estas metodologias.

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) tem sido amplamente utilizado para estudos de expressão genica, sendo considerado por muitos como o padrão-ouro para validação de resultados obtidos através de *microarrays*, e como método de escolha para o estudo de miRNAs maduros [SCHMITTGEN *et al.*, 2008]. A tecnologia TaqMan®, altamente especifica e sensível, foi adaptada para pesquisa de miRNAs mediante a criação de uma estrutura de *stem-loop*, podendo ser utilizada atualmente para realização de ensaios *singles* de qRT-PCR ou através de matrizes de baixa densidade, como placas de TLDA (do inglês *TaqMan Low Density Array*), consideradas como uma plataforma de *medium-throughput*, já que permitem a avaliação simultânea de até 384 miRNAs [CHEN *et al.*, 2005].

A utilização das placas de TLDA para o estudo de miRNAs tem sido validada através da comparação com outras metodologias, mostrando uma alta reprodutibilidade. Trabalhos comparando varias plataformas mostraram que os controles endógenos incluídos nas placas de TLDA se apresentam como os mais estáveis, com alto desempenho e valores pequenos de desvio standard, fatores chave quando se trabalha com análise de expressão relativa [WANG *et al.*, 2011b]. As análises para escolha do melhor endógeno realizadas neste trabalho

confirmam estas observações. Os três controles endógenos avaliados (RNU44, RNU48 e U6) apresentaram pouca variação, mostrando grande estabilidade (valores M de 0,998 e 0,881 obtidos pelo algoritmo geNorm e desvios standards entre 0,535-0,838 segundo o algoritmo NormFinder).

Por utilizar a tecnologia de PCR, ou seja, da amplificação de fragmentos, esta metodologia não apresenta o problema do *background* de sinal, que tem que ser calculado e extraído, por exemplo, quando utilizadas as plataformas de *microarrays*. Entretanto, a utilização de placas de TLDA ainda é considerada de alto custo e com capacidade limitada de avaliação de alvos. Além disso, após a obtenção de resultados gerados mediante as placas de TLDA, ainda é necessário uma validação dos resultados mediante ensaios de expressão *singles* por RT-qPCR, isso porque as placas de TLDA não incluem replicatas técnicas. Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que, apesar da padronização da técnica, apenas o 60% das associações de significância identificadas com os *arrays* de TLDA foram confirmadas por ensaios *singles* de RT-qPCR (4/8 miRNAs com valor preditivo ao diagnóstico, miR-155, -451, 18b e 125a-5p; e 2/2 diferenças de expressão ao longo do tratamento com ITKs, miR-451 e -148a).

Além das considerações técnicas a respeito da escolha da plataforma para a realização do estudo, a escolha do calibrador mais adequado e o algoritmo de tratamento dos dados para avaliar a expressão de miRNAs mediante *arrays* de RT-qPCR também representou um grande desafio, já que ainda não foram definidos parâmetros específicos para a análise de dados gerados através destas plataformas.

A escolha do melhor calibrador para ser utilizado para aplicação do método do CT comparativo é um problema constante que se enfrenta quando se realizam estudos de expressão relativa. Para estudos de expressão gênica por RT-qPCR, por exemplo, a literatura

mostra que a escolha do calibrador utilizado é variável, sendo utilizadas linhagens celulares com alta e/ou baixa expressão do alvo estudado, tecido normal (que depende do tipo de tumor estudado) ou a utilização da mediana de expressão do alvo calculada de um dos grupos de pacientes estudados [LOSSOS *et al.*, 2001; ALENCAR *et al.*, 2011].

No caso dos estudos de expressão de miRNAs na LMC, a literatura, ainda que não muito extensa, mostra que as estratégias mais utilizadas são a comparação com os níveis de expressão apresentados por um *pool* de amostras de doadores sadios e/ou a mediana de expressão de cada miRNA apresentada pelo grupo de pacientes considerados como respondedores [SAN JOSE-ENERIZ *et al.*, 2009; POLAKOVA *et al.*, 2011]. No presente trabalho, a utilização de ambas as estratégias de calibração foram testadas, apresentando resultados semelhantes na comparação entre os grupos. Assim, a utilização dos níveis de expressão do *pool* de amostras de doadores sadios foi escolhida, por representar a contraparte normal do tecido neoplásico estudado.

Em termos gerais, o tratamento estatístico e análise dos dados de expressão de miRNAs podem serem realizados aplicando o método do CT comparativo [LIVAK *et al.*, 2001] utilizando uma simples versão de planilhas molde no Excel, seguido de diferentes abordagens, como por exemplo, normalização e transformação dos dados em log<sub>2</sub>-utilizando programas como o BRB Array-Tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools>), identificação da expressão diferencial entre grupos aplicando o algoritmo SAM (do inglês *Significance Analysis of Microarrays*) e agrupação e visualização dos dados mediante programas como o Cluster 3.0 e Java TreeView 1.0.

Neste trabalho, utilizamos ferramentas mais complexas especialmente desenhadas para análise de dados gerados por *arrays* de RT-qPCR, que permitem a realização de análises totalmente integradas. Este tipo de ferramentas, permitem um extenso pré-processamento dos

dados, onde são incluídas diversas variáveis, como delimitação do *cut-off* de amplificação, testes de dados *outliers*, utilização de diversos calibradores, escolha do melhor gene de referencia, ajuste do valor *p* para significância para dados multiples, assim como diversas opções de classificação e comparação de dados. Este tipo de análise permitiu, por exemplo, a identificação de padrões de variação da expressão de um grupo de 29 miRNAs durante o curso do tratamento da LMC com ITKs.

Evidências crescentes sugerem que os miRNAs poderiam ser utilizados como biomarcadores, já que sua expressão tem sido correlacionada com o diagnóstico, o prognóstico e a predição da resposta terapêutica de diversas neoplasias, sendo bem documentada em vários tipos de leucemias. Em 2004, TAKAMIZAWA e colaboradores foram os primeiros a descrever o valor prognóstico dos miRNAs, mostrando que a expressão do miR-let-7 era reduzida no câncer de pulmão, e que pacientes com baixos níveis de expressão deste miRNA apresentaram uma menor sobrevida global pós cirurgia curativa [TAKAMIZAWA *et al.*, 2004].

Em um estudo realizado em pacientes com LLC, CALIN e colaboradores relataram a importância dos miRNAs miR-16-1 e -15a no diagnóstico e/ou prognóstico da doença, identificando também que certos perfis de expressão de miRNAs poderiam ser utilizados para distinguir células B normais de células B malignas [CALIN *et al.*, 2005]. Por outro lado, os autores mostraram que uma assinatura única de expressão de miRNAs está associada a certos fatores prognósticos, como expressão da proteína ZAP-70 e estado mutacional dos genes IgVH.

Enquanto nas leucemias agudas e na LLC o papel dos miRNAs tem sido bastante estudado, na LMC ainda se conhece muito pouco sobre a expressão destes RNAs não codificantes e seu possível valor preditivo da resposta à terapia com ITKs. Na literatura,

existe apenas um trabalho que comparou o perfil de expressão ao diagnóstico de 250 miRNAs em 8 amostras de LMC de pacientes que utilizaram IM como primeira linha de tratamento [SAN JOSÉ-ENÉRIZ *et al.*, 2009]. Dos 8 pacientes analisados nesse trabalho, 3 apresentaram resistência primária (Ph+>35%) e 5 foram classificados como respondedores ótimos (RCgC em até 12 meses de IM 400mg/dia).

Os autores identificaram 19 miRNAs diferencialmente expressos entre os 2 grupos: os pacientes classificados como resistentes apresentaram 18 miRNAs com expressão reduzida (miR-7, -23a, -26a, -29a, -29c, -30b, -30c, -100, -126#, -134, -141, -183, -196b, -199a, -224, -326, -422b e -520a) e 1 com expressão aumentada (miR-191) em comparação com os respondedores ótimos, demonstrando também que mediante o perfil de expressão destes miRNAs era possível separar claramente os 2 grupos. Dentre os genes alvos preditos para estes miRNAs, encontram-se vários transportadores da família ABC, como ABCC5, ABCA1 e ABCB6 (alvos potenciais dos miR-199a, -183 e -29c, respectivamente) e genes como *RAB11A* (do inglês Ras-related protein Rab-11a) (possível alvo do miR-520a) ou SIRT1 (do inglês Sirtuin 1) (possível alvo do miR-199a), recentemente relacionados à resistência ao IM [SAN JOSÉ-ENÉRIZ *et al.*, 2009]. No presente trabalho, foi identificado um grupo de 8 miRNAs diferencialmente expressos ao diagnóstico quando comparados os grupos Resp-IM (n=10) vs Resist-IM (n=7). Quando aplicado, este perfil de miRNAs permitiu uma clara discriminação entre os grupos. Deste perfil, 4 miRNAs foram confirmados por ensaios de RT-qPCR *singles*: miR-155, -451, -18b, -125a-5p ( $p= 0,0014$ ; 0,001; 0,005 e 3,4E-5, respectivamente).

Estes resultados sugerem que o perfil de expressão destes 4 miRNAs ao diagnóstico poderia ser um fator precoce preditivo da obtenção de uma RCg ótima durante o tratamento com IM, já que o parâmetro para a classificação dos grupos de pacientes Resp-IM e Resist-IM

foi o alcance de uma RCgC. Em contraste, nenhuma diferença no perfil de expressão de miRNAs para o alcance de uma RMM foi observado, sugerindo que outros mecanismos, que não a expressão dos miRNAs avaliados, estariam implicados na obtenção de uma RMM ou RMC, ou seja, no alcance de níveis mais baixos de carga tumoral. Na literatura, não existe nenhum trabalho que compare a expressão de miRNAs com diferentes "profundidades" ( $\leq 0,1\%$ ,  $0,1-1\%$ ,  $1-10\%$ ) de RMol alcançados durante a terapia com ITKs.

O miR-155, localizado no cromossomo 21(banda q21.3), é processado a partir de um transcrito primário não-codificante de aproximadamente 1500 pb. Este miRNA é considerado um gene "máster", por estar envolvido na regulação de diversos processos celulares. A super-expressão do miR-155 foi observada em diversas neoplasias hematológicas; LLC e linfoma de Burkitt, e em vários tumores sólidos; câncer de pulmão, mama e cólon [EIS *et al.*, 2005; IORIO *et al.*, 2005; YANAIHARA *et al.*, 2006; GIRONELLA *et al.*, 2007; RAI *et al.*, 2008; NIKIFOROVA *et al.*, 2008; GREITHER *et al.*, 2010].

Caracterizado como um oncomiR, um aumento de expressão do miR-155 induz um aumento da proliferação celular. Entre seus alvos confirmados, encontram-se os transcritos dos genes c-MAF e SHIP1 (do inglês *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*). Algumas evidências também sugerem que o miR-155 está envolvido em um *loop* de regulação negativa com o NF-kB, mediante o controle post-transcricional das proteínas IKK $\beta$  e IKK $\alpha$ , chaves na regulação da ativação da via NF-kB [SENFTELEBEN & KARIN, 2002]. Nossos resultados mostraram níveis maiores de expressão do miR-155 nos pacientes com resposta ótima em comparação ao grupo Resist-IM, o que estaria em concordância com o modelo de regulação negativa da via NF-KB por parte do miR-155.

O miR-18b pertence ao *cluster* miR-106-363, homólogo dos *clusters* miR-17-92 e miR-106b-25, localizado numa região inter-gênica do cromossomo X. Altos níveis deste



miRNA têm sido relacionados com uma forte inibição da expressão do receptor de estrógeno  $\alpha$  em células de câncer de mama, bloqueando assim toda a via de sinalização [LEIVONEN *et al.*, 2009]. Em leucemias de origem T, foi relatado que a super-expressão do *cluster* miR-106-363 teria um papel oncogênico, já que a frequência da super-expressão foi de 46% dos casos analisados [LANDAIS *et al.*, 2007]. A expressão deste miRNA foi maior no grupo de respondedores ótimos. Este é o primeiro trabalho que relata uma correlação entre a expressão do *cluster* miR-106-363, e especificamente do miR-18b, na LMC e a resposta terapêutica aos ITKs.

O miR-125a-5p pertence ao cluster mir-99b/let-7e/mir-125a, e se localiza numa região intergenica do cromossomo 19. A família do miR-125 é constituída pelos miR-125a, miR-125b1, e miR-125b2, não se tendo informação sobre se estes miRNAs desempenham funções diferentes na biologia da célula ou se suas distintas funções atuam de maneira cooperativa. Diversas evidências sugerem que os membros da família -125 regulam a expressão de fatores pro-apoptóticos, promovendo a sobrevivência de populações celulares hematopoiéticas imaturas [GUO *et al.*, 2010; OOI *et al.*, 2010]. Um estudo recente demonstrou através de ensaios *in vitro* que a co-expressão do miR-125b com o BCR-ABL resulta em um fenótipo celular mais agressivo, em comparação a expressão somente do BCR-ABL [BOUSQUET *et al.*, 2010]. Não existem estudos na literatura avaliando a relação entre a expressão do miR-125 e a resposta à terapia com ITKs na LMC.

O miR-451 foi descrito como um supressor de tumor em vários tipos de câncer, induzindo a retenção celular entre G0/G1 e desencadeando os processos de apoptose [ZHU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011a]. Localizado no cromossomo 17 (banda q11.2), foi observado em modelos *in vitro*, que sua expressão exerce um papel chave no crescimento tumoral em glioblastomas, e que sua ação conjunta com o IM nestes tumores apresenta uma ação

cooperativa, provavelmente através da regulação da expressão de várias proteínas da via Akt [GAL *et al.*, 2008]. A expressão do miR-451 também foi relacionada com o gene MDR1 em células de câncer mama, onde foi observado que a transfecção do miR-451 em células MCF-7/DOX-resistentes resultou no incremento da sensibilidade das células ao medicamento, com uma diminuição da expressão da glicoproteína-P [KOVALCHUK *et al.*, 2008].

Recentemente, foi relatada uma relação entre os níveis de expressão do miR-451 e a atividade quinase da proteína BCR-ABL, sendo sugerido a existência de um *loop* de regulação entre ambos que poderia representar um mecanismo de manutenção das células leucêmicas [LOPOTOVÁ *et al.*, 2011]. Os resultados apresentados no presente trabalho confirmam a relação inversa entre a expressão do miR-451 e a quantidade de transcritos BCR-ABL, sendo concordantes com o modelo da existência de um *loop* de regulação: níveis baixos de expressão ao diagnóstico, aumentados na resposta e novamente diminuídos na recaída ou em situações de não resposta aos ITKs. Nossos resultados estendem estas observações, indicando que os níveis ao diagnóstico do miR-451 poderiam ser preditivos da resposta a terapia com IM.

As análises seriadas onde se observa a variação na expressão do miR-451 em um mesmo paciente realizadas neste trabalho, colocam em evidência a importância da realização deste tipo de estudo. Dos 4 casos com amostras analisadas ao longo do tratamento, dois pacientes se adequam ao modelo de relação inversa entre expressão do miR-451 e carga tumoral. Entretanto, 2 casos apresentaram-se diferentes, ou seja, com amostras expressando altos níveis do miR-451 em associação a um alto percentual de células Ph+. Estas observações sugerem que outras moléculas estejam envolvidas no funcionamento do *loop* miR-451-BCR-ABL.

Não existem até o momento trabalhos que analisem a relação entre a presença de mutações do DQ do gene BCR-ABL e a expressão de miRNAs em pacientes com LMC tratados com ITKs, e em particular a do miR-451. As análises realizadas no presente estudo, em amostras ao diagnóstico de 6 casos resistentes ao IM e portadores de mutações relacionadas com distintos grau de resistência aos ITKs, mostraram que os níveis muito baixos de expressão do miR-451 ao diagnóstico se correlacionam com uma evolução clínica adversa independentemente do tipo de mutação apresentada. Em contraste, os pacientes com níveis altos de expressão do miR-451 ao diagnóstico, apresentaram respostas consideradas satisfatórias no contexto da presença da mutação T315I.

Nossos resultados da análise da variação do perfil de expressão de miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs, revelaram que 29 miRNAs apresentaram um padrão similar ao miR-451: uma baixa expressão do miRNA ao diagnóstico, um aumento da expressão na obtenção de uma RCgC e uma diminuição do nível de expressão em uma situação de recaída e/ou não resposta à terapia com ITKs. Além do miR-451, dentro deste grupo encontram-se também o miR-150, miR-146a, e o miR-103. Estes miRNAs também foram identificados com expressão variável durante o tratamento com ITKs em outros estudos. FLAMANT e colaboradores estudaram a o perfil de expressão de miRNAs em amostras de 10 pacientes com LMC, comparando o nível da expressão ao diagnóstico e aos dias 7 e 14 após o início da terapia com IM. Os autores observaram um aumento na expressão do miR-150 e miR-146a e uma expressão reduzida do miR-142-3p e miR-199b-5p após o dia 14 de tratamento [FLAMANT *et al.*, 2010].

