Luciana Nardinelli

Acompanhamento molecular de pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de resistência ao tratamento: mutação do gene *BCR-ABL* e expressão dos genes *MDR1* e *BCRP*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Hematologia

Orientador: Dr. Israel Bendit

São Paulo

2008

Aos meus pais, Roberto e Claudette, que sempre estiveram presentes em minha vida e são exemplos de otimismo e perseverança.

Ao meu marido, José Roberto pela infinita paciência comigo, pelo apoio ao meu desejo de retomar a carreira acadêmica e acima de tudo por seu amor.

Aos meus filhos, Roberta e Enzo que fizeram despertar o amor mais profundo e verdadeiro em mim, o amor incondicional.

Ao meu orientador, Dr. Israel Bendit, cujo trabalho e interesse pela ciência tornaram o Laboratório de Biologia Tumoral uma referência. Agradeço pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

À Mafalda que abriu as portas do Laboratório de Biologia Tumoral para mim, me ensinou toda a rotina e, sempre com muita disposição e alegria, divide sua sabedoria e amizade.

À equipe do Laboratório de Biologia Tumoral, Toninho, Regiane, Denise, Patrícia, Cecília, Juliana, Lilian e Roseli que sempre estiveram dispostos a me ajudar para que este trabalho fosse realizado.

À equipe do Laboratório de Citogenética, Dra Monika, Dra Elvira, Cristina, Patrícia, Leandro e Tiago, pois sem eles parte deste estudo não teria sido realizada.

À equipe de enfermeiras do Hospital Dia, que sempre forneceu as amostras e informações necessárias para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 História da LMC	2
1.2 Fases da LMC	4
1.3 Epidemiologia	6
1.4 Etiologia	7
1.5 Sinais e Sintomas	8
1.6 Achados Laboratoriais	8
1.6.1 Sangue Periférico	8
1.6.2 Medula Óssea	10
1.7 O Cromossomo Philadelphia	10

1.7.1 Gene <i>BCR</i>	11
1.7.2 Gene <i>ABL</i>	11
1.7.3 Gene Híbrido <i>BCR-ABL</i>	12
1.8 Vias de Sinalização Ativadas pela Proteína BCR-ABL	14
1.8.1 Alteração da Adesão ao Estroma da Medular e Matriz Extracelular	14
1.8.2 Ativação Mitogênica	16
1.8.2.1 Via Jak-Stat	16
1.8.2.2 Via de Sinalização Ras	17
1.8.3 Inibição da Apoptose	17
1.8.3.1 Via PI3K-AKT	17
1.9 O Tratamento da LMC	19
1.10 O Mesilato de Imatinibe	21
1.11 Farmacologia Clínica do Mesilato de Imatinibe	23
1.11.1 Mecanismo de Ação	23
1.11.2 Propriedades Físico-Químicas	24
1.11.3 Farmacocinética	24
1.11.4 Efeitos Adversos	25

1.11.5 Estudos Clínicos Fase I e II	26
1.11.6 Estudo IRIS	27
1.12 Mecanismos de Resistência	29
1.12.1 Mecanismos Independentes de <i>BCR-ABL</i>	32
1.12.1.1 α 1-Glicoproteína Ácida	32
1.12.1.2 Genes de Resistência a Múltiplas Drogas	32
1.12.1.2.1 Gene <i>MDR1</i> (<i>ABCB1</i>).....	33
1.12.1.2.2 Gene <i>BCRP</i> (<i>ABCG2</i>).....	34
1.12.2 Mecanismos Dependentes de <i>BCR-ABL</i>	35
1.12.2.1 Amplificação de <i>BCR-ABL</i>	35
1.12.2.2 Mutações do Domínio Quinase do Gene <i>ABL</i>	35
2. OBJETIVOS	40
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	42
3.1 Casuística	42
3.2 Métodos	44
3.2.1 Extração de RNA	44
3.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	45

3.2.3 PCR Qualitativa para Pesquisa da Quebra Fusão <i>BCR-ABL</i>	46
3.2.4 Curva Padrão Para Quantificação do Transcrito <i>BCR-ABL</i>	47
3.2.5 Purificação do Plasmídeo	49
3.2.6 Digestão do Plasmídeo	50
3.2.7 Quantificação do DNA do Plasmídeo	51
3.2.8 RT-PCR em Tempo Real para Quantificação do Transcrito <i>BCR-ABL</i>	52
3.2.9 RT-PCR em Tempo Real para Quantificação Relativa dos Genes <i>MDR1</i> e <i>BCR</i>	55
3.2.10 Seqüenciamento Direto do Domínio Quinase do Gene <i>ABL</i>	57
3.2.11 ASO-PCR para Pesquisa da Mutação T315I	60
3.12 Análise Estatística.....	61
4. RESULTADOS	63
4.1 RT-PCR para Pesquisa da Fusão <i>BCR-ABL</i>	63
4.2 Seqüenciamento Direto do Domínio Quinase Do Gene <i>ABL</i>	64
4.3 ASO-PCR para Pesquisa da Mutação T315I em amostras pré-tratamento.....	66

4.4 Avaliação Expressão Relativa dos Genes <i>MDR1</i> e <i>BCRP</i> em amostras pré-tratamento	67
4.5 Acompanhamento Mensal do Número de Transcritos <i>BCR-ABL</i>	70
5. DISCUSSÃO.....	73
6.CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS.....	81
8.ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Cariótipo [46XY, t(9;22)(q34;q11)] de um paciente com LMC Philadelphia positiva. **B.** Ilustração esquemática da translocação t(9;22)..... 3

Figura 2: Estrutura dos genes *BCR*, *ABL* e do gene quimérico *BCR-ABL*. Os pontos de quebra dos genes *ABL* e *BCR* estão indicados. Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são o gene e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2 13

Figura 3: Principais vias de sinalização da proteína BCR-ABL. A proteína CRKL, um dos principais substratos da BCR-ABL está relacionada às alterações de adesão de células hematopoiéticas ao estroma e matriz medular. O PI3K está relacionado ao mecanismo antiapoptótico mediado pela proteína BCR-ABL e a proteína Ras modula proliferação celular regulando a atividade de várias proteínas reguladoras de ciclo celular e fatores de transcrição..... 19

Figura 4. Desenvolvimento do MI a partir de uma estrutura 2-fenilaminopirimidina (em branco). (A) A atividade em ensaios celulares foi ampliada pela introdução de um grupo 3' piridil (amarelo) na posição 3' da pirimidina. (B) A atividade sobre tirosina quinase foi aumentada pela adição de um grupo benzamida (laranja) ao anel fenil. (C) A ligação de um grupo metil (verde) na posição orto ao anel diaminofenil reduziu a atividade sobre PKC. (D) A adição de N-metilpiperazina (rosa) aumentou a solubilidade em água a biodisponibilidade via oral.Estrutura química do mesilato de imatinibe..... 23

Figura 5. Mapa das mutações do domínio quinase associadas à resistência clínica ao imatinibe. P, P-loop; B, sítio de ligação do imatinibe; C, domínio catalítico; A, activation loop. Amino ácidos em verde indicam mutações detectadas em 2-10% e em vermelho em mais de 10% dos pacientes com mutações..... 37

Figura 6. Foto de gel de agarose 8% para avaliação da integridade do RNA. As bandas 28S e 18S que indicam a integridade do RNA estão indicadas pelas setas... 45

Figura 7: Curva padrão utilizada para a quantificação do transcrito BCR-ABL e do gene interno BCR com intervalos de 1log, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias para cada um dos genes..... 51

Figura 8. Foto de gel de agarose 2% para visualização dos produtos de PCR para a pesquisa da quebra do transcrito *BCR-ABL*. O produto de 417 bp corresponde à quebra b3a2 (b3) e o de 342 bp à b2a2 (b2). As amostras A1 e A3 foram negativas. B: branco ou ausência de amostra. C-: controle negativo. M: marcador de 100bp... 63

Figura 9. Visualização do produto da 1ª fase da PCR para amplificação do domínio quinase do gene *BCR-ABL* com 1530 bp. M: marcador de 100bp. B: branco ou ausência de amostra. C-: controle negativo. A: amostra..... 64

Figura 10. Visualização do produto da 2ª fase da PCR para amplificação do domínio quinase do gene *BCR-ABL* com 863 bp. M: marcador de 100bp. A: amostra. C-: controle negativo. B: branco ou ausência de amostra..... 65

Figura 11. Eletroferograma da mutação Q252H. A troca de um nucleotídeo guanina (G - em preto) por uma timina (T - em vermelho) resulta na troca de um aminoácido glutanina por uma histidina..... 65

Figura 12. Eletroferograma da mutação G250E. Presença de dupla população guanina e adenina que confere a troca de uma glicina por um ácido glutâmico. 66

Figura 13. Curva de dissociação da ASO-PCR realizada para pesquisa de mutação T315I em amostras pré-tratamento. Pico máximo de fluorescência entre 85 e 90°C. As amostras foram consideradas positivas quando amplificadas na mesma temperatura de dissociação do controle positivo (C+)...... 67

Figura 14. Gráfico da expressão do gene *MDR1* ao diagnóstico do grupo atingiu a RCC aos 12 meses, com mediana de 0,26 e do grupo resistente, com mediana de 0,41..... 69

Figura 15. Gráfico da expressão do gene *BCRP* ao diagnóstico do grupo que atingiu RCC aos 12 meses, com mediana de 0,32 e do grupo resistente, com mediana de 0,20..... 69

Figura16. Probabilidade de se atingir a RMM em relação a redução de *BCR-ABL* aos 3 meses de tratamento..... 70

Figura 17. Gráfico de monitorização do número de transcritos *BCR-ABL* de um paciente que responde ao tratamento com mesilato de imatinibe..... 71

Figura 18. Gráfico de monitorização de número de transcritos *BCR-ABL* de um paciente que não responde ao tratamento com mesilato de imatinibe..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de classificação de resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe.....	28
Tabela 2. Definição de resposta ótima ao tratamento com imatinibe.....	29
Tabela 3. Definição de falha e resposta subótima para pacientes com LMC fase crônica precoce tratados imatinibe 400mg diários.....	31
Tabela 4. Características do grupo de pacientes incluídos no estudo: N (número de pacientes de cada grupo), sexo, idade média, fase da doença e intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento com mesilato de imatinibe.....	43
Tabela 5. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR qualitativa para pesquisa da quebra da fusão <i>BCR-ABL</i>	47
Tabela 6. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real	53
Tabela 7. Sequência das sondas utilizadas na PCR em tempo real	53
Tabela 8. Valores de <i>BCR-ABL</i> da escala internacional.....	54
Tabela 9. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo da expressão dos genes <i>MDR1</i> e <i>BCRP</i>	57
Tabela 10. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no seqüenciamento do domínio quinase do gene <i>ABL</i>	58
Tabela 11. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na ASO-PCR.....	60

Tabela 12. Mediana da expressão dos genes <i>MDR1</i> e <i>BCRP</i> ao diagnóstico de pacientes respondedores e resistentes.....	68
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	“ATP Binding Cassette”
ABL	Abelson
ASO-PCR	PCR-alelo específica
BCRP	“Breast Cancer Related Protein”
BCR	“Breakpoint Cluster Region”
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
IFN α	Alfa Interferon
IRIS	“International Randomized Study of Interferon versus STI571”
JAK	“Janus Kinase”
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MDR1	“Multidrug Resistance Gene”
MI	Mesilato de Imatinibe
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfoinositol 3-fosfato Quinase
PKC	Proteína Quinase C
RCC	Resposta Citogenética Completa
RCH	Resposta Hematológica Competa
RMM	Resposta Molecular Completa
RNA	Ácido ribonucléico
STAT	Proteína Transdutora de Sinal e Ativadora de Transcrição

RESUMO

Nardinelli, L. Acompanhamento molecular de pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com mesilato de imatinibe e avaliação dos mecanismos de resistência ao tratamento: mutação do gene *BCR-ABL* e expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela translocação (9;22) que dá origem ao gene quimérico *BCR-ABL*. Este gene codifica uma proteína com atividade tirosina quinase, p210, constitutivamente ativa. Os três mecanismos envolvidos na patogênese da LMC são o aumento da proliferação celular, alteração da adesão celular ao estroma e matriz medular e inibição da apoptose. A introdução do mesilato de imatinibe (MI), um inibidor de tirosina quinase, revolucionou o tratamento da LMC levando pacientes em fase crônica a remissões duráveis, porém uma parcela destes não responde ou perde a resposta ao longo do tratamento. Os mecanismos de resistência ao MI podem ser classificados como independentes de *BCR-ABL* ($\alpha 1$ -glicoproteína ácida e genes de resistência a múltiplas drogas) ou dependentes de *BCR-ABL* (superexpressão de *BCR-ABL* e mutações do domínio quinase do gene *ABL*). **Objetivo:** avaliar a presença de mutações no domínio quinase do gene *ABL* e a expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas *MDR1* e *BCRP* em amostras pré-tratamento com MI, acompanhar estes pacientes mensalmente através da quantificação de transcritos *BCR-ABL* e quando ocorrer resistência reavaliar a presença de mutações do domínio quinase do *ABL* e a expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas. **Material e Métodos:** Foram avaliados 61 pacientes com LMC em fase crônica. A pesquisa de mutações do domínio quinase foi realizada pela técnica de seqüenciamento direto e a expressão relativa dos genes de resistência a múltiplas drogas foi avaliada por PCR em tempo real. A quantificação absoluta do número de transcritos *BCR-ABL* foi realizada pela técnica de PCR em tempo real utilizando-se o sistema Taqman de sondas de hibridização. **Resultados:** Nas amostras pré-tratamento dos 61 pacientes estudados não foram detectadas mutações. Quando relacionamos o aumento da expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* à resposta citogenética completa aos 12 meses de tratamento não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Quanto ao número de transcritos *BCR-ABL*, observamos que os pacientes que apresentaram menos de 1% pela escala internacional aos 3 meses de tratamento atingiram a RMM em período menor (7 meses) do que os que apresentaram mais de 1% (12 meses) com diferença estatística significativa ($p = 0,03$). **Conclusões:** As mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL* nas amostras pré-tratamento não foram detectadas ou pela sensibilidade da técnica de seqüenciamento direto (10%) ou porque tais mutações são mais freqüentes nas fases acelerada e blástica. A expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas (*MDR1*

e *BCRP*) em pacientes com LMC-FC ao diagnóstico não apresentou correlação com o aparecimento de resistência secundária ao MI. Além disso a quantificação mensal dos transcritos *BCR-ABL* aos 3 meses pode ser considerada um marcador com valor prognóstico

Descritores: leucemia mielógena crônica BCR-ABL positiva, cromossomo Filadélfia, proteínas tirosina quinases, resistência a medicamentos, mutação, transportadores de cassete de ligação de ATP, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.

SUMMARY

Nardinelli, L. Molecular monitoring of patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate and evaluation of treatment resistance mechanisms: mutation of *BCR-ABL* and expression of *MDR1* and *BCRP* genes [dissertation]. Faculdade de Medicina, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2008.

Chronic myeloid leukemia is characterized by t(9;22) translocation. The chimeric gene *BCR-ABL* encodes a p210^{BCRABL} protein with constitutive tyrosine kinase activity which is directly related to CML pathogenesis. The imatinib mesylate, a tyrosine kinase inhibitor, is the first-choice treatment for patients in chronic phase but some patients show primary resistance or relapse after initial response. The mechanisms of resistance to the imatinib mesylate treatment are *BCR-ABL* dependent (amplification of *BCR-ABL* and mutation of kinase domain of *BCR-ABL*) or independent of *BCR-ABL* (α 1-acid glycoprotein and expression of multidrug resistance genes). **Objective:** The objective of this work was to evaluate the mechanisms of resistance (kinase domain mutation and *MDR1* and *BCRP* genes expression) to imatinib mesylate in pretreatment samples, quantify of *BCR-ABL* transcript on a monthly follow up plan, and to re-evaluate the mechanisms of resistance in the absence or loss of treatment response. **Patients and Methods:** We have evaluated 61 pretreatment samples derived from chronic phase CML patients. The number of *BCR-ABL* transcripts was quantified by RTQ-PCR with taqman probes and *MDR1* and *BCRP* expression were evaluated by RTQ-PCR with Syber Green. Mutations within the *BCR-ABL* kinase domain were screened by direct sequencing and we also have screened the T315I mutation in pretreatment samples by allele-specific PCR. **Results:** We detected no mutations in the 61 pretreatment samples. The correlation analysis between the expression of *MDR1/BCRP* genes and the cytogenetic response at 12 months of treatment revealed no significant statistical difference ($p = > 0.05$). The results of *BCR-ABL* quantification in the follow up of our cohort indicated that patients who had transcripts $<1\%$ by the international scale at 3 months of therapy are more likely to achieve rapid MMR (median of 7 months) than those who had $>1\%$ (median of 12 months) ($p = 0,03$). **Conclusions:** As expected, the kinase domain mutations of *BCR-ABL* in pretreatment samples of CML chronic phase patients are not detectable by direct sequencing because of the sensitivity of the assay (10%) and also because these mutations are more common in accelerated phase and blast crisis. About the expression of multidrug resistance genes *MDR1* and *BCRP*, they showed no correlation with secondary resistance to imatinib mesylate. And finally the number of *BCR-ABL* transcripts at 3 months of treatment can be considered a marker with prognostic value.