A expressão diminuída do miR-150 também foi relatada por AGIRRE e colaboradores, em um estudo realizado em células CD34+ e mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico, quando comparados a doadores sadios [AGIRRE *et al.*, 2008]. Estes

resultados são concordantes com o aumento de expressão observado no presente trabalho nos miR-150 e miR-146a nas amostras com RCgC, quando comparadas ao nível de expressão apresentado nas amostras ao diagnóstico. Em outro estudo, onde foi comparado o nível de expressão de miRNAs em amostras de pacientes ao diagnóstico, em RMM, e em recaída hematológica, também foi descrita uma variação na expressão dos miR-451, miR -150 e miR-103, em concordância com o observado no presente estudo [POLAKOVA *et al.*, 2011]. Assim, pareceria provável que tanto a variação da expressão do miR-451, quanto dos miR-150, miR -103 e miR-146a, esteja relacionada com os mecanismos moleculares subjacentes á resposta e/ou resistência aos ITKs.

De uma forma geral, o modelo proposto de regulação da expressão genica mediada por miRNAs, implica que quando o miRNA esta presente em altas concentrações, a expressão do gene alvo esta diminuída. Das análises de variação de expressão durante o curso da LMC em tratamento com ITKs realizadas no presente trabalho, o padrão apresentado pelo miR-148a chamou especialmente a atenção, já que apresentou uma grande diferença de expressão quando comparadas as amostras do diagnóstico vs as respostas, assim como as resposta vs recaída e/ou não respostas. Além disso, o padrão de expressão mostrou-se sempre inversamente correlacionado com a carga tumoral, tanto nas amostras agrupadas como nas análises realizadas nas amostras seriadas de cada paciente individual. Assim, este miRNA apresentou-se como um bom candidato para se estudar mais detalhadamente a variação da sua expressão dentro do modelo apresentado para a LMC.

O miR-148a localiza-se no cromossomo 7p15.2, e foi descrito com baixa expressão em vários tipos de tumores sólidos, como tumores gastrointestinais, câncer de cólon, mama e pulmão [CHEN *et al.*, 2010; MAGRELLI *et al.*, 2009]. Esta redução da expressão geralmente observada em vários tipos de câncer levou à suposição de que miR-148a poderia exercer uma

função de gene supressor de tumor, e conseqüentemente, ocupar um papel central na tumorigênese. Até o momento existem poucos genes alvos conhecidos deste miRNA, entre eles se destacam o repressor transcricional TGIF2, as demetiltransferases DNMT1 e DNMT3b, e a proteína quinase MSK1 [LUJAMBIO *et al.*, 2008; BRACONI *et al.*, 2010; DUURSMA *et al.*, 2008; FUJITA *et al.*, 2010].

As análises *in silico* para predição de alvos para o miR148a realizadas no presente trabalho, indicaram 6 alvos especificamente relacionados com a LMC: os genes E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip, SHP-2. O fator de transcrição E2F3, membro da família E2F, tem um papel central no controle do ciclo celular e na ação de diversos supressores de tumor, ligando-se especificamente à proteína RB de uma forma dependente do ciclo celular [XX]. Na LMC, foi demonstrado que a presença de este fator de transcrição é condição necessária para a transformação maligna exercido pela proteína BCR-ABL [EIRING *et al.*, 2008].

A proteína PIK3R3, é a unidade reguladora da PI3-quinase de classe I, que por sua vez ativa a proteína quinase B (ou AKT) na via PI3K/AKT/mTOR [KHARAS *et al.*, 2008]. O funcionamento desta via é central na manutenção dos mecanismos de proliferação e sobrevivência celular na LMC. As proteínas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , membros da família de proteínas serina/treonina quinase, são importantes reguladores ativação da via NF- $\kappa$ B. Ambas as proteínas tem a capacidade de fosforilar a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , que se mantém unida ao NF- $\kappa$ B para inibir a sua função. Tem sido relatado também que IKK- $\alpha$  é capaz de regular a proteína do ciclo celular ciclina D1 de uma forma independente de NF- $\kappa$ B. Na LMC, foi observado em ensaios *in vitro* que o bloqueio da via NF- $\kappa$ B pode ser um mecanismo de resgate para sobrepujar a resistência ao IM [CILLONI *et al.*, 2006].

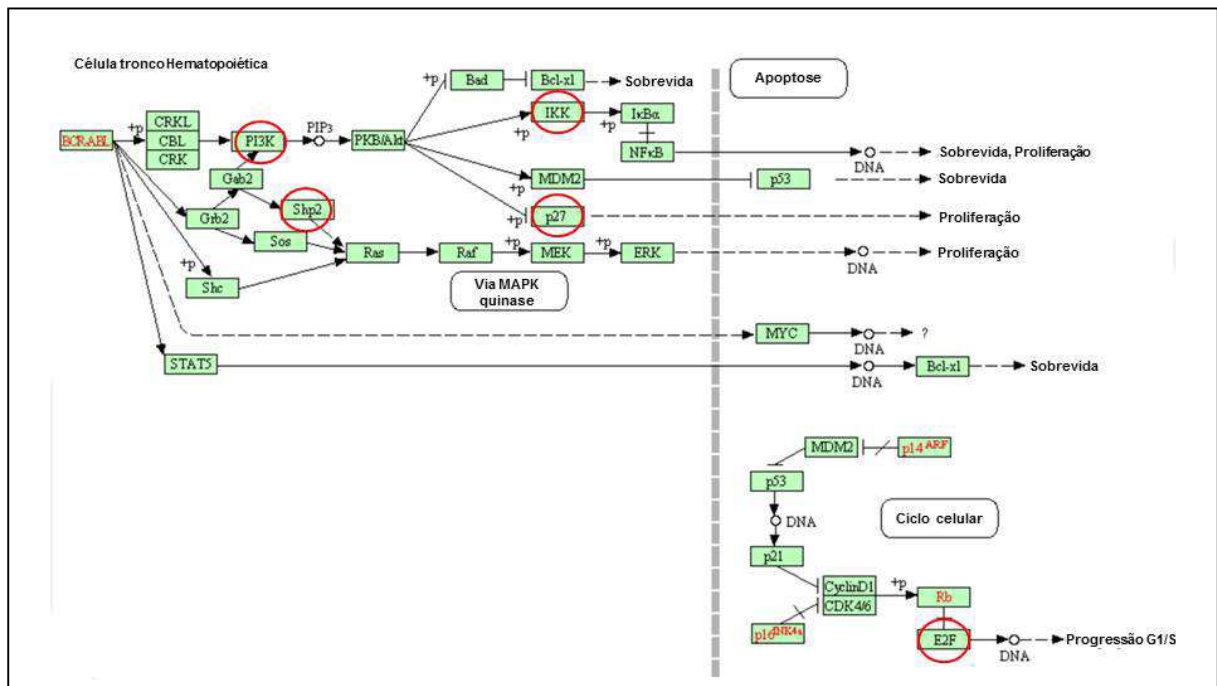
A proteína SHP-2 é uma proteína tirosina-fosfatase, uma classe de moléculas de sinalização que regulam uma variedade de processos celulares, incluindo o crescimento,

diferenciação, e transformação oncogênica. Na LMC, foi observado que a atividade das proteínas Akt quinase e Erk 1/2 quinases foram notavelmente reduzidas após bloqueio da expressão de Shp-2, evidenciando assim que esta proteína é requerida para a transformação mediada pelo Bcr-Abl [CHEN *et al.*, 2007]. A proteína p27 codifica uma proteína que pertence à família Cip/Kip de inibidor dependente de ciclina (CDK), sendo referida muitas vezes como uma proteína inibidora do ciclo celular. Entretanto, na LMC foi proposto que p27 poderia ter um papel oncogênico dependendo da quantidade e localização dentro da célula [AGARWAL *et al.*, 2008].

A interação miRNA/mRNA é baseada na complementariedade de uma sequência de 7 ou 8 nucleotídeos entre a estrutura do miRNA e o RNAm, chamada região ou sequência semente. Evidências crescentes mostram que os miRNAs poderiam exercer sua função reguladora através do reconhecimento de sequências na região 5'UTR ou até mesmo na região codificante de alguns genes [KROL *et al.*, 2010]. Entretanto, a regulação mediada por reconhecimento na região 3'UTR do RNAm constitui até o momento o mecanismo descrito como o de maior potencial de regulação. Os resultados das análises *in silico* da predição de reconhecimento dos 6 alvos preditos para o miR-148a na LMC realizados neste trabalho, mostram que todas as sequências preditas localizam-se na região 3'UTR do RNAm dos alvos, e todas apresentaram altas forças de ligação (menores que -10). Estas observações fortalecem o aspecto da existência de uma forte regulação destes alvos por parte do miR-148a.

Assim, as informações coletadas através dos resultados obtidos neste trabalho, a expressão diminuída do miR148a no diagnóstico e na recaída/não resposta, e aumentada na resposta, seu comportamento sempre inverso à quantidade de carga tumoral (tanto em amostras agrupadas quando na análise de pacientes individuais), conjuntamente com o papel descrito dos seis alvos identificados dentro do modelo da LMC, fazem pensar que o miR-148a

poderia estar exercendo um papel central nos mecanismos de resposta e/ou resistência aos ITKs (Fig. 6.14). De acordo ao modelo proposto para a LMC, a expressão dos genes E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip e SHP-2 é importante para a manutenção do fenótipo leucêmico, o que seria concordante com a baixa expressão do miR-148a observada nas amostras diagnóstico e recaída/não-resposta (Fig. 6.14).



**Figura 6.14: Modelo de ação proposto para o miR-148a na LMC.** A figura mostra o esquema proposto das vias de transdução de sinal alteradas na LMC. O efeito final das diferentes vias alteradas é de um aumento na sobrevivência e da proliferação celular. Segundo relatos da literatura, a expressão dos genes E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip e SHP-2 (sinalizados com um círculo vermelho), são fundamentais para a manutenção do fenótipo leucêmico. Assim, o racional indica que ante uma diminuição da expressão dessas proteínas, como a que poderia ser alcançada através da inibição da tradução pelo miR-148a, a transdução de sinais nas diferentes vias seria prejudicada, com uma consequente diminuição do potencial neoplásico. De maneira contrária, uma situação de baixa expressão do miR-148a (como a observada nas amostras diagnóstico e de recaída e/ou não resposta neste trabalho) seria concordante com um aumento da expressão destas 6 proteínas, possibilitando a manutenção das vias atuantes no processo leucêmico.

Em contraste, com um aumento na expressão do miR-148a, seria esperada uma diminuição da expressão dos alvos e, conseqüentemente, uma interrupção dos mecanismos de sobrevivência, proliferação e inibição da apoptose, situação totalmente compatível com o aumento nos níveis de expressão do miR-148a observado nas amostras em resposta. Ainda que os ensaios de transfecção com o precursor do miR-148a realizados no presente trabalho, não

mostraram um efeito na proliferação ou viabilidade celular, estes resultados marcam o início dos trabalhos funcionais, indicando a necessidade da realização de novos ensaios.

Por outro lado, se conhece muito pouco sobre os mecanismos que regulam a expressão dos miRNAs, sendo descrito que sua expressão pode ser afetada por mudanças genéticas, como mutações, deleções ou amplificações e também através da hipermetilação de sequências do DNA [CALIN *et al.*, 2005; SAITO *et al.*, 2006; LEHMANN *et al.*, 2008; CROCE, 2009]. Em um trabalho recente onde foi avaliado o perfil de metilação de miRNAs em diversos tumores sólidos e linhagens celulares, foi comprovado que a expressão do miR-148a está regulada por metilação.

Os autores observaram que os miR148a, miR-34b/c, miR-9-1, miR-9-2, e miR-9-3 são transcritos através de promotores próprios. Tais promotores se apresentaram sempre não metilados nos tecidos normais utilizados como controle, o que demonstra que a metilação das ilhas CpG próximas a estes miRNAs parece ser câncer-específica [LUJAMBIO *et al.*, 2008]. Os dados obtidos a partir dos ensaios com agentes demetilantes realizados no presente trabalho estão de acordo com a existência de um mecanismo regulatório da expressão do miR-148a também por metilação na LMC. Quando as linhagens celulares k562 e KBM-5 foram tratadas com o agente demetilante 5-Aza, a expressão do miR-148a aumentou significativamente.

Recentemente, foram descritos uma série de miRNAs capazes de regular a expressão de proteínas chave da maquinaria de metilação celular, os chamados epi-miRNAs, colocando um nível a mais de complexidade no intrincado esquema de regulação da expressão genética [FABBRI *et al.*, 2007; BENETTI *et al.*, 2008; SINKKONEN *et al.*, 2008; IORIO *et al.*, 2010]. Curiosamente, foi relatado que algumas proteínas demetiltransferases (DNMTs)



também constituem alvos dos miR-148a e miR-148b [DUURSMA *et al.*, 2008; CROCE, 2009].

As pesquisas de predição de alvos realizadas no presente trabalho mediante ferramentas *in silico* também identificaram alguns membros de esta família de proteínas reguladoras do estado de metilação celular como possíveis alvos do miR-148a. Estes dados sugerem a existência de um *loop* de regulação da expressão, que envolve mecanismos de inibição da transcrição do miR-148a mediante metilação do DNA do seu promotor específico e a inibição da tradução de algumas DNMTs pela ação do miR-148a. Assim, pareceria provável que a relação da expressão do miR-148a com os mecanismos subjacentes à resposta e/ou resistência ao tratamento com ITKs, assim como seu papel na patogênese da LMC, seja dependente de um intrincado e complexo balanço dos mecanismos de metilação e/ou demetilação atuantes nas células neoplásicas.

## 7. CONCLUSÕES

- As taxas de resposta foram de 76% de RCgC, 63% de RMM e 29% de RMC nos pacientes com LMC-FC. A obtenção das respostas não esteve associada com a duração da FC nem com o uso prévio de INF- $\alpha$ . Foi identificado um grupo de respondedores tardios, que representam ~30% dos pacientes que não alcançaram uma RCgC e/ou RMM nos tempos ótimos após início do IM. As respostas alcançadas pelos respondedores tardios, apesar de mais lentas, foram estáveis.
- Mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL foram identificadas em 23% dos casos analisados, sendo detectadas em 31% dos pacientes com falha terapêutica, 10% dos respondedores sub-ótimos, 46% dos LMC-FA e 40% dos pacientes que perderam a RMM. As mutações mais frequentes foram T315I (20%), F359I/V (11,4%), M244V e E255K/V (8,7%), sendo que 5/7 pacientes com mutações no *p-loop* tiveram uma resposta satisfatória com ITK-2G. A quantificação do clone mutado realizada por pirosequenciamento forneceu informação complementar sobre o papel do tamanho clone mutado na resposta ou resistência.
- No presente trabalho, foi identificado um grupo de 8 miRNAs diferencialmente expressos ao diagnóstico quando comparados os grupos de pacientes com Resposta ao IM vs Resistentes ao IM. Destes, 4 miRNAs foram confirmados por ensaios de RT-qPCR *singles*: miR-155, -451, -18b, -125a-5p, sugerindo que o perfil de expressão destes miRNAs ao diagnóstico poderia ser um marcador precoce preditivo da obtenção de uma RCg ótima durante o tratamento com IM.
- As análises da variação do perfil de expressão de miRNAs durante o curso da LMC em tratamento com ITKs, revelaram um padrão similar em 29 miRNAs: uma baixa expressão

do miRNA ao diagnóstico, um aumento da expressão na RCgC e uma diminuição do nível de expressão em uma situação de recaída e/ou não resposta à terapia com ITKs.

- Foram escolhidos para uma análise particularizada os miR-451 e miR-148a, descritos como associados ao BCR-ABL e com função de supressor de tumor, respectivamente. Os níveis de expressão de ambos os miRNAs mostraram uma correlação inversa com a carga tumoral aferida pelos níveis do transcrito BCR-ABL. Esta correlação foi mais consistente para o miR-148a.
- As análises *in silico* para predição de alvos para o miR148a indicaram 6 alvos especificamente relacionados com a LMC: os genes E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip e SHP-2. Foi comprovado que a expressão do miR-148a em linhagens celulares de LMC está regulada por metilação do DNA.

## 8. PERSPECTIVAS

São perspectivas futuras deste trabalho:

- Realizar novas análises no grupo de pacientes com LMC estudado neste trabalho, considerando os riscos que competem (CIFs) com a obtenção das respostas citogenética e molecular, assim como a estabilidade destas respostas.
- Desenvolver e validar a técnica de piro-sequenciamento para todas as mutações importantes no manejo clínico do paciente com LMC tratado com ITKs, criando um algoritmo integrado para caracterização e acompanhamento dos pacientes com mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL.
- Validar os resultados preditivos da expressão dos miRNAs miR-155, -451, -18b, -125a-5p ao diagnóstico, utilizando uma coorte independente de casos de LMC ao diagnóstico, selecionados de acordo com os mesmos critérios, a partir do banco de amostras do Laboratório de Biologia Molecular-CEMO.
- Aprofundar as avaliações da variação de expressão do miR-451 e miR-148a, aumentando o número de amostras ao diagnóstico, em resposta e em recaída ou/não resposta de pacientes com LMC tratados com ITKs, visando também analisar a expressão destes miRNAs durante o tratamento em um número maior de pacientes individuais.
- Realizar uma análise mais detalhada da expressão do miR-451 e miR-148a em pacientes com e sem mutações no domínio quinase do gene BCR-ABL, no intuito de discriminar (i) um possível papel destes miRNAs na modulação da resposta/resistência em pacientes portadores de mutações que conferem um grau intermediário de resistência aos ITKs, e (ii) o padrão de variação destes miRNAs durante a obtenção das respostas ou em estádios precoces do aparecimento da resistência.