Descriptors: Leukemia, myelogenous, chronic, BCR-ABL positive, Philadelphia chromosome, protein – tyrosine kinases, drug resistance, mutation, ATP-binding cassette transporters, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal que resulta da transformação neoplástica de células hematopoiéticas primitivas.

Quase todas as doenças malignas, independente do tipo, surgem como resultado de uma série de mutações em uma célula progenitora que causa a perda do controle do crescimento, diferenciação e de apoptose, resultando em uma transformação maligna. A lista e sequência de mutações comumente identificados em um determinado tipo de câncer parecem variar bastante entre pacientes diagnosticados com um mesmo tipo de câncer. Isso faz com que o diagnóstico e prognóstico baseado nas anormalidades genéticas sejam difíceis para a maioria das doenças malignas, entretanto há exceções para este modelo e uma delas é a LMC, na qual uma única mutação é suficiente para produzir a transformação leucêmica total. O mesilato de imatinibe (MI), um inibidor da atividade tirosina quinase do BCR-ABL revolucionou o tratamento desta doença e é recomendado como tratamento de primeira linha para LMC em fase crônica.

A resistência ao MI quando administrado como tratamento de primeira linha para pacientes com LMC em fase crônica, embora incomum, ocorre em cerca de 16% dos pacientes durante os primeiros 4 anos de acompanhamento. As causas moleculares de resistência foram bem estabelecidas nos últimos anos e dentre os principais mecanismos podemos citar as mutações pontuais do domínio quinase da proteína quimérica BCR-ABL e aumento da expressão de genes responsáveis pelo efluxo de drogas da célula.

1.1 HISTÓRIA DA LMC

Casos de pacientes com sintomas semelhantes aos da LMC são descritos na literatura francesa desde 1825, porém as primeiras descrições científicas desta doença datam de 1845 e são creditadas a John Hughes Bennett, na Escócia, e Robert Virchow, na Alemanha. Após autópsia, eles descreveram pacientes com aumento do tamanho do baço, anemia severa e grande número de leucócitos no sangue. A princípio, Bennett sugeriu uma septicemia como explicação, mas Virchow argumentou contra a teoria da supuração como causa. Casos adicionais foram descritos por Craige e em 1847 Virchow introduziu a designação *weisses blut* e *leukämie*, mas este termo não encontrou aprovação universal e assim, Bennett propôs o termo *leucocytaemia* que inclusive se tornou título de uma revisão de 37 casos publicada como livro em 1852. Em 1878, Neumann propôs que a medula óssea não era apenas o sítio de produção de células sanguíneas normais, mas também era o sítio no qual a leucemia tinha origem e utilizou o termo *myelogene leukemia* (Geary, 2000). Embora a LMC tenha sido reconhecida como uma forma distinta de leucemia já em meados do século 19, o grande avanço para o melhor entendimento desta patologia ocorreu na década de 60 com a descrição, por Nowell e Hungerford, de uma anormalidade cromossômica presente nas células de pacientes com LMC que ficou conhecida como cromossomo *Philadelphia* (Ph¹ ou Ph) (Nowell, 1960). Eles notaram que pacientes com LMC apresentavam uma aparente perda do braço longo do cromossomo 22. Esta observação levou a uma nova abordagem do diagnóstico da doença e passou a ser um marcador no estudo da patogênese da LMC e o foco para estudos futuros da patologia molecular da doença. Em 1967, Philip Fialkow, baseado

em experimentos de polimorfismos da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), estabeleceu a clonalidade da LMC (Tefferi, 2007). Já na década de 70 com o uso de técnicas mais sensíveis de bandejamento cromossômico, Rowley descreveu que a aparente perda de material cromossômico do cromossomo 22 era parte de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, caracterizando assim a t(9;22) (Rowley,1973).

Na década de 80, foi descrita a fusão BCR/ABL e que esta resultava na transcrição de uma proteína funcional. Esta nova oncoproteína, p210^{BCR-ABL} diferia da proteína c-ABL endógena tanto na localização subcelular como na atividade tirosina quinase (Groffen et al,1984). Finalmente, em 1990, Daley apresentou a primeira evidência da habilidade da proteína BCR-ABL em transformar células mielóides primárias e induzir uma doença semelhante à LMC em camundongos (Daley et al, 1990).

Figura 1: A: cariótipo [46XY, t(9;22)(q34;q11)] de um paciente com LMC Ph-positiva. B: Ilustração esquemática da translocação (9;22). (Deininger & Druker, 2003).

1.2 FASES DA LMC

A LMC segue um curso de 2 ou 3 fases clínicas que se inicia na fase crônica e progride para a fase acelerada e depois para a fase terminal denominada de crise blástica (Randolph, 2005a).

Geralmente a doença é diagnosticada na fase crônica em mais de 80% dos pacientes (Cortes, 2004) e a sobrevida média é de 35 a 65 meses desde que as contagens de granulócitos e plaquetas sejam mantidas sob controle com quimioterapia (Hehlmann et al, 1993). Durante esta fase da doença ocorre uma grande expansão do compartimento de células granulocíticas, mas as células ainda retêm a capacidade de diferenciação e as funções também se encontram normais. Os sintomas na fase crônica geralmente são moderados e muitos pacientes são assintomáticos (Cervantes et al, 1999). Entre os pacientes sintomáticos, fadiga, perda de peso, inchaço abdominal, sangramento e sudorese são comuns. Púrpura e esplenomegalia são achados freqüentes no exame físico. Leucocitose, anemia e trombocitose são achados laboratoriais típicos (Savage, 1997). Após uma média de 4 a 5 anos, a doença progride para a fase acelerada, caracterizada pelo surgimento de células mais imaturas no sangue periférico, sintomas constitucionais mais freqüentes e uma resposta menos favorável a terapias (Deininger & Druker, 2003).

A fase acelerada é uma transição gradual para a fase blástica, com duração de aproximadamente 3 a 18 meses e cerca de 15% dos pacientes apresentam esta fase. Os critérios para definição da fase acelerada não são universais e de acordo com o critério utilizado parte dos pacientes diagnosticados como fase crônica pode ser

reclassificada como fase acelerada (Faderl et al,1999). A evolução clonal (EC) é um critério para fase acelerada comum entre as classificações existentes e pode ocorrer entre 20% e 40% dos pacientes. As anormalidade cromossômicas mais comuns associadas à EC são a trissomia do 8, um segundo cromossomo Ph, o isocromossomo 17, trissomia do 19, perda do cromossomo Y, trissomia do 21 e monossomia do 7 (Johansson et al, 2002). Os sintomas sistêmicos como leucocitose e hepatoesplenomegalia, que anteriormente eram bem controlados com tratamento medicamentoso, tornam-se resistentes à terapêutica e se exacerbam. Nesta fase, o hemograma demonstra aumento do número de mieloblastos, basófilos e eosinófilos, assim como o aparecimento ou agravamento da anemia e plaquetopenia. A sobrevida dos pacientes na fase acelerada é de 1 a 2 anos (Cortes, 2004).