- Dentro do planejamento do trabalho, foram desenhados vetores para realização de ensaios *in vitro* de Luciferase, a fim de avaliar o reconhecimento dos 6 alvos propostos para o miR-148a na LMC (E2F3, PIK3R3, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , p27Kip e SHP-2). Os primers para amplificação da sequencia semente de cada alvo já foram desenhados, e os fragmentos foram amplificados com sucesso. A construção dos vetores no plasmideo PGL3 se encontra em andamento. Paralelamente, o desenho de vetores que permitam avaliar a eficiência da transfecção, conjuntamente com a expressão do alvo, está sendo realizado.
- Avaliar o status de metilação do promotor do miR-148a em pacientes com LMC tratados com ITKs, visando correlaciona-lo com os níveis de expressão do miRNA em amostras do diagnóstico, resposta e recaída/não resposta, no intuito de elucidar o impacto dos mecanismos epigenéticos mediados por metilação, e suas possíveis interconexões, na resistência ao IM na LMC.

## 9. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; BUMM, TG.; CORBIN, AS.; *et al.* **Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease.** *Blood* 2008;112(5):1960-1970.
- AGIRRE, X.; ROMAN-GOMEZ, J.; VAZQUEZ, I.; *et al.* **Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia.** *Int J Cancer* 2006;118:1945-1953.
- AGIRRE, X.; VELASCO, A.; SAN JOSÉ-ENÉRIZ, E.; *et al.* **Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leucemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth.** *Mol Cancer Res* 2008;6:1830-1840.
- ALENCAR, AJ.; MALUMBRES, R.; KOZLOSKI, GA.; *et al.* **MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP.** *Clin Cancer Res* 2011;17(12):4125-4135.
- ALTUVIA, Y.; LANDGRAF, P.; LITHWICK, G.; *et al.* **Clustering and conservation patterns of human microRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2005;33(8):2697-2706.
- AMBROS, V. **MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing.** *Cell* 2003;113:673–676.
- ANDERSEN, CL.; JENSEN, JL.; ØRNTOFT, TF. **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer Res* 2004;64(15):5245-5250.
- APPERLEY, JF. Part I: **Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.** *Lancet Oncol* 2007;8:1018–1029.
- AZAM, M.; LATEK, RR.; DALEY, GQ. **Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL.** *Cell* 2003;112:831–843.
- BACCARANI, M.; CORTES, J.; PANE, F.; *et al.* **Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet.** *J Clin Oncol* 2009;27(35):6041-6051.
- BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; *et al.* **Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood* 2006;108(6):1809-1820.
- BARNES, DJ.; PALAIOLOGOU, D.; PANOUSOPOULOU, E.; *et al.* **Bcr–Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia.** *Cancer Res* 2005;65:8912–8919.

**BARTEL, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004;116:281–297.**

**BENETTI, R.; GONZALO, S.; JACO, I.; et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. Nat Struct Mol Biol 2008;15(3):268-279.**

**BOEHM, M.; SLACK, FJ. MicroRNA control of lifespan and metabolism. Cell Cycle 2006;5: 837–840.**

**BOUSQUET, M.; HARRIS, MH.; ZHOU, B.; et al. MicroRNA miR-125b causes leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(50):21558-21563.**

**BRACONI, C.; HUANG, N.; PATEL, T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin- 6 in human malignant cholangiocytes. Hepatology 2010;51:881–890.**

**BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. Blood 2002;99(9):3472-3475.**

**BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, 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 2003;102:276–283.**

**BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; PARKINSON, I.; et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. Blood 2004;104(9):2926-2932.**

**BRANFORD, S.; SEYMOUR, JF.; GRIGG, A.; et al: BCR-ABL messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5 years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable BCR-ABL using strict sensitivity criteria. Clin Cancer Res 2007;13:7080-7085.**

**BRANFORD, S.; FLETCHER, L.; CROSS, NC.; 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 2008;112(8):3330-3338.**

**BRANFORD, S.; MELO, JV.; HUGHES, TP. 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 2009;114:5426-5435.**

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. **The significance of early, major and stable molecular responses in chronic myeloid leukemia in the imatinib era.** Crit Rev Oncol Hematol 2011;79(2):135-143.

BRYANT, A.; LUTHERBORROW, M.; MA, D. **The clinicopathological relevance of microRNA in normal and malignant haematopoiesis.** Pathology 2009;41(3):204-213.

BUENO, MJ.; PÉREZ DE CASTRO, I.; GÓMEZ DE CEDRÓN, M.; *et al.* **Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression.** Cancer Cell 2008;13:496–506.

BUSTIN, SA.; BENES, V.; GARSON, JA.; *et al.* **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** Clin Chem 2009;55(4):611-262.

CALIN, GA.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, CD.; *et al.* **Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.** Proc Natl Acad Sci 2004;101(9):2999-3004.

CALIN, GA.; FERRACIN, M.; CIMMINO, A.; *et al.* **A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.** N Engl J Med 2005;353(17):1793–1801.

CARLETON, M.; CLEARY, MA.; LINSLEY, PS. **MicroRNAs and cell cycle regulation.** Cell Cycle 2007;6:2127–2132.

CERVANTES, F.; HERNÁNDEZ-BOLUDA, JC.; STEEGMANN, JL.; *et al.* **Imatinib mesylate therapy of chronic phase chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients.** Haematologica 2003;88(10):1117-1122.

CHEN, C.; RIDZON, DA.; BROOMER, AJ.; *et al.* **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR.** Nucleic Acids Res 2003;33:e179.

CHEN, J.; YU, WM.; DAINO, H.; *et al.* **SHP-2 phosphatase is required for hematopoietic cell transformation by Bcr-Abl.** Blood 2007;109(2):778-785.

CHEN, RW.; BEMIS, LT.; AMATO, CM.; *et al.* **Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma.** Blood 2008;112: 822–829.

CHEN, Y.; SONG, Y.; WANG, Z.; *et al.* **Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance.** J Gastrointest Surg 2010;14:1170–1179.

CILLONI, D.; MESSA, F.; ARRUGA, F.; *et al.* **The NF- $\kappa$ B pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome Imatinib resistance.** Leukemia 2006;20(1):61-67.



CORTES, J.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; *et al.* **Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate.** Clin Cancer Res 2005;11(9):3425-3432.

CORTES, JE. **Imatinib therapy for chronic myeloid leukemia: where do we go now?** J Clin Oncol 2008;26(20):3308-3309.

CROSS, NCP.; MELO, JV.; FENG, L.; *et al.* **An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders.** Leukemia 1994;8:186-189.

CROCE, CM. **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** Nat Rev Genet 2009;10(10):704-714.

DE LAVALLADE, H.; APPERLEY, JF.; KHORASHAD, JS.; *et al.* **Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis.** J Clin Oncol 2008;26(20):3358-3363.

DEININGER, MWN.; GOLDMAN, JM.; MELO, JV. **The molecular biology of chronic myeloid leukemia.** Blood 2000;96(10):3343-3356.

DRUKER, BJ.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, SG.; *et al.* **Five year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.** N Engl J Med 2006;355(23):2408-2417.

DUURSMA, AM.; KEDDE, M.; SCHRIER, M.; *et al.* **miR-148 targets human DNMT3b protein coding region.** Rna 2008;14:872-877.

EHRlich, M. **DNA methylation in cancer: too much, but also too little.** Oncogene 2002;21:5400-5413.

EIRING, A.; NEVIANI, P.; SANTHANAM, R.; *et al.* **Identification of novel posttranscriptional targets of the BCR/ABL oncoprotein by ribonomics: requirement of E2F3 for BCR/ABL leukemogenesis.** Blood 2008;111(2):816-828.

EIS, PS.; TAM, W.; SUN, L.; *et al.* **Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas.** Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:3627-3632.

ESTELLER, M.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; ROSELL, R.; *et al.* **Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients.** Cancer Res 1999;59:67-70.

ESTELLER, M.; GARCIA-FONCILLAS, J.; ANDION, E.; *et al.* **Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.** N Engl J Med 2000;343(19):1350-1354.

ESTELLER, M. **CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.** *Oncogene* 2002;21:5427–5440.

ESTELLER, M. **Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg.** *Clin Immunol* 2003;109:80–88.

ESTELLER, M. **Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:629–656.

ESKAZAN, AE.; SOYSAL, T.; ERBILGIN, Y.; *et al.* **Chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation are resistant to dasatinib: is that true for all the patients?.** *Leuk Res* 2011;35(9):e145-6.

FABBRI, M.; GARZON, R.; CIMMINO, A.; *et al.* **MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(40):15805-15810.

FABBRI, M.; CROCE, CM.; CALIN, GA. **MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas.** *Leuk Lymphoma* 2009;50(2):160-170.

FABER, E.; MOJZIKOVA, R.; PLACHY, R.; *et al.* **Major molecular response achieved with dasatinib in a CML patient with F317L BCR-ABL kinase domain mutation.** *Leuk Res* 2010;34(4):e91-3.

FAZI, F.; ROSA, A.; FATICA, A.; *et al.* **A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis.** *Cell* 2005;123(5):819-831.

FEINBERG, AP.; VOGELSTEIN, B. **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** *Nature* 1983;301:89–92.

FEINBERG, AP.; GEHRKE, CW.; KUO, KC.; *et al.* **Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia.** *Cancer Res* 1988;48:1159–1161.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, MK.; *et al.* **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998;391(6669):806-811.

FLAMANT, S.; RITCHIE, W.; GUILHOT, J.; *et al.* **Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia.** *Haematologica* 2010;95(8):1325-1333.

FUJITA, Y.; KOJIMA, K.; OHHASHI, R.; *et al.* **MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression.** *J Biol Chem* 2010;285:19076–19084.

GABERT, J.; BEILLARD, E.; VAN DER VELDEN, VH.; *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):2318-2357.

GAL, H.; PANDI, G.; KANNER, AA.; *et al.* **MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376(1):86–90.

GALM, O.; HERMAN, JG.; BAYLIN, SB. **The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies.** *Blood Reviews* 2006;20:1–13.

GARCIA-MANERO, G.; DANIEL, J.; SMITH, TL.; *et al.* **DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia.** *Clin Cancer Res* 2002;8:2217–2224.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. **CpG islands in vertebrate genomes.** *J Mol Biol* 1987;196:261–282.

GARZON, R.; GAROFALO, M.; MARTELLI, MP.; *et al.* **Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin.** *Proc Natl Acad Sci* 2008;105(10):3945-3950. (b)

GARZON, R.; VOLINIA, S.; LIU, CG.; *et al.* **MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2008;111(6):3183-3189. (a)

GEORGANTAS, RW.; HILDRETH, R.; MORISOT, S.; *et al.* **CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2750-2755.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, PD. **Small silencing RNAs: an expanding universe.** *Nat Rev Genet* 2009;10(2):94-108.

GIRONELLA, M.; SEUX, M.; XIE, MJ.; *et al.* **Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16170–16175.

GOLDMAN, JM. **Chronic myeloid leukemia after a decade of Imatinib: Initial treatment for patients with CML.** *Hematology* 2009:453-460.

GORRE, ME.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; *et al.* **Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCRABL gene mutation or amplification.** *Science* 2001;293:876-880.

GREAVES, M. **The New Biology of Leukemia**, 1997. In: Henderson and Lister (eds). *Leukemia* (Ch 3). 6th. Ed. Saunders. Canadá.

GREITHER, T.; GROCHOLA, LF.; UDELNOW, A.; *et al.* **Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.** Intl J Cancer 2012;126:73–80.

GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, RJ.; VAN DONGEN, S.; *et al.* **miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature.** Nucleic Acids Res 2006;34:140-144.

GROFFEN, J.; STEPHENSON, JR.; HEISTERKAMP, N.; *et al.* **Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.** Cell 1984;36:93-99.

GUILHOT, F.; DRUKER, B.; LARSON, RA.; *et al.* **High rates of durable response are achieved with imatinib after treatment with interferon alpha plus cytarabine: results from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial.** Haematologica 2009;94(12):1669-1675.

GUO, S.; LU, J.; SCHLANGER, R.; *et al.* **MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number.** Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(32):14229-14234.

GUTIERREZ, MI.; SIRAJ, AK.; BHARGAVA, M.; *et al.* **Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: correlation with phenotype and molecular subgroup.** Leukemia 2003;17:1845–1850.

HANAHAH, D.; WEINBERG, RA. **The hallmarks of cancer.** Cell 2000;100:57–70.

HANFSTEIN, B.; MÜLLER, MC.; KREIL, S.; *et al.* **Dynamics of mutant BCR-ABL-positive clones after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy.** Haematologica 2011;96(3):360-6.

HANSEN, KD.; TIMP, W.; BRAVO, HC.; *et al.* **Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types.** Nat Genet 2011;43:768-775.

HAYETTE, S.; MICHALLET, M.; BAILLE, ML.; *et al.* **The assessment and the follow-up of the proportion of T315I Mutant Bcr- Abl transcripts can guide adequate therapeutic strategy in CML patient.** Leuk Res 2005;29:1073–1077.

HE, L.; HANNON, GJ. MicroRNAs: **Small RNAs with a big role in gene regulation.** Nat Rev Genet 2004;5:522-531.

HEHLMANN, R.; LAUSEKER, M.; JUNG-MUNKWITZ, S.; *et al.* **Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon- $\alpha$  in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.** J Clin Oncol 2011;29(12):1634-1642.

HENDERSON, ES.; LISTER, TA.; GREAVES, MF. **Leukemia**, 2002. 7th ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Company.

HERMAN, JG.; CIVIN, CI.; ISSA, JP.; *et al.* **Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies.** *Cancer Res* 1997;57:837-841.

HERMAN, JG.; BAYLIN, SB. **Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.** *N Engl J Med* 2003;349:2042–2054.

HOCHHAUS, A.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; *et al.* **Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon- $\alpha$  treatment.** *Blood* 2008;111(3):1039-1043. (a)

HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M.; DEININGER, M.; *et al.* **Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib.** *Leukemia* 2008; 22:1200–1206. (b)

HOCHHAUS, A.; O'BRIEN, SG.; GUILHOT, F.; *et al.* **Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia.** *Leukemia* 2009;23:1054–1061. (a)

HOCHHAUS, A.; MULLER, MC.; RADICH, J.; *et al.* **Dasatinib-associated major molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following imatinib failure: response dynamics and predictive value.** *Leukemia* 2009;23:1628–1633. (b)

HUGHES, TP.; KAEDA, J.; BRANFORD, S.; *et al.* **Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.** *N Engl J Med* 2003;349(15):1423-1432.

HUGHES, T. ; DEININGER, M. ; HOCHHAUS, A. ; *et al.* **Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results.** *Blood* 2006;108(1):28-37.

HUGHES, TP.; HOCHHAUS, A.; BRANFORD, S.; *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* 2010;116(19):3758-3765.

IACOBUCCI, I.; ROSTI, G.; AMABILE, M.; *et al.* **Comparison between patients with Philadelphia-positive chronic phase chronic myeloid leukemia who obtained a complete cytogenetic response within 1 year of imatinib therapy and those who achieved such a response after 12 months of treatment.** *J Clin Oncol* 2006;24(3):454-459. (a)

IACOBUCCI, I.; SAGLIO, G.; ROSTI, G.; *et al.* **Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR**

**in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients.** Clin Cancer Res. 2006;12(10):3037-42. (b)

IORIO, MV.; FERRACIN, M.; LIU, CG.; *et al.* **MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.** Cancer Res 2005;65:7065–7070.

IORIO, MV.; PIOVAN, C.; CROCE, CM. **Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network.** Biochim Biophys Acta 2010;1799(10-12):694-701.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; JONES, D.; *et al.* **Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate.** Leukemia 2006;20(10):1767-1773.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, HM.; JONES, D.; *et al.* **Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with F317L BCR-ABL kinase domain mutation after therapy with tyrosine kinase inhibitors.** Blood 2008;112(13):4839-4842.

JONES, PA.; LAIRD, PW. **Cancer epigenetics comes of age.** Nat Genet 1999;21:163–167.

KANTARJIAN, HM.; CORTES, J.; O'BRIEN, S.; *et al.* **Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase.** Blood 2002;99(10):3547-3553.

KANTARJIAN, HM.; CORTES, JE.; O'BRIEN, S.; *et al.* **Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha.** Blood. 2004 Oct 1;104(7):1979-88.

KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; *et al.* **Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon alpha-based regimens in newly diagnosed chronic phase chronic myelogenous leukemia.** Blood 2006;108:1835-1840.

KANTARJIAN, H.; SCHIFFER, C.; JONES, D.; *et al.* **Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods.** Blood 2008;111(4):1774-1780.

KAPLAN, EL.; MEIER, P. **Nonparametric estimation from incomplete observations.** J Amer Statist Assn 1958;53:457–481.

KHARAS, MG.; JANES, MR.; SCARFONE, VM.; *et al.* **Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells.** J Clin Invest 2008;118(9):3038-3050.

KHORASHAD, JS.; ANAND, M.; MARIN, D.; *et al.* **The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib.** *Leukemia* 2006;20:658–663.