A terceira fase é denominada de crise blástica e é caracterizada pela presença de mais de 30% de blastos no sangue periférico ou medula óssea ou ainda, pela presença da doença blástica extramedular (Faderl et al, 1999). As áreas mais comuns para a manifestação da fase blástica extramedular são os linfonodos, superfícies serosas, pele, trato gastrointestinal e genitourinário, ossos e sistema nervoso central (Lichtman, 2006). A OMS propôs recentemente uma mudança no critério de caracterização da fase blástica de 30% para 20% de blastos no sangue periférico (Jaffe et al, 2001), porém este novo critério ainda não foi validado ou utilizado extensivamente em estudos clínicos e a literatura disponível continua utilizando o critério de 30% de blastos no sangue periférico. Clinicamente, os pacientes apresentam-se com febre, sudorese noturna, perda de peso rápida, dores ósseas, dor no hipocôndrio esquerdo (por esplenomegalia ou infartos esplênicos), infiltrações cutâneas ou meníngeas, sinais de sangramento ou infecções. Os achados de anemia e

plaquetopenia são freqüentes. A crise blástica geralmente é refratária ao tratamento, independente do tipo de diferenciação celular e, ocasionalmente, pode ter duas ou mais linhagens afetadas sendo que 50% dos casos são de origem mielóide, 25% linfóide e 15% indiferenciada. A fase blástica é geralmente fatal, com uma sobrevida que varia de 3 a 9 meses (Cortes, 2004).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A LMC representa cerca de 15% de todos os casos de leucemias com uma incidência de 2 casos por 100.000 pessoas a cada ano, com idade média, ao diagnóstico, de 65 anos (Hehlmann et al, 2007). Entretanto, 10% dos casos podem ocorrer em pacientes com menos de 20 anos. Há uma leve predominância do sexo masculino com uma relação de 1,4 a 2,2 homens para cada mulher afetada, porém o desenvolvimento da doença é similar em ambos os sexos (Berger et al, 2005). Também não há diferenças geográficas ou étnicas óbvias, mas há diferenças nas estratégias de manejo da doença que podem depender da disponibilidade de drogas e tecnologias modernas para o diagnóstico. A taxa de mortalidade aumenta com a idade, de menos de 0,1 por 100.000 na população de 0 a 14 anos para aproximadamente 1,0 por 100.000 na população de 40 anos para mais de 8,0 por 100.000 na população de octogenários por ano (Redaelli et al, 2004).

1.4 ETIOLOGIA

Exposição a altas doses de radiação ionizante pode aumentar a ocorrência de casos de LMC. As três principais populações, a japonesa exposta à radiação liberada pelas detonações das bombas em Nagasaki e Hiroshima, pacientes britânicos com espondilite anquilosante tratados com radiação e mulheres com carcinoma cervical uterino que necessitam de radioterapia, possuem uma frequência de LMC significativamente maior que o esperado quando comparados com os grupos que não foram expostos. Leucemógenos químicos, tais como benzeno e agentes alquilantes não foram relacionados como agentes causadores de LMC, embora o aumento dose dependente esteja bem estabelecido para a leucemia mielóide aguda. Já os inibidores de DNA topoisomerase II podem ser uma exceção, já que estes têm demonstrado uma propensão para induzir leucemia t(9;22)-positivas (Lichtman, 2006). Além destes, dois trabalhos mostraram que a distância física entre os genes *BCR* e *ABL* em linfócitos humanos (Kozubek et al, 1997) e em células CD34+ (Neves et al, 1999) é menor do que se acreditava e tal proximidade poderia favorecer a translocação entre os dois genes. Entretanto, a presença da translocação *BCR-ABL* em células hematopoiéticas não é o suficiente para causar a leucemia uma vez que é possível detectar-se transcritos de fusão *BCR-ABL* no sangue de indivíduos saudáveis (Bose et al, 1998).

1.5 SINAIS E SINTOMAS

Em 70% dos pacientes que são sintomáticos ao diagnóstico, as queixas mais frequentes incluem cansaço, perda da sensação de bem-estar, baixa tolerância a exercícios, anorexia, desconforto abdominal, saciedade precoce (devido ao aumento do tamanho do baço), perda de peso e sudorese excessiva. No exame físico palidez e esplenomegalia são sinais importantes. A esplenomegalia está presente em 90% dos pacientes ao diagnóstico.

Sintomas mais incomuns incluem dermatose neutrofílica febril aguda, um infiltrado perivascular de neutrófilos na derme, bem como febre acompanhada de lesões maculonodular violáceas no tronco, braços, pernas e rosto. Em muitos pacientes a LMC é diagnosticada coincidentemente quando são realizados exames de rotina (Lichtman, 2006).

1.6 ACHADOS LABORATORIAIS

1.6.1 SANGUE PERIFÉRICO

O diagnóstico da LMC pode ser feito a partir dos resultados da contagem de células e pela observação do esfregaço do sangue periférico. Os eritrócitos encontram-se levemente alterados com um aumento na variedade de tamanho, de

pequenos a grandes. Um pequeno número de eritrócitos nucleados pode ser encontrado e o número de reticulócitos é normal ou ligeiramente aumentado.

A contagem de leucócitos totais é sempre elevada ao diagnóstico e, geralmente, é maior que 25.000/ μ L, podendo chegar a mais que 100.000/ μ L, a contagem de leucócitos totais aumenta progressivamente em pacientes não tratados. Granulócitos em todos os estágios de maturação estão presentes no sangue e geralmente possuem aspecto normal. A maioria destas células é de granulócitos maduros, embora possamos encontrar metamielócitos, mielócitos, promielócitos e ainda alguns blastos. O espectro de células circulantes é semelhante à sequência de maturação da linhagem granulocítica da medula. Os neutrófilos hipersegmentados são encontrados com frequência e a atividade da fosfatase alcalina é baixa ou ausente em mais de 90% dos pacientes.

A proporção de eosinófilos não é aumentada, porém a sua contagem absoluta quase sempre sim. O mesmo acontece com a contagem de basófilos e este achado pode ser muito útil para um diagnóstico diferencial. A contagem absoluta de linfócitos é aumentada em pacientes com LMC ao diagnóstico e a contagem de plaquetas pode ou não estar aumentada. As anormalidades funcionais dos neutrófilos (adesão, migração e fagocitose) são moderadas e compensadas pelo aumento do número de neutrófilos e não predispoem pacientes em fase crônica a infecções usuais ou oportunistas. (Lichtman, 2006)

1.6.2 MEDULA ÓSSEA

A medula é marcadamente hipercelular e o tecido hematopoiético ocupa cerca de 75 a 90% do volume da medula óssea, com a redução percentual de adipócitos. A granulopoiese é dominante enquanto a eritropoiese encontra-se reduzida, com uma relação entre 10:1 e 30:1, enquanto a relação normal está entre 2:1 e 4:1. Os megacariócitos são normais ou aumentados em número, os eosinófilos e basófilos podem também estar aumentados, usualmente na proporção encontrada no sangue. A medula óssea de pacientes com LMC possui vascularização maior que a de pacientes normais e angiogênese maior do que em outros tipos de leucemia. Após tratamento, tanto a vascularização como a angiogênese retornam ao normal (Lichtman, 2006).

1.7 O CROMOSSOMO PHILADELPHIA (Ph)

O cromossomo Ph resulta da translocação balanceada entre o braços longos dos cromossomos 9 e 22 - t(9;22)(q34;q11) que transpõe um segmento do gene *ABL* do cromossomo 9q34 para o gene *BCR* no cromossomo 22q11. Este evento dá origem ao gene híbrido *BCR-ABL* que transcreve um RNA mensageiro quimérico. O RNA mensageiro resultante da fusão é então traduzido em uma proteína quimérica de 190kDa, 210kDa ou 230kDa (Kurzrock et al, 1988).

1.7.1 GENE *BCR*

O gene *BCR* é composto por quatro genes denominados de *BCR1*, *BCR2*, *BCR3*, *BCR4*. O *BCR1* é o *BCR* mais comumente envolvido na translocação 9;22 e possui aproximadamente 100 kb de comprimento, sendo dividido em 20 exons com dois sítios de *splicing*. O gene *BCR* possui 3 regiões de quebra denominadas “major breakpoint cluster region” (M-BCR), “minor breakpoint cluster region” (m-BCR) e “micro breakpoint cluster region” (μ -BCR). Este gene codifica uma proteína de 160 kDa que é constitutivamente expressa em vários tipos celulares, mas é mais intensamente expressa em células hematopoéticas (Randolph, 2005b) e apesar de sua função fisiológica não estar ainda bem definida, sua estrutura sugere que está envolvida na transdução de sinal. A porção amino-terminal da proteína possui atividade serina/treonina quinase (Maru & Witte, 1991) e um domínio de dimerização. Já porção carboxi-terminal possui atividade GTPase para Rac, uma proteína da família Ras que ativa uma NADPH oxidase em neutrófilos (Dieckmann et al, 1991).

1.7.2 GENE *ABL*

O gene *ABL* é o homólogo humano do oncogene v-abl do vírus Abelson da leucemia murina (A-MuLV) com 230 kb de comprimento, 11 exons e dois sítios para *splicing*. O gene *ABL* normalmente codifica uma proteína nuclear de 145 kDa, denominada de p145, que possui atividade de tirosina quinase e está envolvida com a

regulação do ciclo celular e reposta a estresse genotóxico e transmissão de informação sobre o ambiente celular. De uma forma geral, parece que a proteína ABL possui um papel complexo na modulação celular, integrando sinais extracelulares e intracelulares que influenciam o ciclo celular e a apoptose.