KHORASHAD, JS.; DE LAVALLADE, H.; APPERLEY, JF.; *et al.* **Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression.** *J Clin Oncol* 2008;26(29):4806-4813. (a)

KHORASHAD, JS.; MILOJKOVIC, D.; MEHTA, P.; *et al.* **In vivo kinetics of kinase domain mutations in CML patients treated with dasatinib after failing imatinib.** *Blood* 2008;111(4):2378-2381. (b)

KLUIVER, J.; POPPEMA, S.; DE JONG, D.; *et al.* **BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas.** *J Pathol* 2005;207(2):243-249.

KOVALCHUK, O.; FILKOWSKI, J.; MESERVY, J.; *et al.* **Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin.** *Mol Cancer Ther* 2008;7(7):2152–2159.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay.** *Nat Rev Genet* 2010;11(9):597-610.

LAHAYE, T.; RIEHM, B.; BERGER, U.; *et al.* **Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up.** *Cancer* 2005;103(8):1659-1669.

LANDAIS, S.; LANDRY, S.; LEGAULT, P.; *et al.* **Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia.** *Cancer Res* 2007;67:5699–5707.

LAWRIE, CH. **MicroRNAs and haematology: small molecules, big function.** *Br J Haematol* 2007;137(6):503-512.

LEE, RC.; FEINBAUM, RL.; AMBROS, V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell* 1993;75(5):843-854.

LEHMANN, U.; HASEMEIER, B.; CHRISTGEN, M.; *et al.* **Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer.** *J Pathol* 2008;214(1):17-24.

LEIVONEN, SK.; MÄKELÄ, R.; OSTLING, P.; *et al.* **Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines.** *Oncogene* 2009;28(44):3926-3936.

LEWIS, BP.; BURGE, CB.; BARTEL, DP. **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** *Cell* 2005;120:15-20.

LIU, CG.; CALIN, GA.; MELOON, B.; *et al.* **An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues.** Proc Natl Acad Sci 2004;101(26):9740-9744.

LIVAK, KJ.; SCHMITTGEN, TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** Methods 2001;25(4):402-408.

LOSSOS, IS.; JONES, CD.; WARNKE, R.; *et al.* **Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma.** Blood 2001;98(4):945-951.

LOPOTOVÁ, T.; ZÁČKOVÁ, M.; KLAMOVIČ, H.; *et al.* **MicroRNA-451 in chronic myeloid leukemia: miR-451-BCR-ABL regulatory loop?** Leuk Res 2011;35(7):974-977.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, EA.; *et al.* **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** Nature 2005;435(7043):834-838.

LUCAS, CM. ; WANG, L. ; AUSTIN, GM. ; *et al.* **A population study of imatinib in chronic myeloid leukaemia demonstrates lower efficacy than in clinical trials.** Leukemia 2008;22(10):1963-1966.

LUJAMBIO, A.; CALIN, GA.; VILLANUEVA, A.; *et al.* **A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis.** Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:13556–13561.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; *et al.* **Nuclear export of microRNA precursors.** Science 2004;303:95–98.

MAGRELLI, A.; AZZALIN, G.; SALVATORE, M.; *et al.* **Altered microRNA expression patterns in hepatoblastoma patients.** Transl Oncol 2009; 2:157–163.

MAHON, FX.; RÉA, D.; GUILHOT, J.; *et al.* **Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial.** Lancet Oncol 2010;11(11):1029-1035.

MANRIQUE ARECHAVALETA, G.; SCHOLL, V.; PÉREZ, V.; *et al.* **Rapid and sensitive allele-specific (AS)-RT-PCR assay for detection of T315I mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine-kinase inhibitors.** Clin Exp Med 2011;11(1):55-59.

MARIN, D. ; KAEDA, J. ; SZYDLO, R. ; *et al.* **Monitoring patients in complete cytogenetic remission after treatment of CML in chronic phase with imatinib: patterns of residual leukaemia and prognostic factors for cytogenetic relapse.** Leukemia 2005;19:507–512.



MARIN, D.; MILOJKOVIC, D.; OLAVARRIA, E.; *et al.* **European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor.** *Blood* 2008;112(12):4437-4444.

MARLEY, SB.; GORDON, MY. **Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven.** *Clin Sci (Lond)* 2005;109(1):13-25.

MAUNAKEA, AK.; NAGARAJAN, RP.; BILENKY, M.; *et al.* **Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters.** *Nature* 2010;466(7303):253-257.

MELKI, JR.; VINCENT, PC.; CLARK, SJ. **Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia.** *Cancer Res* 1999;59:3730–3740.

MELO, JV. **The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype.** *Blood* 1996;88(7):2375-2384.

MELO, JV.; DEININGER, MW. **Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation.** *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18(3):545-568, vii-viii.

MI, S.; LU, J.; SUN, M.; *et al.* **MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia.** *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(50):19971-19976.

MONTICELLI, S.; ANSEL, KM.; XIAO, C.; *et al.* **MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system.** *Genome Biol* 2005;6(8):R71.

MÜLLER, MC.; CORTES, JE.; KIM, DW.; *et al.* **Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations.** *Blood* 2009;114(24):4944-4953. (a)

MÜLLER, MC.; CROSS, NC.; ERBEN, P.; *et al.* **Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe.** *Leukemia* 2009;23:1957–1963. (b)

NAGY, E.; BECK, Z.; KISS, A.; *et al.* **Frequent methylation of p16INK4A and p14ARF genes implicated in the evolution of chronic myeloid leukaemia from its chronic to accelerated phase.** *Eur J Cancer* 2003;39(16):2298-2305.

NELKIN, BD.; PRZEPIORKA, D.; BURKE, PJ.; *et al.* **Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia.** *Blood* 1991;77(11):2431-2434.

NGUYEN, TT.; MOHRBACHER, AF.; TSAI, YC.; *et al.* **Quantitative measure of c-abl and p15 methylation in chronic myelogenous leukemia: biological implications.** *Blood* 2000;95:2990–2992.

NICOLINI, FE.; CORM, S.; LÊ, QH.; *et al.* **The prognosis impact of BCR-ABL P-loop mutations: worse or not worse?.** *Leukemia* 2007;21(2):193-194.

NIKIFOROVA, MN.; TSENG, GC.; STEWARD, D.; *et al.* **MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility.** *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1600–1608.

NOWELL, P.; HUNGERFORD, DA. **Minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** *Science* 1960;132:1497.

O'BRIEN, SG.; GUILHOT, F.; LARSON, RA.; *et al.* **Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia.** *NEJM* 2003;348(11):994-1004.

O'BRIEN, SG.; GUILHOT, F.; GOLDMAN, JM.; *et al.* **International Randomized Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CMLCP) Treated with Imatinib (IM).** *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008;112:Abstract 186.

O'HARE, T.; EIDE, CA.; DEININGER, MW. **BCR-ABL domain mutations, drug resistance and the road to a cure of chronic myeloid leukemia.** *Blood* 2007;110(7):2242-2249.

OOI, AG.; SAHOO, D.; ADORNO, M.; *et al.* **MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(50):21505-21510.

ORTMMAN, CA.; BURCHERT, A.; HÖLZLE, K.; *et al.* **Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region.** *Nucleic Acids Res* 2005;33:6895-6905.

OTAZÚ, IB.; ZALCBERG, I.; TABAK, DG.; *et al.* **Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders.** *Leuk Lymphoma* 2000;37(1-2):205-211.

OYEKUNLE, AA.; CASTAGNETTI, F.; GUGLIOTTA, G.; *et al.* **F317L BCR-ABL1 kinase domain mutation associated with a sustained major molecular response in a CML patient on dasatinib.** *Leuk Res* 2011;35(7):e118-120.

PALANDRI, F.; IACOBUCCI, I.; MARTINELLI, G.; *et al.* **Long-term outcome of complete cytogenetic responders after imatinib 400 mg in late chronic phase, philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: the GIMEMA Working Party on CML.** *J Clin Oncol* 2008;26(1):106-111.

PALANDRI, F.; IACOBUCCI, I.; SOVERINI, S.; *et al.* **Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response.** Clin Cancer Res 2009;15(3):1059-1063.

PARKER, WT.; LAWRENCE, RM.; HO, M.; *et al.* **Sensitive Detection of BCR-ABL1 Mutations in Patients With Chronic Myeloid Leukemia After Imatinib Resistance Is Predictive of Outcome During Subsequent Therapy.** JCO 2011; 29(32): 4250-4259.

PARKER, WT.; HO, M.; SCOTT, HS.; *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 2012;119(10):2234-2238.

PASCHKA, P.; MÜLLER, MC.; MERX, K.; *et al.* **Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission.** Leukemia 2003;17(9):1687-1694.

PASQUINELLI, AE.; REINHART, BJ.; SLACK, F.; *et al.* **Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.** Nature 2000;408(6808):86-89.

PASQUINELLI, AE.; HUNTER, S.; BRACHT, J. **MicroRNAs: a developing story.** Curr Opin Genet Dev 2005;15:200–205.

PFIRRMANN, M.; HOCHHAUS, A.; LAUSEKER, M.; *et al.* **Recommendations to meet statistical challenges arising from endpoints beyond overall survival in clinical trials on chronic myeloid leukemia.** Leukemia 2011;25(9):1433-1438.

POLÁKOVÁ, K.; LOPOTOVÁ, T.; KLAMO VÁ, H.; *et al.* **Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets.** Mol Cancer 2011;10:41.

POTENZA, L.; VOLZONE, F.; RIVA, G.; *et al.* **Interferon-alpha may restore sensitivity to tyrosine-kinase inhibitors in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia with F317L mutation.** Br J Haematol 2009;146(2):227-230.

PRESS, RD.; GALDERISI, C.; YANG, R.; *et al.* **A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response.** Clin Cancer Res 2007;13(20):6136-6143.

QIN, YZ.; JIANG, B.; JIANG, Q.; *et al.* **Molecular responses of late chronic phase chronic myeloid leukemia patients after achieving complete cytogenetic responses with imatinib treatment: a 6-year follow-up.** Ann Hematol 2009;88:37-41.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H.; JONES, D.; *et al.* **Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression**

**among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving highdose or standarddose imatinib therapy.** *Blood* 2009;113(25):6315-6321.

REDAELLI, S.; PIAZZA, R.; ROSTAGNO, R.; *et al.* **Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants.** *J Clin Oncol* 2009;27(3):469-471.

RAI, D.; KARANTI, S.; JUNG, I.; *et al.* **Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma.** *Cancer Genet Cytogenet* 2008;181:8–15.

RAVECCE, ES.; SALERNO, E.; SCAGLIONE, BJ.; *et al.* **Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice.** *Blood* 2007;109(12):5079-5086.

REINHART, BJ.; SLACK, FJ.; BASSON, M.; *et al.* **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 2000;403(6772):901-906.

RICCI, C. ; SCAPPINI, B. ; DIVOKY, V. ; *et al.* **Mutation in the ATP-binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive cell line.** *Cancer Res* 2002;62(21):5995-5998.

RICE, KL.; HORMAECHE, I.; LICHT, JD. **Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis.** *Oncogene* 2007;26:6697–6714.

RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, JL.; *et al.* **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** *Genome Res* 2004;14:1902-1910.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; CASTILLEJO, JÁ.; *et al.* **Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia.** *Blood* 2004;104(8):2492-2498.

ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; AGIRRE, X.; *et al.* **Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia.** *Oncogene* 2005;24:7213-7223.

ROSTI, G.; MARTINELLI, G.; BASSI, S.; *et al.* **Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia.** *Blood* 2004;103(6):2284-2290.

ROWLEY, JD. **A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining [letter].** *Nature* 1973;243:290-293.

ROYCHOWDHURY, S.; TALPAZ, M. **Managing resistance in chronic myeloid leukemia.** *Blood Rev* 2011;25(6):279-290.

- SAITO, K.; ISHIZUKA, A.; SIOMI, H.; *et al.* **Processing of pre- microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells.** PLoS Biol 2005;3(7):e235.
- SAITO, Y.; LIANG, G.; EGGER, G.; *et al.* **Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells.** Cancer Cell 2006;9:435-443.
- SAN JOSE-ENERIZ, E.; ROMAN-GOMEZ, J.; JIMENEZ-VELASCO, A.; *et al.* **MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations.** Mol Cancer 2009;8:69.
- SCHMITTGEN, TD.; LEE, EJ.; JIANG, J. **High-throughput real-time PCR.** Methods Mol Biol 2008;429:89-98.
- SCHINDLER, T.; BORNMANN, W.; PELLICENA, P.; *et al.* **Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase.** Science 2000;289(5486):1938-1942.
- SCHOLL, V.; HASSAN, R.; ZALCBERG, IR. **miRNA-451: A putative predictor marker of Imatinib therapy response in chronic myeloid leukemia.** Leuk Res 2012;36(1):119-121.
- SELIGSON, DB.; HORVATH, S.; SHI, T.; *et al.* **Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence.** Nature 2005;435(7046):1262-1266.
- SENFTLEBEN, U.; KARIN, M. **The IKK/NF- $\kappa$ B pathway.** Crit Care Med 2002; 30:18-26.
- SILVER, RT.; TALPAZ, M.; SAWYERS, CL.; *et al.* **Four years of follow-up of 1027 patients with late chronic phase (LCP), accelerated phase (AP), or blast crisis (BC) chronic myeloid leukemia (CML) treated with imatinib in three large phase II trials.** Blood 2004;104 abs 23.
- SINKKONEN, L.; HUGENSCHMIDT, T.; BERNINGER, P.; *et al.* **MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells.** Nat Struct Mol Biol 2008;15(3):259-267.
- SOVERINI, S.; COLAROSSO, S.; GNANI, A.; *et al.* **Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia.** Clin Cancer Res 2006;12(24):7374-7379. (a)
- SOVERINI, S.; MARTINELLI, G.; COLAROSSO, S.; *et al.* **Presence or the emergence of a F317L BCR-ABL mutation may be associated with resistance to dasatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemia.** J Clin Oncol 2006;24(33):e51-52.(b)
- SOVERINI, S.; POERIO, A.; VITALE, A.; *et al.* **At the time of diagnosis, Ph<sup>+</sup> cells from both chronic phase myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia patients already harbour BCR-ABL kinase domain mutations.** Haematologica 2009 ;94[suppl.2]:212 abs. 0526. (a)

SOVERINI, S.; GNANI, A.; COLAROSSO, 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* 2009;114(10):2168-2171. (b)

SOVERINI, S.; HOCHHAUS, A.; NICOLINI, FE.; *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.

SUN, B.; JIANG, G.; ZAYDAN, MA.; *et al.* **ABL1 promoter methylation can exist independently of BCR-ABL transcription in chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors.** *Cancer Res* 2001;61:6931–6937.

SUN, S.; HUANG, Y.; YAN, PS.; *et al.* **Preprocessing differential methylation hybridization microarray data.** *BioData Min* 2011;4:13.

TAKAMIZAWA, J.; KONISHI, H.; YANAGISAWA, K.; *et al.* **Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival,** *Cancer Res* 2004;64(11):3753–3756.

THIJSEN, S.; SCHUURHUIS, G.; VAN OOSTVEEN, J.; *et al.* **Chronic myeloid leukemia from basics to bedside.** *Leukemia* 1999;13:1646-1674.

TOKARSKI, JS.; NEWITT, JA.; CHANG, CY.; *et al.* **The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants.** *Cancer Res* 2006;66(11):5790-5797.

TOYOTA, M., KOPECKY, KJ.; TOYOTA, MO.; *et al.* **Methylation profiling in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2001;97:2823–2829.

TOYOTA, M. ; ISSAB, JPJ. **Epigenetic Changes in Solid and Hematopoietic Tumors.** *Semin Oncol* 2005;32:521-531.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; *et al.* **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002;3(7):0034.1-0034.11.

VARAMBALLY, S.; DHANASEKARAN, SM.; ZHOU, M.; *et al.* **The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.** *Nature* 2002;419:624-629.

VARDIMAN, JW.; HARRIS, NL.; BRUNNING, RD. **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.** *Blood* 2002;100:2292-2302.

VELDEN, VHJ.; HOCHHAUS, A.; CAZINNIGA, G. **Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.** *Leukemia* 2003;17:1013-1034.

- VENTURINI, L.; BATTMER, K.; CASTOLDI, M.; *et al.* **Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells.** *Blood* 2007;109(10):4399-4405.
- WANG, L.; KNIGHT, K.; LUCAS, C.; *et al.* **The role of serial BCR-ABL transcript monitoring in predicting the emergence of BCR-ABL kinase mutations in imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia.** *Haematologica* 2006;91(2):235-239. (a)
- WANG, XC.; TIAN, LL.; JIANG, XY.; *et al.* **The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer.** *Cancer Lett* 2011;311(2):203-209.(b)
- WANG, B.; HOWEL, P.; BRUHEIM, S.; *et al.* **Systematic evaluation of three microRNA profiling platforms: microarray, beads array, and quantitative real-time PCR array.** *PLoS One* 2011;6(2):e17167.
- WEBER, MJ. **New human and mouse microRNA genes found by homology search.** *Febs J* 2005;272:59-73.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. **Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*.** *Cell* 1993;75:855–862.
- WILLIS, SG.; LANGE, T.; DEMEHRI, S.; *et al.* **High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy.** *Blood* 2005;106(6):2128-2137.
- YANAIHARA, N.; CAPLEN, N.; BOWMAN, E.; *et al.* **Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.** *Cancer Cell* 2006;9:189–198.
- YANG, MY.; CHANG, JG.; LIN, PM.; *et al.* **Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3.** *Cancer Sci* 2006;97:1298-1307.
- YAUK, CL.; BERND, ML. **Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies.** *Environ Mol Mutagen* 2007;48(5):380–394.
- YIN, CC.; CORTES, J.; GALBINCEA, J.; *et al.* **Rapid clonal shifts in response to kinase inhibitor therapy in chronic myelogenous leukemia are identified by quantitation mutation assays.** *Cancer Sci* 2010;101(9):2005-2010.
- YOUSSEF, EM.; CHEN, XQ.; HIGUCHI, E.; *et al.* **Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers.** *Cancer Res* 2004;64(7):2411-2417.