A proteína ABL possui vários domínios como o SH2 e SH3 com homologia Src, uma região central rica em prolina e um domínio de ligação de actina na porção carboxi-terminal, o que permite interação com outras proteínas. Além disso, possui um domínio de ligação de DNA, bem como de sinais de localização nuclear. O domínio SH1 é responsável pela atividade de proteína quinase que pode ser regulada pela porção amino-terminal do domínio SH3 (Van Etten, 1999). A porção nuclear da proteína ABL tem papel importante na inibição do ciclo celular, o que faz com que o gene *ABL* seja considerado um gene supressor de tumor (Sawyer et al, 1994).

1.7.3 GENE HÍBRIDO *BCR-ABL*

A translocação (9;22) gera dois novos genes, o *BCR-ABL* no cromossomo 22q- e o *ABL-BCR* no cromossomo derivativo 9q+, sendo que este último, apesar de transcricionalmente ativo, parece não ter papel funcional na doença (Melo, 1996).

Os pontos de quebra do gene *ABL* no cromossomo 9q34 podem ocorrer em qualquer lugar de uma grande região (maior que 300 kb) na terminação 5', seja *upstream* do primeiro exon alternativo Ib, *downstream* do segundo exon alternativo Ia ou mais frequentemente entre os dois (Melo, 1996). Independentemente do ponto

exato de quebra, o *splicing* do transcrito híbrido primário resulta em uma molécula de mRNA na qual a sequência do *BCR* está ligada ao exon a2 do *ABL* (Deininger et al, 2000). Na maioria dos pacientes com LMC e um terço dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda Ph-positiva os pontos de quebra do gene *BCR* podem ocorrer em uma área de 5.8 kb entre os exons e12-e16 (anteriormente denominados b1-b5), denominado de *major breakpoint cluster region* (M-bcr). O *splicing* alternativo dá origem a dois transcritos, b2a2 e b3a2 que traduzem uma proteína de 210kDa ($p210^{BCR-ABL}$) (Shtalrid et al, 1988).

Dois outros pontos de quebra do gene *BCR* foram descritos: m-*BCR* e μ -*BCR* que codificam a $p190^{BCR-ABL}$ e $p230^{BCR-ABL}$, respectivamente. , sendo que a primeira está envolvida na leucemia linfóide aguda Ph-positiva e a segunda com a leucemia neutrofílica crônica.

Figura 2: Estrutura dos genes *BCR*, *ABL* e do gene quimérico *BCR-ABL*. Os pontos de quebra dos genes *ABL* e *BCR* estão indicados, bem como as regiões m-bcr, M-bcr e μ -bcr. Os genes quiméricos formados a partir destas fusões são o gene e1a2, b2a2, b3a2 e e19a2 (Deininger et al, 2000).

1.8 VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS PELA PROTEÍNA BCR-ABL

Três principais mecanismos estão relacionados com a transformação maligna mediada pela proteína BCR-ABL: (1) adesão alterada ao estroma da medula e matriz extracelular; (2) sinalização mitogênica ativa constitutivamente e (3) redução da apoptose.

1.8.1 ALTERAÇÃO DA ADESÃO AO ESTROMA MEDULAR E MATRIZ EXTRACELULAR

A diferenciação do compartimento hematopoiético a partir da célula tronco hematopoética é um processo altamente regulado que depende de interações específicas entre o estroma medular e as células hematopoiéticas para que a proliferação, diferenciação e maturação ocorram de forma adequada.

A LMC é caracterizada pela liberação precoce e circulação de progenitores hematopoéticos sendo que estes apresentam alteração da capacidade de interagir com as células endoteliais dos sinusóides da medula para deixarem o microambiente da medula. Assim, o fenótipo maligno dos progenitores hematopoiéticos na LMC parece ser acompanhado de mecanismos de adesão modificados e por alterações na função ou expressão de receptores de adesão na superfície da célula (Verfaillie et al, 1992).

Estudos demonstram que a alteração no mecanismo de adesão ocorre por duas vias, sendo uma independente de tirosina quinase e outra dependente de tirosina quinase (Wertheim et al, 2002).

Enquanto progenitores normais aderem ao estroma via receptores $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ integrinas, uma parte dos progenitores leucêmicos expressa receptores para $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ integrina conhecidos por interagir com laminina e colágeno IV presentes na membrana basal. Estas observações indicam que a liberação precoce de progenitores leucêmicos na circulação pode ser causada pela perda das interações adesivas com o estroma e/ou fibronectina e a aquisição de interações adesivas com componentes da membrana basal dos sinusóides da medula (Salesse & Verfaillie, 2002).

A proteína CRKL, um dos principais substratos da $p210^{BCR-ABL}$, pode estar envolvida em vários processos de sinalização, inclusive na regulação da adesão (Uemura & Griffin, 1999). A CRKL serve como adaptador para que a $p210^{BCR-ABL}$ se ligue à paxilina e vinculina, duas proteínas características de adesões focais (Salgia, 1995). Este complexo constitutivo mediado pela $p210^{BCR-ABL}$ com proteínas envolvidas na sinalização da integrina pode também transduzir, constitutivamente, sinais que são regulados normalmente pela integrina ou ativar receptores de fatores de crescimento e ser responsável pela alteração da adesão e mobilidade das células leucêmicas. Além disso, a ativação e fosforilação constitutiva de várias proteínas de adesão focal podem mantê-las indisponíveis para a sinalização mediada por integrina, levando a uma diminuição da adesão dos progenitores leucêmicos (Salesse & Verfaillie, 2002).

1.8.2 ATIVAÇÃO MITOGÊNICA

1.8.2.1 VIA JAK-STAT

As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs) são ativadas por muitas citocinas com ação sobre células hematopoiéticas e fatores de crescimento. Elas regulam ciclo celular, apoptose e proliferação de diferentes células através da influência na transcrição de genes (Bowman et al, 2000). Devido às STATs serem ativadas constitutivamente em certas doenças oncohematológicas, elas parecem desempenhar função importante na leucemogênese (Baskiewicz-Masiuk & Machalinski, 2004). As STATs são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que são fosforilados após ligação de citocinas ou fatores de crescimento com seu respectivo receptor na superfície da célula. Após esta ligação, as subunidades do receptor formam dímeros e levam à justaposição das proteínas Jaks. Isto resulta na transfosforilação e ativação da sua atividade quinase e a fosforilação das STATs que, então, formam dímeros e migram para o núcleo onde desencadeiam mudanças na expressão de gênica ativando-a (Ravandi et al, 2003). As principais STATs envolvidas na LMC são a STAT3 e STAT5 sendo que a ativação constitutiva da primeira inibe a diferenciação celular (Coppo et al, 2006), já a STAT5 parece ter uma função mais importante na proliferação celular, porém também está envolvida na apoptose de células blásticas (Baskiewicz-Masiu & Machalinski k, 2004).

1.8.2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO Ras

A via de sinalização Ras é absolutamente necessária para a transformação mediada pela proteína BCR-ABL. A expressão constitutiva de BCR-ABL resulta em um acúmulo da forma ativa, RAS-GTP (Cortez et al, 1995). A família das proteínas Ras pertence à superfamília das GTPases que estão localizadas na superfície interna da membrana plasmática e possuem função importante em várias vias de sinalização mediadas por receptores de tirosina quinase (RTKs) e outros receptores. Uma vez induzida, Ras ativa Raf serina/treonina quinase que então fosforila MAPK quinases (também denominadas MEKs). Estas por sua vez ativam MAPKs (ou ERKs), que migram para o núcleo onde fosforilam e ativam fatores de transcrição nuclear. Esta cascata modula proliferação celular regulando a atividade de várias proteínas reguladoras de ciclo celular e fatores de transcrição (Ravandi et al, 2003).

1.8.3 INIBIÇÃO DA APOPTOSE

1.8.3.1 VIA PI3K-AKT

A proteína BCR-ABL ativa a fosfoinositol-3 quinase (PI3K), uma quinase de lipídeos que fosforila fosfoinositóis na posição D-3' do anel inositol. A PI3K é um heterodímero formado por uma subunidade regulatória de 85 kDa (p85) e uma subunidade catalítica de 110 kDa (p110) (Skorski et al, 1995).

A via PI3K-Akt tem função importante no mecanismo anti-apoptótico e leucemogênico mediado pela proteína BCR-ABL.

Os fosfolipídeos gerados da ação da PI3K agem sobre a Akt que transloca do citoplasma para a parte interna da membrana plasmática. A realocização da Akt para a membrana plasmática leva-a para a proximidade de quinases regulatórias que fosforilam e ativam-na. A Akt regula os mecanismos anti-apoptóticos fosforilando diretamente componentes do aparato de morte celular como a proteína Bad e caspase9 (Datta et al, 1999).

A família das proteínas Bcl2 é subdividida em membros pro- e anti-apoptóticos. Os membros pro-apoptóticos incluem Bad, Bax e Bid, enquanto os anti-apoptóticos incluem Bcl-2 e Bcl-xL (Keeshan et al, 2002).

Quando Bad encontra-se fosforilada não consegue se ligar e inibir Bcl-2 e Bcl-xL, que estão localizadas na membrana mitocondrial, e assim não ocorre a liberação do citocromo C. Portanto, a ativação constitutiva de Bad anula sua habilidade de causar morte celular.

Além do mecanismo mediado por Bad, Akt também fosforila caspase 9 que tem como função iniciar a cascata das caspases. A fosforilação da caspase 9 impede a liberação do citocromo C e portanto, a apoptose (Datta et al, 1999).

Figura 3: Principais vias de sinalização da proteína BCR-ABL. A proteína CRKL, um dos principais substratos da BCR-ABL está relacionada às alterações de adesão de células hematopoiéticas ao estroma e matriz medular. O PI3K está relacionado ao mecanismo antiapoptótico mediado pela proteína BCR-ABL e a proteína Ras modula proliferação celular regulando a atividade de várias proteínas reguladoras de ciclo celular e fatores de transcrição (Kantarjian et al, 2007).

1.9. O TRATAMENTO DA LMC

Os primeiros tratamentos para LMC eram apenas paliativos, assim casos de LMC foram tratados com ferro e quinino sem qualquer resultado. Porém por volta de 1865, Lissauer, um médico alemão, administrou a solução de Fowler (solução de trióxido arsênico a 1%), pela primeira vez, em uma paciente com LMC e observou melhora significativa na condição da paciente, com redução do tamanho do baço, da contagem de leucócitos e melhora da anemia. As preparações de arsênico, apesar de sua toxicidade, continuaram a ser utilizadas para o tratamento da LMC até 1903 quando a radioterapia foi introduzida por Nicholas Senn, nos EUA. Ele notou que,

com o uso da radioterapia, o baço reduzia rapidamente de tamanho e a contagem de leucócitos também diminuía e a saúde do paciente parecia voltar ao normal por semanas, meses e, em alguns casos, por anos. Contudo, logo ficou claro que o processo fundamental da doença não era afetado, bem como a expectativa de vida também não aumentava com o uso da radioterapia (Geary, 2000). Em 1912 o benzeno passou a ser administrado conjuntamente com a radioterapia. Já o tratamento com mostardas nitrogenadas foi introduzido em 1947 e os experimentos com tais fármacos conduziram ao desenvolvimento de outro agente alquilante, o bussulfano, em 1953.

O bussulfano possui ação mais ou menos específica sobre o tecido hematopoiético e particularmente sobre a série granulocítica, embora alguns estudos tenham mostrado que era profundamente tóxico para o epitélio germinativo e para os pulmões. Após vários protocolos utilizando-se diferentes dosagens concluiu-se que o bussulfano era capaz de controlar a LMC de forma mais eficaz que a radioterapia e foi utilizado por 35 anos até ser trocado por drogas menos tóxicas como hidroxiurea e α -interferon. (Randolph, 2005b)

Em 1980 o α -interferon recombinante foi produzido com sucesso e Talpaz e colegas foram os primeiros a utilizá-lo em pacientes com LMC em fase crônica, demonstrando que a droga era capaz de induzir a negatividade do cromossomo Ph e prolongar a vida na maioria dos pacientes estudados (Tefferi, 2007).

Até a década de 70 a LMC era tida como uma doença invariavelmente fatal, porém esta visão foi modificada com a introdução, em 1986, do transplante de medula óssea em 1986 por Goldman, considerado até agora como única terapia curativa para a LMC. Porém, muitos pacientes não são elegíveis para tal procedimento. Em 1996, Brian Druker desenvolveu o IM (Tefferi, 2007) e em 2001 o U.S Food and Drug

Administration aprovou o seu uso, e em 2003 o aprovou como terapia de primeira linha para a LMC em fase crônica. Com o uso clínico, a resistência ao MI foi observada e subsequentemente foram descritas as mutações no domínio quinase do gene *BCR-ABL*. Os inibidores de tirosina quinase de segunda geração, que possuem ação sobre a maioria das mutações, foram introduzidos a partir de 2005 (Fausel, 2007).

1.10 O MESILATO DE IMATINIBE

Nas últimas décadas, do grande conhecimento sobre os eventos moleculares envolvidos no câncer humano, surgiram vários alvos para agentes anticâncer e talvez o melhor exemplo desta relação seja a LMC.

As proteínas com atividade de tirosina quinase como a BCR-ABL, catalizam a transferência de ATP para resíduos de tirosina de outras proteínas que quando fosforiladas induzem as mudanças fenotípicas características da LMC. Todas as proteínas quinases utilizam ATP como doador de fosfato e existe um alto grau de conservação entre os domínios quinase, particularmente nos sítios de ligação do ATP. Assim sendo, acreditou-se que os inibidores de tirosina quinase não apresentariam alta especificidade para serem utilizados clinicamente (Mauro et al, 2002). Porém, em 1992, Anafi relatou que a tirofostina era capaz de inibir a atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL e sugeriu que seria possível desenvolver compostos para o tratamento de leucemias humanas que envolvem o gene *ABL* (Anafi et al, 1993). Outras tirofostinas foram identificadas como sendo específicas, tais como a AG568,

AG957 e a AG1112 e apesar de apresentarem atividade *in vitro* não foram desenvolvidas para o uso clínico.

Outro composto pesquisado com atividade sobre a proteína BCR-ABL foi a herbimicina A, um antibiótico derivado do *Streptomyces hygroscopicus*. No início pensou-se que a herbimicina era capaz de inibir a atividade tirosina quinase da proteína BCR-ABL, porém estudos posteriores demonstraram que ela promovia a degradação da proteína BCR-ABL (Okabe et al, 1992).

No fim dos anos 80, cientistas da Ciba Geigy (atualmente Novartis), sob a direção de N. Lydon e A. Matter, iniciaram vários projetos para a identificação de compostos capazes de inibir a atividade de proteínas quinases. Em um desses projetos que tinha como alvo a proteína quinase C (PKC), foi identificado um composto derivado de 2-fenilaminopirimidina. Este composto apresentava baixa potência e especificidade, inibindo tanto serina/treonina quanto tirosina quinases, porém a partir deste ponto uma série de compostos derivados foi sintetizada (Deininger et al, 2005a). A introdução de um grupo metil na posição orto do anel diaminofenil reduziu a atividade contra PKC enquanto que a atividade contra tirosina quinases foi mantida. A introdução de um grupo benzamida ao anel de fenol aumentou a atividade de inibição à tirosina quinases. O composto obtido apresentava baixa biodisponibilidade oral com baixa solubilidade em água. Foi, então, introduzida uma cadeia N-metilpiperazina, altamente polar, o que aumentou drasticamente a solubilidade e a biodisponibilidade oral. A partir disso, o MI foi identificado como um composto promissor para o uso clínico (Buchdunger et al, 2001).

Figura 4: Desenvolvimento do MI a partir de uma estrutura 2-fenilaminopirimidina (em branco). (A) A atividade em ensaios celulares foi ampliada pela introdução de um grupo 3' piridil (amarelo) na posição 3' da pirimidina. (B) A atividade sobre tirosina quinase foi aumentada pela adição de um grupo benzamida (laranja) ao anel fenil. (C) A ligação de um grupo metil (verde) na posição orto ao anel diaminofenil reduziu a atividade sobre PKC. (D) A adição de N-metilpiperazina (rosa) aumentou a solubilidade em água a biodisponibilidade via oral. (Deininger, 2005a).

1.11 FARMACOLOGIA CLÍNICA DO MESILATO DE IMATINIBE

1.11.1 MECANISMO DE AÇÃO

O MI exerce seu efeito terapêutico na LMC através da ligação competitiva ao sítio de ligação do ATP da proteína BCR-ABL, inibindo assim, a fosforilação de proteínas envolvidas na transdução de sinal desta. Na prática, isto se traduz na inibição seletiva da proliferação e indução à apoptose em células BCR-ABL positivas (Druker et al, 2001).