ZANETTE, DL.; RIVADAVIA, F.; MOLFETTA, GA.; *et al.* **miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia.** Braz J Med Biol Res 2007;40(11):1435-1440.

ZHOU, B.; WANG, S.; MAYR, C.; *et al.* **MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely.** Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 7080–7085.

ZHU, H.; WU, H.; LIU, X.; *et al.* **Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells.** Biochem Pharmacol 2008;76(5):582-588.



## **ANEXO I**



Memo 33/11-CEP-INCA



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

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estado, 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

3



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 II**

## FICHA DE COLETA DE DADOS - GRUPO DE PESQUISA LMC

### DADOS GERAIS

Nome: \_\_\_\_\_ Matrícula: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

**Instituição:**

- INCA  HSRC-ES  
 HUCFF  HUAP  
 HUPE  OUTRO:  
 HUGG

**Sexo:**  Fem  Masc

**Raça:** \_\_\_\_\_

**Data de nascimento:** \_\_/\_\_/\_\_

**Data de diagnóstico:** \_\_/\_\_/\_\_

**Profissão:** \_\_\_\_\_

**Escolaridade:** \_\_\_\_\_

### EXAMES AO DIAGNÓSTICO

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Hemograma:**

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

**Mielograma:**

Blastos %	_____
Promielócitos %	_____

**Conclusão:** \_\_\_\_\_

### DADOS CLÍNICOS AO DIAGNÓSTICO

**Fase da doença:**  Fase Crônica  Fase Acelerada  Crise Blástica

**Baço palpável ao diagnóstico:**  Não  Sim

**Tamanho do baço à palpção:** \_\_\_\_\_ cm do RCE

### EXAMES ESPECÍFICOS AO DIAGNÓSTICO

**Citogenética:**  Sim  Não realizado

**Cromossomo Filadélfia:**  Não  Sim \_\_\_%  Sem mitose

**Rearranjo bcr-abl:**  Sim  Não realizado

Isoforma: ( ) b2a2 ( ) b3a2 ( ) b2a2/b3a2 ( ) e1a2

### TRATAMENTO E COMPLICAÇÕES

Usou Hydrea? ( ) Sim ( ) Não Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Usou INF? ( ) Sim ( ) Não Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

Quimioterapia? ( ) Sim ( ) Não Qual medicamento? \_\_\_\_\_

Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

Fez TMO? ( ) Sim ( ) Não Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Tipó: ( ) Aparentado ( ) Não-aparentado

Recaída do TMO? ( ) Sim ( ) Não Manejo/Tratamento pós recaída: \_\_\_\_\_

Usou Imatinibe? ( ) Sim ( ) Não

Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_mg/dia

Usou Dasatinibe? ( ) Sim ( ) Não Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

Usou Nilotinibe? ( ) Sim ( ) Não Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

### DADOS ESPECÍFICOS AO INÍCIO DO IMATINIBE

Fase da doença: ( ) Fase Crônica ( ) Fase Acelerada ( ) Crise Blática

Baço palpável: ( ) Não ( ) Sim

Tamanho do baço à palpação: \_\_\_\_\_cm do RCE

#### Hemograma:

Hemácias \_\_\_\_\_

Hemoglobina \_\_\_\_\_

Leucócitos \_\_\_\_\_

Blastos % \_\_\_\_\_

Bastões % \_\_\_\_\_

Eosinófilos % \_\_\_\_\_

Basófilos % \_\_\_\_\_

Plaquetas \_\_\_\_\_

#### Mielograma:

Blastos % \_\_\_\_\_

Promielócitos % \_\_\_\_\_

Conclusão: \_\_\_\_\_

**Citognética:** ( ) Sim ( ) Não realizado

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

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

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

Fim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

Reinício: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ mg Fim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Reinício: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ mg Fim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Reinício: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ mg Fim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Reinício: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ mg Fim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

Suspensão definitiva: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Motivo da suspensão: \_\_\_\_\_

**Resposta Hematológica Completa:** ( ) Sim ( ) Não Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Citogenética (Cg):**

**Cg aos 3 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 6 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 9 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 12 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 15 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 18 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 21 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg aos 24 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Cg >24 meses:** ( ) Sim \_\_\_% ph+ ( ) Não Realizado ( ) Sem Mitose Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**Biologia Molecular (BioMol):**

**BioMol aos 3 meses:** ( ) Sim ( ) Não realizado ( ) Não amplificou Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Se sim:

( ) Multi + ( ) Multi - ( ) Nested + ( ) Nested - Isoforma: \_\_\_\_\_ Quantitativo: \_\_\_\_\_

**BioMol aos 6 meses:** ( ) Sim ( ) Não realizado ( ) Não amplificou Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Se sim:

( ) Multi + ( ) Multi - ( ) Nested + ( ) Nested - Isoforma: \_\_\_\_\_ Quantitativo: \_\_\_\_\_

**BioMol aos 9 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol aos 12 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol aos 15 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol aos 18 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol aos 21 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol aos 24 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

**BioMol > 24 meses:**  Sim  Não realizado  Não amplificou Data \_\_/\_\_/\_\_

Se sim:

Multi +  Multi -  Nested +  Nested - Isoforma: \_\_ Quantitativo: \_\_

## **FOLLOW UP**

Ocorreu transformação leucêmica?  Não  Sim

FA  CB Data: \_\_/\_\_/\_\_

Análise de mutação:  Sim  Não

Data da análise: \_\_/\_\_/\_\_ Mutação:  Sim  Não Tipo: \_\_\_\_\_

Última consulta: \_\_/\_\_/\_\_

Em uso de: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ mg

Óbito:  Sim  Não Data: \_\_/\_\_/\_\_ Motivo: \_\_\_\_\_

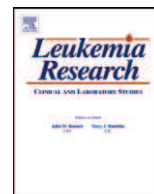


## **ANEXO III**

**Centros colaboradores monitoramento de pacientes com LMC em uso de ITKs**

<b>Centro</b>	<b>Médico Responsável</b>
CTO / Petrópolis	Dra Cristina Fraga
Hospital Univ. de Juiz de Fora	Dr Angelo Atalla
HUCFF-UFRJ	Dra Luciana Britto
HUAP-UFF	Dr Adelmo H Daumas Dra Mônica Praxedes
Hospital Naval Marcilio Dias	Dra Marianne Landau
Hospital da Lagoa	Dr Fernando Monterio
Hospital de Jacarepaguá	Dra Rita Espariz
Hospital Univ. GAFFREE-GUILE (UNIRIO)	Dra Marilza C. Magalhães
HSE (Hospital dos Servidores)	Dr Gustavo A Rezende
HUPE-UERJ	Dra Cristiana Solza
Hospital Aeronáutica (HFAG)	Dra Carla Lyrio
HUCAM	Dr Marcos Pretti
Santa Casa de Misericórdia	Dr Bruno Terra
Hospital Geral de Bonsucesso	Dr Yung Gonzaga
IPPMG-UFRJ	Dra Ana Paula Bueno
Hospital Evangélico - Vitória	Dr Marcos Daniel
Beneficência Portuguesa de Campos	Dra Cristiane Cunha

## **ANEXO IV**



## Commentary

## miRNA-451: A putative predictor marker of Imatinib therapy response in chronic myeloid leukemia

Vanessa Scholl\*, Rocio Hassan, Ilana Renault Zalcborg

Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer-INCA, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 August 2011

Received in revised form 23 August 2011

Accepted 28 August 2011

Available online 25 September 2011

## Keywords:

Chronic myeloid leukemia

MicroRNA-451

Imatinib resistance

In a recent issue of *Leukemia Research*, Lopotová et al. [1] suggest the existence of a reciprocal regulatory loop between BCR-ABL and microRNA-451 (miR-451) as a maintenance mechanism of the leukemic state of CML cells. The authors also report that down regulation of miR-451 might be inversely related to BCR-ABL kinase activity in chronic myeloid leukemia (CML) cells. MiRNAs are non-coding RNAs of 21–25 nucleotides that have been implicated in a number of biological processes, regulating gene expression by promoting mRNA degradation or repressing its translation. Aberrant miRNA expression has been described for a variety of solid tumors and hematological malignancies, including CML. Some miRNAs, as for example miR-150, miR-151, miR-10a and miR-96 were seen aberrantly expressed in purified CD34+ population and total leukocytes from peripheral blood of CML patients [2]. The role of miRNAs in CML resistance has not been thus far fully evaluated. By real-time PCR Lopotová et al. [1] investigated miR-451 expression in samples of CML patients treated with Imatinib (IM) at the time of diagnosis ( $n = 14$ ), in major molecular response (MMR;  $n = 14$ ), in hematological relapse ( $n = 17$ ) and in suboptimal response to IM ( $n = 7$ ) and found miR-451 down regulated in most of the diagnosis and hematological relapse samples in contrast with normal or slightly increased levels observed in MMR and suboptimal response samples.

Our preliminary results of miRNA expression profile arrays of CML samples confirm and extend these observations. With the aim to identify a potential mature miRNA expression signature associated with IM resistance, a retrospective study of 17 IM treated chronic phase (CP) CML Ph+ patients classified according to the European LeukemiaNet recommended response criteria was performed. Ten patients were characterized as optimal IM-Responders (achievement of complete cytogenetic response, CCyR, within 12 months of IM 400 mg/day) and 7 as IM-Resistant patients. Six of the 7 IM-Resistant patients harbored 100% Ph+ cells at 6 months of IM therapy or >35% Ph+ cells after 12 months of IM, and one patient lost an achieved CCyR after 5 months. The studied patients had a median overall follow-up of 55 months (range 33–112), and at least 18 months of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy. The IM-Responders sustained a stable CCyR after a median 45 months of IM usage (range 32–87) and median follow-up of 30 months (range 24–79) after CCyR achievement. All IM-Resistant patients underwent second-generation TKI therapy (2GTKI), with Dasatinib. In addition to the 17 diagnostic samples, 8 sequential samples of 4 IM-Resistant patients (pt 12, 13, 15 and 16) serially collected during TKI treatment were studied (Table 1). A pool of total leukocytes from 5 healthy donors was used as a control for miRNA expression array data. Total RNA was isolated from peripheral blood by lysis procedure in Trizol® (Invitrogen, Carlsbad) and RT reaction was performed using Megaplex™ RT primers Human Pools A v2.1 (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. MiRNAs expression profile of every sample was performed using the TaqMan Low Density Array (TLDA) Human MicroRNA Arrays v2.0 (A) (Applied Biosystems) using RNU48 as endogen control, in an ABI 7900HT platform. Statistical analysis was performed with GenEx Enterprise software (MultiD Analyses AB, Sweden).

\* Corresponding author at: Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Praça da Cruz Vermelha 23, 6° Andar, CEP 20230-130, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 3207 1506; fax: +55 21 3207 1217.

E-mail address: [vscholl@inca.gov.br](mailto:vscholl@inca.gov.br) (V. Scholl).

**Table 1**  
Fold change expression of miRNA-451 in the studied samples.

IM-Responder vs. IM-Resistant (diagnosis samples relative to healthy donors)				Sequential analyzed patients			
IM-Responders Patient	FC	IM-Resistant Patient	FC	Patient	Sample	FC (Sample vs. Hd)	FC (Sample vs. Dx)
1	0.804	11	-5.866	12	12.1	-4.91	-4.82
2	1.287	12	-4.910		12.2	0.03	0.12
3	4.723	13	-7.143		12.3	2.13	2.22
4	0.451	14	-0.021	13	13.1	-7.14	-6.90
5	3.187	15	-1.927		13.2	1.11	1.30
6	-1.497	16	-7.497		13.3	-0.68	-0.49
7	4.980	17	-6.882		13.4	3.36	3.55
8	3.453			15	15.1	-1.92	-1.72
9	4.701				15.2	-1.06	-0.86
10	1.882			16	16.1	-7.49	-6.70
					16.2	0.25	1.05
					16.3	1.67	2.46
Mean	2.397		-4.892				
P value	Unpaired <i>t</i> -test (2-sided)		0.00002	P value	Paired <i>t</i> -test (2-sided)	Dx vs. Resp	0.02
	Benjamini-Hochberg correction		0.0001			Dx vs. NoResp/Relap	0.05
						Resp vs. NoResp/Relap	0.30

IM: Imatinib; FC: fold change value; Hd: healthy donor; Dx: diagnosis samples; Resp: samples with 0%Ph; NoResp/Relap: samples with 100%Ph.

Our preliminary analysis showed that miRNA-451 was down regulated in the diagnostic samples of the IM-Resistant group when compared with the IM-Responder group ( $p=0.00002$  unpaired *t*-test 2-sided, Benjamini-Hochberg correction  $p=0.0001$ ) (Fig. 1A and Table 1). Because CML patients with CCyR might present heterogeneity in respect of their molecular responses during TKI therapy, we analyzed the miR-451 expression among our 10 CCyR patients discriminated according to their achievement of molecular responses. Four patients achieved CCyR associated to a complete molecular response (undetectable BCR-ABL transcripts by RT-qPCR and nested PCR techniques  $10^{-5}$ ), 3 patients with CCyR associated to a MMR or  $\leq 0.1\%$  BCR-ABL International Scale (IS) values and 3 patients with CCyR associated to 1–0.1% BCR-ABL<sup>IS</sup> values. No significant differences in the miRNA-451 expression were observed between patients with CCyR when discriminated by the depth of their molecular responses ( $p=0.11$ , 0.14 and 0.95, respectively). This suggests that the predictive value of miR-451 levels at diagnosis in respect to the achievement of a CCyR with IM therapy is not extended to the molecular level.

Samples of resistant patients were also examined for the presence of mutations in the kinase domain of BCR-ABL by direct sequencing. G250E and M351T mutations were detected in 2 patients at the time of resistance but not in the diagnostic samples. Patient 14 harbored the G250E mutation, described as intermediate resistance to IM by in vitro assays [3]. After changing to a 2GTKI therapy, the patient achieved a CCyR after 5 months of treatment. Interestingly, miR-451 expression levels of this patient at diagnosis were very close to the healthy donor levels (Table 1). Conversely, patient 17 presented the IM-sensitive M351T mutation. This patient progressed to accelerated phase and died, not responding to 2GTKI therapy. Worth noticing, in the latter patient miR-451 expression levels at diagnosis were very low when compared to healthy donor levels (Table 1). These observations strengthen the multifactorial nature of TKI resistance in CML and reinforce the potential use of the miR-451 expression level at diagnosis as a predictive parameter of TKI response.

In 4 resistant patients (pts. 12, 13, 15 and 16) follow-up samples were available for sequential miRNAs expression analysis, allowing us to assess miRNAs expression variation during the course of CML TKI treatment. In addition to the 4 diagnostic samples, 8 sequential samples were grouped for analyses according response status and TKI treatment as follows: 1 sample at IM-Response, 3 samples at IM-No-Response status, 1 sample at IM-CyRelapse, 2 samples at Dasatinib-Response and 1 sample at Dasatinib-No-Response. Two different data analyses were performed. As a first

approach, expression data of the healthy donor pool was used as a calibrator to compare the miRNA-451 expression in diagnosis and follow-up samples (Fig. 1B). This analysis showed that miR-451 is down regulated in most of the diagnostic samples in contrast with the increased levels observed in TKI therapy response samples. However, such correlation was less evident in the Non-response samples/IM-CyRelapse, where miRNA-451 expression was still high ( $p=0.02$ ,  $p=0.05$  and  $p=0.3$ , paired *t*-test 2-sided) (Fig. 1B and Table 1). These results are in full agreement with the data published by Lopotová et al. [1]. To further extend these results, miR-451 expression of each individual patient during TKI therapy follow-up samples at different response status were compared with the diagnostic sample of the respective patient (Fig 1C–F). In agreement with the putative model of a regulating loop between BCR-ABL and miRNA-451, in cases 15 and 13 the relationship between miR-451 expression and BCR-ABL<sup>IS</sup> levels were inversely correlated (Fig. 1C and D). In contrast, cases 12 and 16 showed increased miR-451 expression compared with their own diagnosis levels despite the presence of high number of Ph<sup>+</sup> cells and/or BCR-ABL<sup>IS</sup> transcripts. This was observed during IM therapy and also in different Dasatinib response situation in both patients (Fig. 1E and F). To our knowledge, this is the first report of miR-451 expression analysis in sequential samples from single CML patients, which also have a relatively long follow-up. Despite the limitations owing to the small sample size, our data suggest that besides BCR-ABL, others mediators may be involved in the regulation of miR-451 expression during CML TKI treatment.

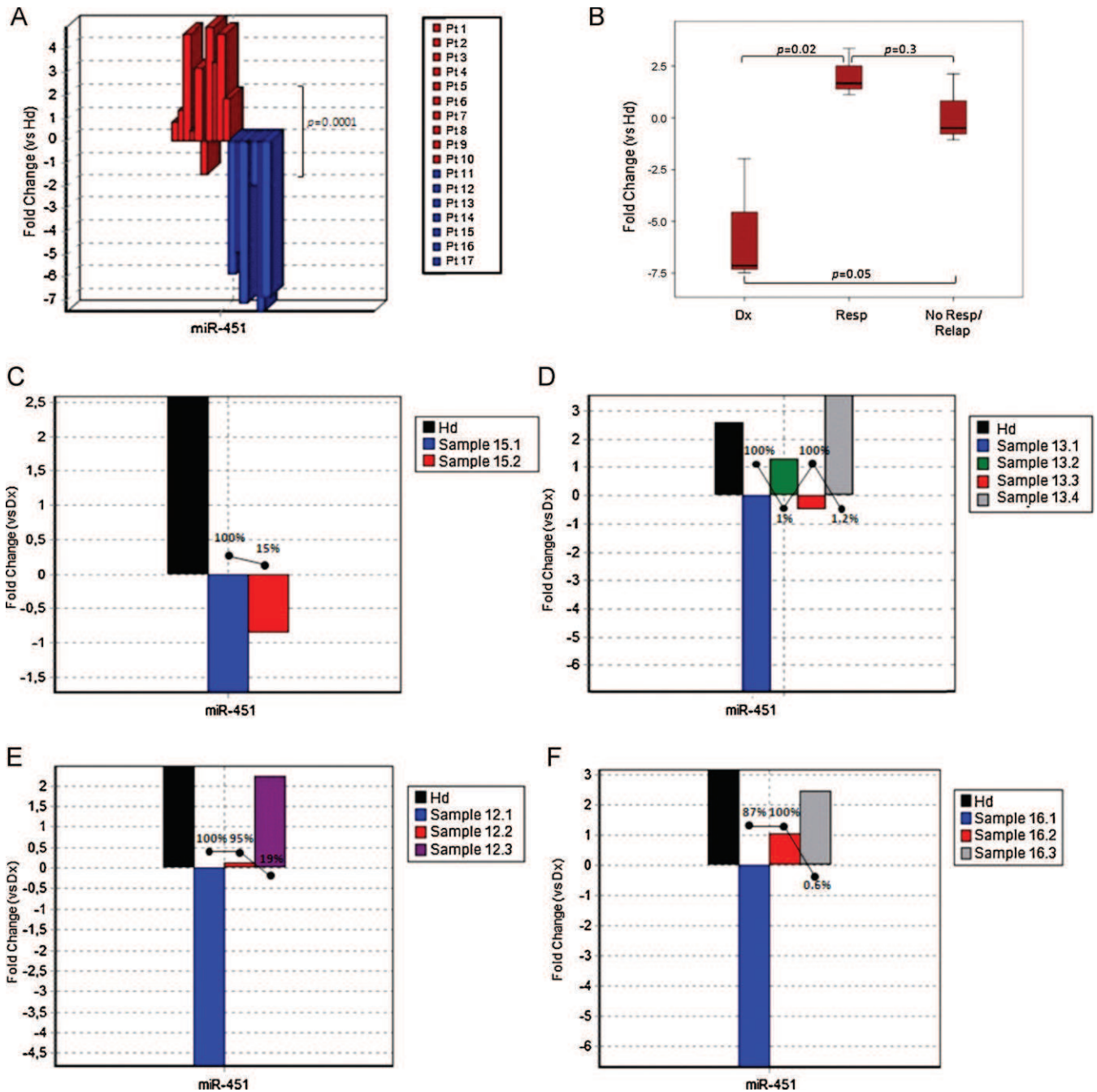
All together, our results confirm the reported inverse correlation between BCR-ABL and miR-451 levels, and introduce new data supporting the idea that miR-451 expression levels at diagnosis are correlated with response to IM therapy. Also, our data contribute to the notion of the complexity of the mechanisms underlying TKI therapy resistance in CML, and to a better comprehension of the dynamics of miR-451 expression during TKI treatment, thus reinforcing a putative role of miRNAs in the resistant phenotype.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interests.

#### Acknowledgements

*Contributions.* V.S. designed the study and performed experiments. R.H. and V.S. performed statistical analysis. I.R.Z. designed



**Fig. 1.** Expression of miRNA-451 in studied samples. (A) miR-451 expression in diagnostic samples of IM-Responders vs. IM-Resistant patients. Results are presented as expression fold change of a patient to a healthy control (Hd) according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. (B) Box-plot of miR-451 expression profile during CML therapy of 4 patients. Dx: diagnosis samples; Resp: samples with 0%Ph; NoResp/Relap: samples with 100% Ph. (C–F) Expression profile of miR-451 during CML course of each individual patient. Bars: Black: healthy donor sample; Blue: diagnosis sample; Green: IM-Response sample (0%Ph with 1% BCR-ABL<sup>S</sup>); Red: IM-No-Response or IM-CyRelapse samples (100%Ph and >10% BCR-ABL<sup>S</sup>); Grey: Dasatinib-Response samples (0%Ph with 0.6–1.2% BCR-ABL<sup>S</sup>); Purple: Dasatinib-No-Response sample (100%Ph and >10% BCR-ABL<sup>S</sup>). (C) Patient 15, (D) patient 13, (E) patient 12, and (F) patient 16. Black dots show the BCR-ABL<sup>S</sup> measured by real-time PCR.

the study and evaluated clinical data. All authors wrote the comment.

**Role of the funding source.** This work was supported by the Brazilian public agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-PPSUS) and INCT para Controle do Câncer (Grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E26/170.026/2008). The funding sources have had no involvement neither in the study design, collection, analysis and interpretation of data, nor in the writing of the manuscript or in the decision to submit the manuscript for publication.

**References**

- [1] Lopotová T, Záčková M, Klamová H, Moravcová J. MicroRNA-451 in chronic myeloid leukemia: miR-451-BCR-ABL regulatory loop? *Leuk Res* 2011;35(7):974–7.
- [2] Agirre X, Velasco A, San José-Enériz E, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res* 2008;6(12):1830–40.
- [3] O’Hare T, Eide CA, Deininger MW. BCR-ABL domain mutations, drug resistance and the road to a cure of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110(7):2242–9.

## The significance of major and stable molecular responses in chronic myeloid leukemia in the tyrosine kinase inhibitor era

Ilana Zalcberg Renault<sup>1</sup>

Vanessa Scholl<sup>1</sup>

Rocio Hassan<sup>1</sup>

Paola Capelletti<sup>1</sup>

Marcos de Lima<sup>2</sup>

Jorge Cortes<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Center – CEMO, Instituto Nacional de Câncer – INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> MD Anderson Cancer Center – MDACC, Houston, Texas, USA

*Tyrosine kinase inhibitors have changed the management and outcomes of chronic myeloid leukemia patients. Quantitative polymerase chain reaction is used to monitor molecular responses to tyrosine kinase inhibitors. Molecular monitoring represents the most sensitive tool to judge chronic myeloid leukemia disease course and allows early detection of relapse. Evidence of achieving molecular response is important for several reasons: 1. early molecular response is associated with major molecular response rates at 18-24 months; 2. patients achieving major molecular response are less likely to lose their complete cytogenetic response; 3. a durable, stable major molecular response is associated with increased progression-free survival. However, standardization of molecular techniques is still challenging.*

**Keywords:** Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive; Cytogenetic; Monitoring; Mutation; Polymerase chain reaction

### Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is most frequently diagnosed in the chronic phase (CP) and, if left untreated, the disease will progress to the accelerated phase (AP) and, eventually within 3-5 years, to the terminal blast phase (BP).

CML is characterized by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, which creates the *BCR-ABL* fusion gene. Breakpoints in the *ABL* gene are often upstream of exon 2 (*ABL* a2 fusion type) and rarely downstream of exon 2 (*ABL* a3). Breakpoints in the *BCR* gene are more variable; the most frequent are downstream of either exon 13 or exon 14 (e13 and e14 previously referred to as exons b2 and b3), leading to e13a2 or e14a2 mRNA fusion subtypes, respectively. These isoforms are found in approximately 98% of CML patients and are referred to as the major *BCR-ABL* fusion subtype. Both *BCR-ABL* mRNA molecules encode a 210 KDa constitutively active kinase protein, which is essential for leukemic transformation in CML. Most *BCR-ABL* breakpoints in CML patients are accounted by a variety of fusions, which involve *BCR* exons 6, 8 or 19 (e6a2, e8a2 or e19a2) and *ABL* exon 3 (e13a3 or e14a3), which encodes the p210 KDa protein. Less than 1% of CML show a breakpoint downstream of *BCR* exon 1 (e1a2) resulting in an mRNA fusion encoding the p190 KDa oncoprotein.<sup>(1)</sup>

### International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial and European Leukemia Net criteria to monitor response in chronic myeloid leukemia

CML treatment was revolutionized by the advent of imatinib mesylate (IM), a tyrosine kinase inhibitor (TKI).<sup>(2)</sup> IM has become the treatment of choice for newly diagnosed patients in CP-CML based on the results of the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial and confirmed by the recent 8-year update.<sup>(3,4)</sup> However, whilst the vast majority of newly diagnosed CP-CML patients in the IRIS trial treated with IM have a sustained benefit at 8 years, many patients do not reach what is considered an optimal response. Approximately 35% of CML patients initially treated with IM fail due to refractoriness (primary resistance), loss of response after an initial response (secondary resistance), or intolerance.<sup>(5)</sup> In addition, 12-33% of patients meet criteria for suboptimal response at any given time.<sup>(6)</sup> Unless the disease can be controlled with further therapy, these individuals invariably progress to the blastic phase that is usually terminal. With the aim of improving the results of IM therapy, second-generation TKIs, Dasatinib and Nilotinib, have been introduced to treat patients with IM resistance

Conflict-of-interest disclosure:  
The authors declare no competing financial interest

Submitted: 9/24/2011  
Accepted: 9/29/2011

#### Corresponding author:

Ilana Zalcberg Renault  
Molecular Biology Laboratory  
Bone Marrow Transplantation Center – CEMO  
Instituto Nacional de Câncer – INCA  
Praça Cruz Vermelha 23, 6<sup>o</sup> floor  
20230-130 – Rio de Janeiro, RJ, Brazil  
Phone: 55 21 3207 1506  
zalcberg@inca.gov.br

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20110122



or intolerance. To date, their use in Brazil is limited mainly to these situations.

The effectiveness of TKIs is evaluated by cytogenetic and molecular responses at defined time-points. In this scenario, tumor burden reflected by these responses is a predictive parameter of individual response to TKIs and is considered the main biomarker to test the efficacy of new drugs in clinical studies. The concepts that the therapeutic benefit of a TKI can be predicted by the speed of reduction in tumor burden (the number of Philadelphia<sup>+</sup> or *BCR-ABL*<sup>+</sup> cells) and that disease response is the major parameter for estimating the probability of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), are now well established. Conversely, acquisition of additional abnormalities is associated with resistance.

Achievement of complete cytogenetic response (CCyR) has remained the gold standard for an optimal outcome in CML because it is associated with an improved probability of survival.<sup>(7)</sup> After achievement of CCyR, the main parameter for response assessment, is the molecular response (MR), measured by the reduction in *BCR-ABL* transcripts using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and classified according to a uniform scale referred to as the International Reporting Scale (IS) that is valid for any patient and attributes an absolute value of 0.1% to a 3 log reduction from a hypothetical 100% *BCR-ABL* value at diagnosis.<sup>(8)</sup>

### Molecular biology for *BCR-ABL* monitoring: measuring *BCR-ABL* transcripts

The IS resulted from recent effort to create an international standard, where laboratory-specific values of the *BCR-ABL*/constitutive gene for each patient sample obtained by RT-qPCR are converted to an IS score applying a derived laboratory-specific correction factor validated by a reference laboratory.<sup>(8,9)</sup> According to the recommendations of the European Leukemia Net (ELN), optimal responders should achieve a major molecular response (MMR), a  $\leq 0.1\%$  value on the IS, by 18 months of therapy.

Reaching a proficient approach to reliably monitor molecular responses in *BCR-ABL*<sup>+</sup> patients requires several steps, including the standardization of a stable and controlled assay according to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments (MIQE) guidelines,<sup>(10)</sup> the internal validation in a clinical setting, and international validation with a reference laboratory, in order to obtain a correction factor to convert *BCR-ABL* levels according to the IS. This process, including the different levels of validation based on the experience of the Molecular Biology laboratory at the Instituto Nacional de Câncer (INCA), is shown in Figure 1. Since 2006, 661 patients with CML treated at INCA and 18 centers throughout Brazil were investigated and successfully monitored.

The work flow for CML molecular monitoring in our laboratory starts with the definition of the *BCR-ABL* transcript type by a qualitative multiplex assay in pre-treatment samples.<sup>(11)</sup> This procedure is performed to assure that RT-qPCR monitoring will target the correct fusion type and false negative results occurring due to the presence of atypical transcripts (fusions involving exon 6 BCR e6a2, e8a2, e19a2 and exon 3 ABL e13a3 or e14a3 fusions) not contemplated in the quantitative assay will be safely excluded.<sup>(12,13)</sup> If the fusion subtype is not identified by qualitative polymerase chain reaction (PCR) prior to starting treatment, qRT-PCR false negative results cannot be excluded.

Molecular responses are assessed by absolute quantification via RT-qPCR assays at diagnosis and then approximately every 3 months, independently on the type of cytogenetic response of the patient. A multiplex RT-qPCR, including hydrolysis probes and primers for both e13a2 and e14a2 transcripts, is run with ABL as the control gene. For absolute quantification purposes, every RT-qPCR run includes standard curves prepared using plasmids, as well as "low" and "high" copy quality controls, as recommended (Figure 1).<sup>(14)</sup>

Each *BCR-ABL/ABL* value is converted to the IS applying our laboratory-specific conversion factor which was validated by the Australian Molecular Laboratory at Adelaide. For this, a significant number of samples, including patients in various disease phases, were tested at different times using different RT-qPCR runs, both in the INCA laboratory and at the validating center in Adelaide.

*BCR-ABL* transcripts are undetectable with the reference molecular methodology at a sensibility of 4.5 log. Definition of a complete molecular response (CMR) requires an undetectable *BCR-ABL* transcript level by RT-qPCR confirmed by negative nested-PCR, where the lowest limit of detection is  $10^{-5}$ .

Thus, molecular responses are reported according to *BCR-ABL* transcript levels as compared to a standardized baseline used as an IS. MMR is a 3-log reduction from the baseline or the absolute value of  $\leq 0.1\%$  on the IS. Accordingly, a 2-log reduction ranges from 1% to 0.1% in the IS; a 1-log reduction from 10% to 1% in the IS and non-significant reduction is equivalent to values of more than 10% in the IS.

The adoption of these laboratory procedures has overcome the clinician's lack of confidence in molecular test interpretation related to differences in protocols that can result in greatly varying end-points. This was important for several reasons as it: (i) provides an early tool to predict patient response; (ii) allows the use of *BCR-ABL/ABL* values to guide clinical decisions; (iii) facilitates patient mobility between different clinical facilities and (iv) facilitates interpretation of clinical research among different reference centers in the world, since MMR is the primary end-point of various clinical trials of ABL-inhibitors.



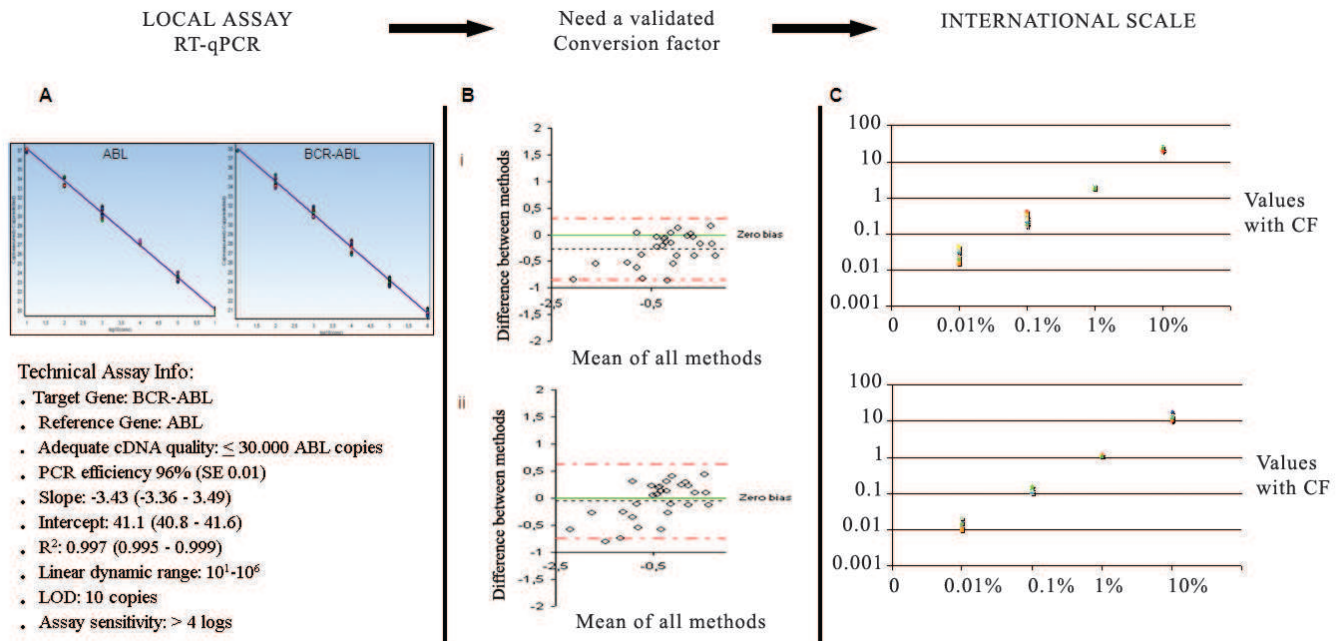


Figure 1— Standardization and validation levels for proficient chronic myeloid leukemia molecular monitoring

The work-flow for chronic myeloid leukemia (CML) molecular monitoring in our laboratory starts with the definition of BCR-ABL transcript type by qualitative multiplex assay in pre-treatment samples.