Em estudos pré-clínicos ficou demonstrado que o MI é capaz de inibir seletivamente a formação de colônias tanto de sangue periférico como de medula

óssea de pacientes portadores de LMC Ph+ a uma concentração de 1 μ mol/L, sem efeitos sobre células normais (Buchdunger et al, 1996).

O MI foi aprovado como tratamento de primeira linha para pacientes com LMC em fase crônica, porém também é indicado para todas as fases da LMC após falha de tratamento com IFN- α , bem como em pacientes pediátricos com LMC fase crônica depois de recaída pós-transplante. O MI também é indicado para pacientes com LLA e tumor gastro-intestinal metastático (Peng et al, 2005).

1.11.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O MI é quimicamente designado como 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-piridinil]amino]fenil] benzamida metasulfonado. Sua fórmula molecular é C₂₉H₃₁N₇O₃ e seu peso molecular é 589,7. O MI é totalmente solúvel em água em pH 5,5 ou menor, sendo que a solubilidade em tampão aquoso diminui com o aumento do pH e é praticamente insolúvel em pH 8,0. Em fluidos gástricos artificiais, o MI é estável (1 hora em pH 1,2 e temperatura de 37°C) (Peng et al, 2005).

1.11.3 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética do MI foi avaliada em estudos com mais de 900 pacientes e é bem absorvido por via oral, atingindo a C_{max} entre 2 e 4 horas após a administração.

A biodisponibilidade absoluta média é de 98%. Após a administração oral em pacientes saudáveis, a meia-vida para eliminação do MI e seu principal metabólito, o N-metil derivado, é de 18 e 40 horas, respectivamente.

Estudos *in vitro* mostraram que, em concentrações clinicamente relevantes, o MI encontra-se 95% ligado a proteínas plasmáticas, preferencialmente albumina e α 1-glicoproteína ácida, indicando distribuição extensiva nos tecidos.

O MI é metabolizado pelo fígado, principalmente pelo sistema de isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, sendo que o principal metabólito circulante do MI é o derivado piperazina N-demetilado (CGP 74588). Além deste, o N-óxido quartenário (CGP71422) e N-óxido terciário (CGP72383) também foram encontrados no plasma humano 2 horas após a administração do medicamento, embora não fossem mais detectados 24 horas após a administração da droga.

O MI é excretado principalmente via fezes, como metabólitos. Após administração de MI marcado com ^{14}C , aproximadamente 81% da dose foi eliminada em sete dias tanto pelas fezes (68% da dose) quanto pela urina (13% da dose) (Peng et al, 2005).

1.11.4 EFEITOS ADVERSOS

Os efeitos adversos frequentemente relatados ($\geq 10\%$) são edema, náusea, vômito, câimbra muscular, dor muscular, diarreia, erupção cutânea, fadiga e dor abdominal. Toxicidade hepática, renal e cardíaca deve ser considerada, bem como as citopenias (anemia, neutropenia e trombocitopenias) (Deiniger & Druker, 2003).

1.11.5 ESTUDOS CLÍNICOS FASE I E II

O MI foi, inicialmente, estudado em pacientes com LMC em fase crônica com falha de tratamento com IFN α . As doses de MI variaram entre 25mg a 1000mg diários, com mudanças devido a eventos adversos em casos de doses de 750mg ou maiores. Uma relação dose – resposta foi estabelecida, e pacientes que tomaram 300mg ou mais atingiram 98% de resposta hematológica em 4 semanas. Destes pacientes, 31% atingiram resposta citogenética maior e 13% atingiram RCC. A dose de 400mg diários ficou estabelecida com padrão uma vez que esta, *in vitro*, mostrou boa correlação entre nível plasmático da droga e morte celular e *in vivo*, mostrou inibição da atividade de tirosina quinase da proteína BCR-ABL (Druker et al, 2001).

Em junho de 1999 três estudos de fase II multinacionais foram iniciados divididos pela fase da LMC. Em um estudo foi administrado 400mg de MI a 532 pacientes com LMC em fase crônica tardia que não responderam ao tratamento com IFN α . Os outros dois estudos avaliaram doses de 400mg e 600mg em pacientes com LMC em fase acelerada e crise blástica, respectivamente. Estes estudos demonstraram que quanto mais cedo for iniciado o tratamento com MI, melhor será a resposta citogenética e que a resposta hematológica e citogenética estão associadas com uma sobrevida livre de progressão melhor. Além disso, ficou estabelecido que o MI é uma droga segura e eficaz no tratamento da LMC (Kantarjian et al, 2002).

1.11.6 O ESTUDO IRIS

Entre junho de 2000 e janeiro de 2001 foi realizado o estudo IRIS no qual 1106 pacientes com LMC em fase crônica recém diagnosticados foram incluídos. Os pacientes foram randomizados entre os tratamentos com MI (400 mg) ou o tratamento padrão com IFN α e baixa dose de citarabina. A mudança de tratamento só foi permitida aos pacientes em caso de intolerância ou falha terapêutica. Após 19 meses de seguimento, a taxa estimada de resposta citogenética maior foi de 87,1% no grupo tratado com MI e de 34,7% para o grupo tratado com IFN α mais baixa dose de citarabina. A taxa estimada de RCC foi de 76,2% e 14,5%, respectivamente. Aos 18 meses a taxa de sobrevida livre de progressão foi de 96,7% para o grupo tratado com MI e de 91,5% para o outro grupo. Além disso, houve uma grande diferença quanto à interrupção e a troca entre os dois tratamentos. Do grupo tratado com MI apenas 12,3% dos pacientes interromperam o tratamento e 2% mudaram para o IFN α . Já no grupo tratado com IFN α mais citarabina, 31,6% interromperam o tratamento e 57,5% mudaram para o tratamento com MI (O'Brien et al, 2003). Em pacientes com remissão citogenética completa, os níveis de transcritos *BCR-ABL* após 12 meses tiveram uma redução de 3logs em 57% dos pacientes tratados com MI e em 24% em pacientes tratados com IFN α mais citarabina. Para os pacientes com remissão citogenética completa e redução de transcritos de 3 logs em 12 meses, a probabilidade de o paciente permanecer livre de progressão da doença foi de 100% em 24 meses, quando comparado a 95% para pacientes com redução menor que 3logs e 85% para aqueles pacientes que não atingiram a remissão citogenética completa em 12 meses (Hughes et al, 2003).

Após 60 meses de seguimento, apenas 3% do grupo de pacientes tratados com IFN α mais citarabina continuaram o tratamento inicial e 65% deste grupo passou a receber o MI, portanto este estudo teve como objetivo avaliar a resposta ao tratamento com MI durante este período. Após 5 anos de tratamento, a taxa de RCC entre os pacientes que receberam MI foi de 87% e apenas 7% progrediu para fase acelerada ou crise blástica. A sobrevida global dos pacientes tratados com MI como primeira linha foi de 89%. Pacientes com RCC e RMM possuem risco significativamente menor de progressão da doença que aqueles pacientes que não atingiram a RCC e, portanto o MI é capaz de induzir respostas duradouras em pacientes com LMC em fase crônica (Druker et al, 2006).

As respostas ao tratamento com MI podem ocorrer a nível hematológico, citogenético e molecular e os critérios de resposta estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Critérios de resposta ao tratamento com MI (Deininger,2005b).

<i>Nível de Resposta</i>	<i>Definição</i>
Resposta hematológica completa	Contagem do sangue total e contagem diferencial de leucócitos normais e ausência de doença extramedular.
Resposta citogenética mínima	66%-95% de metáfases Ph positivas
Resposta citogenética menor	36%-65% de metáfases Ph positivas
Resposta citogenética parcial	1%-35% de metáfases Ph positivas
Resposta citogenética completa	0% de metáfases Ph positivas
Resposta molecular maior	Redução de 3 ou mais logs de transcritos <i>BCR-ABL</i> .
Resposta molecular completa	Negatividade pelo RT-PCR

Tabela 2: Definição de resposta ótima ao tratamento com MI (Baccarani, 2008)

<i>Tempo de tratamento</i>	<i>Resposta Ótima</i>
3 meses	Resposta hematológica completa
6 meses	Mais que uma resposta citogenética parcial
12 meses	Resposta citogenética completa
18 meses	Resposta molecular maior
A qualquer momento	Resposta citogenética completa e resposta molecular completa estável

1.12 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A inibição seletiva da proteína BCR-ABL pelo MI mudou substancialmente a terapia da LMC e apesar das altas taxas de resposta hematológica e citogenética, observou-se que parte dos pacientes apresentava doença refratária ou resistência secundária ao tratamento com MI.