A: Standardization of a stable and controlled absolute quantification assay according to Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines. Plasmid standards with a BCR-ABL insert are prepared twice annually by sub-cloning an original plasmid kindly provided by Dr. NCP Cross. Multiplex reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) with hydrolysis probes and primers for both e13a2 and e14a2 transcripts are run with ABL as the control gene. The same plasmid is used to quantify BCR-ABL and ABL, which should control any variation in plasmid quantification efficiency. Standard curves are prepared to cover a dynamic range of  $10^6$ - $10^1$ , and the assay limit of detection is 10. Together with the standards, in each RT-qPCR assay a NTC (non-template control, with DNA sample), NAC (non-amplification control, with a negative BCR-ABL cDNA), Blank (only reaction buffer) and "low" and "high" copy quality controls are included. The quality control stocks are prepared with cell dilutions of K562 and Kasumi cell lines. The RT-qPCR results are considered reliable if the ABL copy number is  $\geq 30,000$  and RT-qPCR negativity is defined as undetectable BCR-ABL transcripts only when a sample meets acceptable criteria for the ABL copy number. Definition of a complete molecular response (CMR) requires an undetectable BCR-ABL transcript level by RT-qPCR confirmed by negative nested-polymerase chain reaction (PCR), whose lowest limit of detection is  $10^{-5}$ .

B: Conversion factor (CF) calculation and validation. Each BCR-ABL/ABL value is converted to the IS applying our derived laboratory-specific CF as validated by the Australian Molecular Laboratory at Adelaide. For that, an expressive number of samples, including patients in various disease phases, were tested in parallel at INCA laboratory and at the validating Center at Adelaide. Bias plot of the data generated at INCA for calculation of the CF (i) and the same data with converted validation data (ii). If there were no difference in the estimated mean bias, the dotted line would be at 0, thus, the CF was the antilog of the mean bias. The CF was validated by subsequent sample exchange.

C: The plots show an example of how the application of our CF reduces coefficient of variation in 70 of our samples at the specific values of 0.01%, 0.1%, 1% and 10%.

What is the importance of MMR after complete cytogenetic response?

As most CML patients treated with a TKI will reach a CCyR, quantification of residual BCR-ABL transcripts by RT-qPCR is the only available tool to further monitor response kinetics. It is assumed that the amount of BCR-ABL transcripts mirrors the number of residual BCR-ABL Ph+ cells. A close agreement between the absolute value of BCR-ABL transcripts given as 1% in the IS and a CCyR can be demonstrated.<sup>(8)</sup> The ELN recently updated its recommendations to standardize treatment for patients with CML.<sup>(15)</sup> It recommends that a patient should be seen as an optimal responder to IM when a CCyR is achieved within the first 12 months of treatment. Attainment of a MMR within 18 months is associated with an improved probability of prolonged event-free survival. Conversely, failure to achieve MMR at 18 months is regarded as a suboptimal response. The time required for a patient to reach a CCyR and

a MMR is considered an early predictor of therapeutic response with a direct correlation with clinical outcome.

However, clinical trials do not necessarily reproduce "real" clinical practice. While most randomized clinical studies in the world were carried out with newly diagnosed CP-CML patients, our experience was built on the responses of patients treated with IM as second-line therapy after treatment with interferon-alpha because Brazil public health care centers were not allowed to use IM as front-line therapy until 2008. Thus, a late responder group, compared to the ELN recommendations for CP-CML patients treated with first-line IM, was identified. Late responder patients represented approximately 40% of the patients that did not achieve optimal responses. Attainment of CCyR at any time was associated with a better OS. The results of this study show that an early predictor marker able to discriminate between the competing possibilities of achieving an optimum response versus progression is still missing.

The group of patients with CCyR was heterogeneous, consisting of those who had CCyR associated to MMR or not. The individual value of MMR was demonstrated in several studies.<sup>(16-20)</sup> A recent work established an association between MMR and losing CCyR. After 18 months of IM treatment, the probability of losing CCyR when associated to MMR was 0% compared to 25% for patients with a CCyR but no MMR.<sup>(21)</sup> Patients who achieve MMR at 6, 12 or 18 months after initiating IM treatment have a probabilities of 93%, 69% and 37%, respectively, to evolve with a lasting CCyR.<sup>(22)</sup> Thus, achievement (and speed to achieve) MMR is a predictive factor for a durable CCyR. Rapidity in obtaining a MMR correlates with a higher probability of achieving a CMR. Patients achieving a MMR at 9 months have a 93% of probability of evolving towards a CMR. Also, achievement of a MMR within 12 months of starting the IM regimen was associated with a better PFS.<sup>(17,18)</sup> However, other studies have not confirmed significant differences in OS and PFS in CCyR responders in respect to the level of molecular response achieved.<sup>(23)</sup> The additive effect of MMR associated to CCyR highlights the importance of a better understanding of the role of duration, extension and stability of a MMR in respect to clinical evolution.

Once achieved, does the major molecular response become more stable over time?

Besides the prognostic value of an early MMR, whether a stable MMR occurring during the course of a stable CCyR is an additive parameter to predict a better clinical evolution is a matter of discussion. A stable molecular response is associated with a lasting CCyR.<sup>(24)</sup> MMR has been subdivided as stable (persistent MMR), unstable (occasionally less than MMR) and never reached MMR. A significant difference was observed, in terms of duration of CCyR and PFS between patients with stable versus unstable MMR and patients who never reached MMR. After a long follow-up from the first assessment of a cytogenetic response, 96% of patients with stable MMR maintain a CCyR compared with 79% of patients with unstable molecular response. Similar results were reported by the MD Anderson Cancer Center (MDACC) group of 276 CML patients treated with high-dose IM therapy; a durable and stable MMR (continuous MMR lasting for a period > 12 months) was associated with a longer PFS.

### What is the meaning of fluctuating *BCR-ABL* levels?

Clinicians should be aware of inherent assay variations within a laboratory. Therefore, values may fluctuate, but without clinical significance, on occasions. What constitutes a significant change varies between laboratories. Different patterns of molecular responses based in fluctuations of *BCR-ABL* levels have been reported in the

literature. Molecular monitoring may allow early recognition of acquired resistance. Increasing levels of *BCR-ABL* transcripts or suboptimal molecular responses (fluctuations at high *BCR-ABL* levels, i.e. 10%-1% on the IS at 18 months) are associated with increased risk of resistance due to mutations and loss of CCyR. In our experience, an increase of the *BCR-ABL* load to higher than 1% on any occasion is correlated with a loss of CCyR. In contrast, fluctuations at low *BCR-ABL* levels of from  $\leq 0.1\%$  IS values to undetectable levels, were associated with maintenance of the molecular response. Whether the stability and clinical value of an absolute clearance of *BCR-ABL*<sup>+</sup> cells as detected by the most sensitive methodology (4.5 log by RT-qPCR) is the same as fluctuations of *BCR-ABL* at lower levels is still to be seen.

Are molecular remissions all the same?

MMR comprises those patients with tumor burden decreases to the range of 0.1% - 0.001% on the IS. The latter (MMR  $\leq 0.001\%$ ) includes patients with undetectable levels by the most sensitive techniques available today (Nested-PCR and RT-qPCR) which are controversially classified as CMR. This difference between MMR and CMR is important because there is still a debate regarding the possibility of stopping IM in patients with a stable CMR. A French study showed that half of the patients who achieved and maintained CMR for a period of 2 years remained in CMR after IM discontinuation.<sup>(25)</sup> The primary endpoint of the Stop Imatinib Trial (STIM study) is the evaluation of the persistence of molecular remission after IM discontinuation. Although 50% of patients who suspended IM are reported in CMR, the discontinuation of the drug is not recommended outside clinical trials.

Resistance to tyrosine kinase inhibitors

Selection or evolution of resistant clones is a major cause of treatment failure in targeted therapy for CML. The most common identified cause of resistance in TKI-treated patients is the acquisition of point mutations in the tyrosine kinase domain of *BCR-ABL* that could (i) interfere with binding of IM to the ATP pocket;<sup>(26)</sup> (ii) prevent the adoption of the conformation required for optimal TKI binding or (iii) stabilize the enzyme in a conformation that is inaccessible to the action of TKI.

Mutation analysis remains an important tool in TKI resistance assessment. The current recommendation for mutation analysis is on IM failure or suboptimal response. The latter includes failure to achieve a CHR or cytogenetic response (CyR) (95% Ph<sup>+</sup>) by 3 months; major cytogenetic response (MCyR) by 6 months; CCyR by 12 months, and MMR by 18 months. Among these parameters, the association between MMR at 18 months and acquisition of a resistant phenotype due to a point mutation in the *BCR-ABL* kinase domain is the least well defined.

Among the cohort of 661 patients in this study, 125 were retrospectively selected for mutation analyses using direct sequencing, according to their timing of cytogenetic and molecular response achievement and extent of molecular response. Point mutations involving 17 different amino acids were detected in 25 patients. A double mutation was observed in three patients. Table 1 depicts position and frequency of *BCR-ABL* mutations found in IM treated patients. No published report of the V268M mutation was found in the literature.

Table 1 - *BCR-ABL* mutations detected in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients, selected according to cytogenetic and molecular parameters

<i>BCR-ABL</i> mutation	Location	N <sup>o</sup> of patients carrying the mutation	Frequency (%) <sup>#</sup>
M244V	-	1	4
G250E	p-loop	2	8
Y253H	p-loop	2	8
E255K	p-loop	3	12
V268M	-	1	4
L298V	-	1	4
T315I	Contact site	4	16
F317L	Contact site	3	12
M351T	kinase domain	1	4
E355G	kinase domain	1	4
F359V	kinase domain	3	12
E450G	-	1	4
E453A	-	1	4
E456K	-	1	4
M458V	-	1	4
F486S	-	2	8

<sup>#</sup>Twenty-five patients were positive for *BCR-ABL* mutations; the frequency is higher than 100% as three patients in the same sample had two mutations

Different increments in *BCR-ABL* levels (2 fold, 0.5-log and 1-log) assessed in at least two different samples were defined as parameters for mutation screening. Screening for mutant variants of *BCR-ABL* is frequently performed by Sanger's direct sequencing. The sensitivity of this method is of approximately 10-20% of total *BCR-ABL*<sup>+</sup> cells; this sensitivity is assumed to be effective for detecting and characterizing mutations throughout the kinase domain.

There may be a role for more sensitive mutation analysis, particularly when considering the lack of TKI effectiveness against T315I mutated clones<sup>(27)</sup> and when considering therapeutic options after IM resistance. However this has not yet been established. Due to the existence of different mechanisms accounting for the resistant phenotype, different point mutations will differentially impact specific TKIs. Mutation analysis is always recommended before changing to another inhibitor after resistance. The use of dasatinib will be preferred for CML patients resistant to IM carrying a Y253H, E255V/K or F359C/V mutation, while

nilotinib should be indicated in the presence of the V299L or F317L mutations.<sup>(28,29)</sup> To date, the T315I mutation confers resistance to all available TKIs.

## Conclusions

Detection of biomarkers that allow early prediction of response to TKIs is a major challenge. In an era of targeted TKI therapy, the key point is to select the appropriate agent at the appropriate juncture for each patient, with the aim of achieving long-term, durable responses with minimal toxicity. The rapidity of responses obtained by 2<sup>nd</sup> generation TKIs as compared to IM will most likely modify the management of patients with newly diagnosed CP-CML, but economic factors may influence treatment decisions.

## Acknowledgement

Role of the funding source: This work was supported by the Brazilian public agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ-PPSUS) and INCT para Controle do Câncer (Grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E26/170.026/2008). The funding sources have had no involvement neither in the study design, collection, analysis and interpretation of data; nor in the writing of the manuscript or in the decision to submit the manuscript for publication.

## References

- Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Davies A, Knight K., Watmough SJ, 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*. 2009;94(10):1362-7. Comment in: *Haematologica*. 2010;95(5):852-3.
- Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112(13):4808-17.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994-1004. Comment in: *Curr Hematol Rep*. 2004;3(1):37-8. *N Engl J Med*. 2003;348(11):1048-50. *Clin Lab Haematol*. 2005;27(6):416-7.
- Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *ASH Annual Meeting Abstracts 2009*;114:1126.
- Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, B J Druker, S Branford, L Foroni, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23(6):1054-61.
- Alvarado Y, Kantarjian H, O'Brien S, Faderl S, Borthakur G, Burger J, et al. Significance of suboptimal response to imatinib, as defined by the European LeukemiaNet, in the long-term outcome of patients with early chronic myeloid leukemia in chronic phase Cancer. 2009;115(16):3709-18
- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, Shan J, Giles FJ, Rios MB, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are



- associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*. 2003;97(4):1033-41.
8. Branford S. Chronic myeloid leukemia:molecular monitoring in clinical practice *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;376-83.
  9. Foroni L, Wilson G, Gerrard G, Mason J, Grimwade D, White HE, et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia *Br J Haematol*. 2011;153:179-90. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08603.x.
  10. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4):611-22. Comment in: *Clin Chem*. 2011 Jun;57(6):919-21.
  11. Otazú IB, Zalcborg I, Tabak DG, Dobbin J, Seuánez HN. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(1-2):205-11.
  12. Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Melo JV, Sick C, Berger U, et al. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1996;88(6):2236-40.
  13. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88(7):2375-84. Comment in: *Blood*. 1997;89(10):3889. Comment on: *Blood*. 1996;88(7):2410-4.
  14. Branford S, Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med*. 2006;125:69-92.
  15. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041-51. Comment in: *J Clin Oncol*. 2010;28(18):e310; author reply e311.
  16. Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, et al. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*. 2003; 17(9):1687-94.
  17. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Jones D, Luthra R, Shan J, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005;11(9):3425-32.
  18. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, Poerio A, Soverini S, Bassi S, Cilloni D, Bassan R, Breccia M, Lauria F, Izzo B, Merante S, Frassoni F, Paolini S, Montefusco E, Baccarani M, Martinelli G; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3037-42.
  19. Press RD, Galderisi C, Yang R, Rempfer C, Willis SG, Mauro MJ, et al. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clin Cancer Res*. 2007;13(20):6136-43.
  20. Palandri F, Iacobucci I, Soverini S, Castagnetti F, Poerio A, Testoni N, et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):1059-63.
  21. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, de Lavallade H, Reid AG, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*. 2008;112(12):4437-44.
  22. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, Shan J, Borthakur G, Thomas D, et al. Delayed achievement of cytogenetic and molecular response is associated with increased risk of progression among patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase receiving high-dose or standard-dose imatinib therapy. *Blood*. 2009;113(25):6315-21.
  23. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008;111(4):1774-80.
  24. Palandri F, Iacobucci I, Soverini S, Castagnetti F, Poerio A, Testoni N, et al. Treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with imatinib: importance of a stable molecular response. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):1059-63.
  25. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-35. Comment in: *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1010-1. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(3):127-8. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):118.
  26. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of BCR-ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;1:65(11):4500-5.
  27. Manrique G, Scholl V, Pérez V, Bittencourt R, Moellmann A, Hassan R, et al. Rapid and sensitive allele-specific (AS)-RT-PCR assay for detection of T315I mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine-kinase inhibitors. *Clin Exp Med*. 2011;11(1):55-9.
  28. La Rosée P, Deininger M. Resistance to Imatinib: Mutations and Beyond *Semin Hematol*. 2010;47(4):335-43.
  29. Branford S, Hughes T. Practical considerations for monitoring patients with chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2010;47(4):327-34.

## Rapid and sensitive allele-specific (AS)-RT-PCR assay for detection of T315I mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine-kinase inhibitors

Gonzalo Manrique Arechavaleta · Vanesa Scholl · Verónica Pérez · Roberta Bittencourt · Arthur Moellmann · Rocio Hassan · Héctor N. Seuánez · Jane Dobbin · Lem Martinez · Ilana Zalberg Renault · Rosario Uriarte

Received: 13 October 2009 / Accepted: 23 April 2010 / Published online: 29 May 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Point mutations in the kinase domain of BCR-ABL were described in 40–90% of patients with chronic myeloid leukemia (CML) resistant to Imatinib. We herein describe the development of a rapid allele-specific (AS)-RT-PCR assay to identify the T315I mutation, which confers full resistance to all available tyrosine-kinase inhibitors (TKI). The mutation status of 65 patients with resistant CML was evaluated, and the T315I was detected in 3/65 (4.6%). Comparisons between sequencing and AS-RT-PCR results, as well as serial dilutions experiments proved that the method is specific and reproducible, with maximum sensitivity of  $1 \times 10^{-3}$ . The developed assay is a convenient and easy tool to be used in research of CML resistance for rapid mutation screening and, together with sequencing, may be included in efficient strategies for early detection of TKI resistance in patients with CML.

**Keywords** Chronic myeloid leukemia · BCR-ABL · Kinase domain mutations · AS-RT-PCR

### Introduction

Treatment for patients with chronic myeloid leukemia (CML) has been greatly improved by the use of the BCR-ABL tyrosine-kinase inhibitors (TKI). However, relapse after an initial response is still a clinical problem [1]. Point mutations in the kinase domain (KD) of BCR-ABL were described in 40–90% of patients who relapse after initial response, constituting the most frequent mechanism of acquired resistance for TKI therapy [2]. More than 90 mutations at 57 residues were reported conferring different levels of resistance depending on their location and effect on the ABL KD conformation [3–5]. Since mutations are the major mechanism of TKI resistance, it is highly recommended to include a standard procedure for mutational analysis into the molecular follow-up of patients with CML treated with TKI.

Several methods have been described for mutation detection in the ABL KD. RT-PCR followed by direct sequencing of the KD is the most commonly used, exhibiting a sensitivity of 20%, which seems to correlate with clinical evolution and TKI resistance [6]. Allele-specific (AS)-PCR assay shows an increased sensitivity for detecting known mutations [7]. Early detection of the T315I mutation might be warranted due it is highly resistant to all available TKIs. We herein describe the development of a rapid, sensitive, and specific AS-RT-PCR assay to identify the T315I mutation. The mutation status of 65 patients with CML resistant to Imatinib (IM) was evaluated by the T315I AS-RT-PCR and confirmed by direct sequencing.

---

G. Manrique Arechavaleta · V. Pérez · L. Martinez · R. Uriarte (✉)  
Specialized Techniques Laboratory, Molecular Biology Division, Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Bvr. Artigas 1475, CP 11200, Montevideo, Uruguay  
e-mail: ruriarte@asesp.com.uy

V. Scholl · R. Bittencourt · R. Hassan · I. Z. Renault  
Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional De Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

A. Moellmann · J. Dobbin  
Hematology Service, INCA, Rio de Janeiro, Brazil

H. N. Seuánez  
Genetics Division, INCA, Rio de Janeiro, Brazil

## Materials and methods

### Patients and samples

Peripheral blood (PB) samples collected from 65 patients with CML (pts) resistant to IM were analyzed. Haematological, cytogenetic, and molecular responses were defined according to the European LeukemiaNet [8]. Lost of response to IM was defined as the loss of any best response. Loss of molecular response was scored after two consecutive analysis. Thirty-five patients were recruited from the Asociación Española Primera de Socorros Mutuos, Montevideo, Uruguay and the remaining 30 from INCA, Rio de Janeiro, Brazil. Additionally, we analyze PB samples of 15 non-resistant patients with CML and 10 patients with non-CML as a negative control group. The 15 patients with non-resistant CML were selected from a 250 CML BCR-ABL (+) RNA bio-bank and showed sustained complete cytogenetic response (CCyR) and major molecular response (MMR) for a minimum of 2 years. All samples were submitted to routine *BCR-ABL* quantitative and cytogenetics analyses, as described [9]. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutions Ethic's Committee.

### RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated with Trizol® (Invitrogen) after red cell lysis from 20 ml of PB. RNA concentration was assessed by spectrophotometry with ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). The cDNA synthesis was performed in duplicate from 2 µg of RNA, using random hexamers (Invitrogen) and Superscript™ II (Invitrogen) [10].

### T315 AS-PCR assay description

For the AS-PCR, three specific primers were used in the same reaction: two external (Abl-F and Abl-R) and a third (T315), specific for the mutation. Primer sequences were Abl-KF 5'-cgc aac aag ccc act gtc t-3', Abl-KR 5'-tcc act tcg tct gag ata ctg gat t-3' [11], and AS-T315 5'-cgt agtca tga act caa-3' [12].

The AS-PCR assay was performed in a single-step reaction with a total volume of 50 µL containing 10 pmol of Abl-F and T315 primers, 3 pmol of Abl-R, 1× PCR buffer (Invitrogen), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/l of each deoxynucleoside-5'-triphosphates, DMSO 6%, 1.5 U of *Platinum* Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 5 µl of cDNA. Cycling condition was 5 min at 94°C followed by 37 cycles of 30 s at 94°C, 40 s at 56.5°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. Cycling parameters were adapted to the 2720 Applied Biosystem

setting. PCR products were visualized under UV light by electrophoresis on a 2% (W/V) agarose gel stained with ethidium bromide. Controls included a known T315I carrier and the K562 cell line.

In a mutated case, two fragments could be seen in agarose gel: an 863-bp fragment corresponding to the entire ABL KD domain and another of 320 bp corresponding to the T315I mutation. In non-mutated cases, only the larger fragment was observed.

In order to assess the minimal detection level of the AS-RT-PCR assay, serial dilution experiments were performed in triplicate. Dilution curves (1/10, 1/100, 1/500, 1/1,000) of RNA from a patient with CML with the T315 I mutation and RNA from K562 cell line were constructed. The mixed RNAs were reverse-transcribed and subjected to T315-AS-PCR. To evaluate inter-assay variability, each dilution was examined in triplicate on three consecutive runs, the frequency of positive/negative result for every dilution point was recorded and the results were expressed as percentages.

### Direct sequencing

All samples were sequenced according to Branford et al. [11] and compared with the *ABL1* sequence (GenBank M14572, slightly modified). Sequence analysis was performed using the Mutation Surveyor software (Soft Genetics INC, State College, USA).

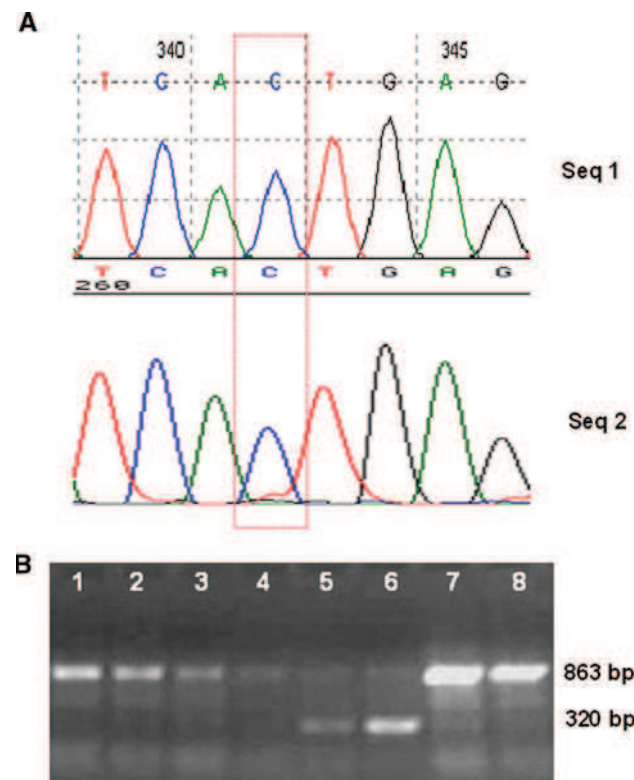
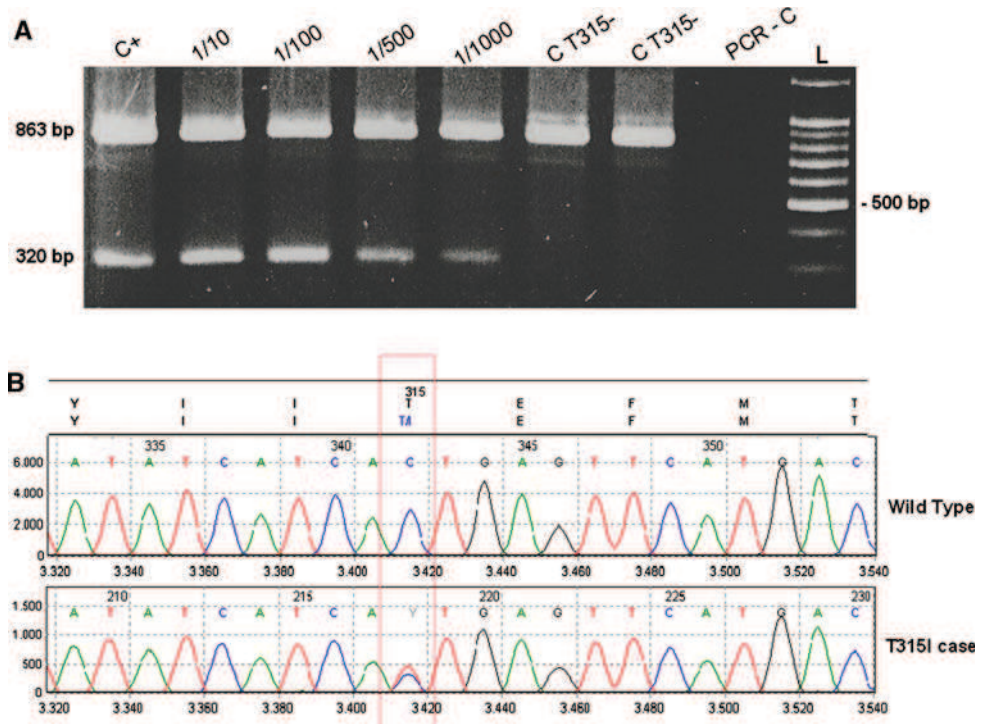
## Results

The development of a reliable and sensitive molecular test to detect low levels of T315I in a background of non-mutated cells was pursued based on PCR allele-specific amplification. The T315 I mutation was detected by AS-RT-PCR in 3/65 patients with TKI-resistant CML and in none of the control samples. In 2/3 positive cases, the T315I mutation was also detected by direct sequencing (Fig. 1). In the third patient, a first analysis by direct sequencing showed no mutation; reanalysis of this sequence allowed to identify the T315I mutation as a very small peak, previously scored as background (Fig. 2).

The choice of annealing temperature (AT) was critical to the success of the method, being 56.5°C the highest temperature at which the mutation-specific primer (T315) amplified a bright product from T315-positive cells. Annealing temperatures of 60°C or higher gave no product (failed), whereas AT of less than 55°C showed unspecific faint bands (false-positive) in the non-CML control group. The relative concentrations of the three primers did influence the relative intensity of the bands; with intensity of the mutation-specific band augmenting whenever the



**Fig. 1** AS-RT-PCR and direct sequencing for T315I detection. **a** Sensitivity assay for T315I AS-RT-PCR. In *lane 1* Positive control (C+) without dilution; *lanes 2–5* serial dilutions of C+/K562; *lanes 6 and 7* two CML samples BCR-ABL+/T315-; *lane 8* PCR negative control (PCR-C). *L* 100-bp ladder. **b** Direct sequencing of a T315I positive case. The *box* indicates the mutated base



**Fig. 2** Patient with T315I detected by AS-RT-PCR. **a** Reanalysis of direct sequencing of the case AS-RT-PCR T315I+/sequencing negative. The *box* indicates the very small peak previously scored as background. **b** AS-RT-PCR T315I assay. *Lanes 1–4* patients with CML negative for T315I mutation; *line 5* case positive for T315I scored negative by direct sequencing; *lane 6* positive control for T315I mutation; *lane 7–8*: negative control for T315I mutation

forward primer concentration was increased in relation to the reverse primer. Specificity was further enhanced by the addition of DMSO into the reaction, without decreasing the sensitivity of the method. Assessment of the minimal detection level of the AS-RT-PCR performed on serial dilutions experiments showed that the T315I mutation was detectable to a level of  $10^{-3}$  (Fig. 1). The 1/1,000 dilution gave positive results in 78% of the assays (conf. Int 95% = 0.40–0.97), the 1/500 dilution gave positive results in 89% (conf. Int 95% = 0.51–0.99), the dilutions 1/100, 1/10, and the control without dilution gave positive results in 100% of cases.

Regarding cytogenetics and molecular monitoring of TKI-resistant patients with CML, Ph chromosome in more than 80% of metaphases was a common pattern to all of them. All patients presented *BCR-ABL/ABL* ratios  $\geq 1$ , scored according to the International Scale (IS).

In patients harboring the T315I mutation, hematologic relapse occurred after a median of 2 months after the collection of mutated samples, followed by death due to disease recurrence. Retrospective analysis of two samples from one patient T315I (+), showed that the mutation could be detected (only by AS-RT-PCR and not by sequencing), 3 months before hematologic relapse; however, this mutation could not be detected in a sample taken 12 months earlier.

Direct sequencing of the ABL KD of the remaining 62 patients allowed to detect mutations in 11 patients: Y253H ( $n = 2$ ), E450A, G250E ( $n = 2$ ), E459 K ( $n = 2$ ), E450G, F317L ( $n = 2$ ), and E255 K. The T315I was not detected

in samples positive for other mutations. The global prevalence of mutations was 15/65 (23%), in agreement with previously published studies [6].

## Discussion

Identification of mutations in the BCR-ABL KD is important for the management of CML, since it is the most common mechanism of resistance to IM. In vitro studies showed that mutations differ in their level of resistance to IM and, among all described KD mutations, the T315I is the one that confers resistance to all available TKIs [13]. Although the presence of KD mutations has been described mainly in patients in advanced phase or loss of response, a recent report showed that KD mutations can be found in virtually all patients with CML at diagnosis when a high-sensitivity method is used [14]. Also, this work showed that most of the mutations at diagnosis are silent and do not confer growth advantage under the selective pressure of TKIs, so the authors warns against high-sensitivity mutation screening before the start of TKI therapy. However, the kinetics of the leukemic clone carrying the T315I mutation is not well understood. In one patient, we could only detect the mutation by AS-RT-PCR in a sample taken 3 months before the relapse, but not in the sample taken 12 months before. Therefore, for the T315I mutation, the use of a more sensitive method should be reevaluated, since it could be used for drawing a more tightly follow-up schedule allowing therapeutic choices to be made in a condition of low tumor load.

In this context, the developed T315 AS-RT-PCR assay is a convenient and easy tool to be used in a clinical routine laboratory for rapid screening for BCR-ABL T315I point mutation. The method proved sensitive, specific, and reproducible, with a limit of detection of  $1 \times 10^{-3}$ , which would allow detecting T315I with incipient increases in BCR-ABL levels. Also, no additional PCR was necessary to evaluate the cDNA quality, because the amplified fragment of 863 bp in the same reaction served as internal control. This, together with direct sequencing, constitutes a suitable approach for CML resistance monitoring and therapeutic choice.

**Acknowledgments** Work supported by an Uruguay/Brazil collaborative project CNPq/DINACYT (044/2005) and Swissbridge Foundation. IRZ thanks Novartis for educational and research grants in support of Molecular Biology Laboratory CEMO-INCA. GM thanks to MD. María Noel Zubillaga, B.Sc. Victoria Elizondo, B.Sc. Silvana Ifran, M.Sc. Mónica Cappetta and Susana Boschi by technical support. GM also thank Eng. Rafael Alonso for advice in statistics.

**Conflict of interest statement** The authors declare that they have no conflict of interest related to the publication of this manuscript.

## References

1. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, de Lavallade H, Reid AG, Foroni L, Rezvani K, Bua M, Dazzi F, Pavlu J, Klammer M, Kaeda JS, Goldman JM, Apperley JF (2008) European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 112:4437–4444
2. Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, Grigg A, Taylor K, Seymour JF, Durrant S, Browett P, Schwarzer AP, Arthur C, Catalano J, Leahy MF, Filshie R, Bradstock K, Herrmann R, Joske D, Lynch K, Hughes T (2004) Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 104:2926–2932
3. Branford S (2007) Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program Book* 376–383
4. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J (2008) Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 15:1774–1779
5. Milojkovic D, Apperley J (2008) State-of-the-art in the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Curr Opin Oncol* 20:112–121
6. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T (2003) 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* 102:276–283
7. Clayton SJ, Scott FM, Walker J, Callaghan K, Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK, Fox JC (2000) K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification. *Clin Chem* 46:1929–1938
8. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108:1809–1820
9. Scholl V, Bitencourt R, Pires V, Padilha T, Hassan R, Zalcberg IR (2008) Measurement of BCR-ABL transcripts in long-term allogeneic stem cell transplantation CML patients by real-time quantitative PCR (RQ-PCR). *Haematologica* 93(S1):540–541
10. Otazú IB, Zalcberg I, Tabak DG, Dobbin J, Seuánez HN (2000) Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders. *Leuk Lymphoma* 37:205–211
11. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, Hughes TP (2002) High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99:2475–2478
12. Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, Stoffregen EP, McWeeny S, Kovacs I, Park B, Druker BJ, Deininger MW (2005) High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 106:2128–2137



13. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW (2007) Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110:2242–2249
14. Soverini S, Poerio A, Vitale A, Gnani A, Colarossi S, Castagnetti F, Iacobucci I, Lonetti A, Palandri F, Rosti G, Amabile M, Paolini S, Papayannidis C, Gugliotta G, Vignetti M, Mandelli F, Baccarani M, Foà R, Martinelli G (2009) At the time of diagnosis, Ph + cells from both chronic phase myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia patients already harbour BCR-ABL kinase domain mutations. *Haematologica* 94(suppl.2):212 (abs. 0526)