Estudos clínicos demonstraram remissões de mais de 3 anos em pacientes com LMC em fase crônica, enquanto pacientes em crise blástica recaem precocemente apesar do tratamento contínuo (Hochhaus & Hughes, 2004).

A resistência ao MI pode ser definida de acordo com o momento em que ocorre. A resistência primária ocorre quando a droga é ineficaz desde o início do tratamento e pode ser definida como uma falha do paciente em atingir a resposta hematológica

ou citogenética significativa, enquanto a resistência secundária ou adquirida é o ressurgimento progressivo do clone leucêmico após uma resposta inicial à droga. A resistência também pode ser definida nos critérios clínicos e laboratoriais para avaliação da LMC, que incluem resistência hematológica, citogenética e molecular. Podemos definir resistência hematológica como a falha na normalização das contagens do sangue periférico e do tamanho do baço. Já a resistência citogenética define-se como a falha em atingir a reposta citogenética maior, ou seja, positividade do cromossomo Philadelphia menor que 35%. A resistência molecular representa a falha em atingir ou a perda da RMM. A RMM pode ser definida como sendo a redução de 3logs da relação *BCR-ABL*/gene controle a partir de um *baseline* padronizado no laboratório (Hughes et al, 2006).

Em 2006, o European Leukemia Net redefiniu o critério de resposta ao tratamento categorizando a resistência em dois grupos, resposta subótima e ausência de resposta (Tabela 3).

Os primeiros casos de resistência ao MI foram descritos em 2000 e desde então têm sido extensivamente estudados e podem ser classificados com independentes ou dependentes de *BCR-ABL*. Os mecanismos independentes de *BCR-ABL* incluem a ligação do MI à $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, o aumento da expressão das bombas de efluxo de drogas e a baixa expressão dos transportadores de influxo de drogas. Os mecanismos dependentes de *BCR-ABL* são o aumento da expressão da proteína BCR-ABL devido à amplificação gênica e as mutações no domínio tirosina quinase (Melo & Chuah, 2007).

Tabela 3: Definição de falha e resposta subótima para pacientes com LMC fase crônica precoce tratados MI 400mg diários (Baccarani, 2006).

<i>Duração do tratamento (meses)</i>	<i>Falha</i>	<i>Resposta subótima</i>
3	Ausência de resposta hematológica	Menos que resposta hematológica completa
6	Menos que resposta hematológica completa Ausência de resposta citogenética	Menos que resposta citogenética parcial
12	Menos que resposta citogenética parcial	Menos que RCC
18	Menos que RCC	Menos que RMM
Qualquer momento	Perda da resposta hematológica completa Perda da RCC Progressão da doença Mutações com alta insensibilidade ao MI	Evolução clonal Perda da RMM Mutações com baixa insensibilidade ao MI

1.12.1 MECANISMOS INDEPENDENTES DE *BCR-ABL*

1.12.1.1 α 1-Glicoproteína Ácida

A α 1-glicoproteína ácida é uma proteína de fase aguda que é sintetizada pelo fígado e tem a capacidade de se ligar a drogas neutras e básicas, como o MI. Níveis elevados de α 1-glicoproteína ácida têm sido descritos em uma variedade de patologias, tais como inflamação crônica, infarto do miocárdio e cânceres avançados, inclusive fases avançadas da LMC e poderiam alterar a distribuição de MI e sua ação intracelular sobre a proteína BCR-ABL (Gambacorti et al, 2000). Um estudo realizado com 9 pacientes demonstrou que os pacientes que apresentavam altos níveis de α 1-glicoproteína ácida não atingiram resposta hematológica aos 3 meses, enquanto que pacientes com níveis normais, sim (Larghero et al, 2003).

1.12.1.2 GENES DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

Os transportadores de drogas possuem função importante na absorção, distribuição e eliminação *in vivo* e, a nível celular, no transporte das drogas através da membrana celular determinando assim, as concentrações intracelulares de drogas. (Thomas et al, 2004). A família de transportadores ATP-binding cassette (ABC) forma um grande grupo de proteínas transmembrana envolvidas em muitos processos metabólicos com a capacidade de transportar vários substratos. Os membros desta família são importantes no mecanismo de resistência a múltiplas drogas. Genes

importantes que codificam esses transportadores incluem: *ABCB1* que codifica a glicoproteína-P, também denominado de *MDR1* (Multi Drug Resistance 1) e *ABCG2* também conhecido como *BCRP* (Breast Cancer Resistance Protein) (Heaney & Holyoake, 2007)

1.12.1.2.1 GENE *MDR1*(*ABCB1*)

Um mecanismo amplamente aceito para a resistência a múltiplas drogas é o acúmulo celular reduzido e a distribuição subcelular alterada de drogas citotóxicas. Em muitos casos, isto é mediado pelo aumento de expressão na superfície celular do produto do gene *MDR1*, a glicoproteína-P (170 kDa), que funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia. Estudos demonstraram que células K562/DOX resistentes a várias drogas e que superexpressam glicoproteína-P, também exibem menor sensibilidade ao MI quando comparadas a células K562 parenterais e que esta resistência pode ser modulada por bloqueadores da glicoproteína-P. Além disso, a introdução via retrovírus e expressão do gene *MDR1* em células AR230, outra linhagem celular para LMC, levou à resistência ao MI, também reversível pelos inibidores da glicoproteína-P (Mahon et al, 2003). Outros estudos relacionaram o aumento dos transcritos *BCR-ABL* com o aumento da expressão da glicoproteína-P em pacientes com LMC fase acelerada, logo após a perda da resposta hematológica. Estes resultados reforçam a importância da expressão da glicoproteína-P como mecanismo de resistência ao MI, principalmente quando a doença não está totalmente controlada (Galimberti et al, 2005).

1.12.1.2.2 GENE *BCRP* (*ABCG2*)

O gene *BCRP* possui função fisiológica importante no transporte através da placenta, intestino e é componente da barreira hemato-encefálica. É altamente expresso na célula progenitora hematopoiética, porém esta expressão é reduzida nas células mais maduras (Heaney & Holyoake, 2007).

Vários estudos têm sido conduzidos para que se estabeleça a relação entre o MI e a expressão do gene *BCRP*, porém até agora os dados são controversos.

Os primeiros estudos demonstraram que de fato o MI interage com *BCRP* e sugerem que este poderia ser considerado seu substrato (Burger et al, 2004). Porém, outros realizados em linhagem celular de osteosarcoma demonstraram, que apesar de o MI apresentar alta afinidade pelo *BCRP*, células que superexpressam *BCRP* não são resistentes a esta droga e que o MI inibe o transporte mediado por *BCRP* (Houghton et al, 2004). Mais recentemente, foi observado que a superexpressão de *BCRP* causa resistência ao MI em células cujo crescimento é dependente da sinalização do BCR-ABL (Nakanishi et al, 2006).

1.12.2 MECANISMOS DEPENDENTES DE *BCR-ABL*

1.12.2.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *BCR-ABL*

A amplificação do gene *BCR-ABL* foi observada pela primeira vez *in vitro* quando linhagens celulares de LMC foram expostas à doses de MI gradualmente maiores (Mahon et al, 2000). Este fenômeno também foi descrito em uma pequena porção dos pacientes, cerca de 18%, porém, este dado pode estar subestimado já que está baseado apenas em achados citogenéticos da duplicação do cromossomo Ph. (Melo & Chuah, 2007). A amplificação do gene *BCR-ABL* leva à resistência devido ao aumento da proteína alvo que deve ser inibida pela dose terapêutica de MI (Hocchaus et al, 2002).

1.12.2.2 MUTAÇÕES DO DOMÍNIO QUINASE DO GENE *BCR-ABL*

As mutações do domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL* constituem a principal causa de resistência ao tratamento com inibidores seletivos de tirosina quinase (Baccarani et al, 2006). Até agora foram descritas mais de 50 mutações pontuais que codificam mais de 40 substituições diferentes de amino ácidos no domínio tirosina quinase da proteína BCR-ABL de pacientes que recaíram após resistência ao MI. Estas mutações afetam amino ácidos envolvidos na ligação do MI ou em regiões regulatórias do domínio quinase da proteína BCR-ABL e resulta na diminuição da sensibilidade ao MI (O'Hare et al, 2007), além disso, as mutações no

domínio quinase da proteína BCR-ABL são mais frequentes em fases mais avançadas da doença como na fase acelerada e blástica (Branford et al, 2003). As mutações também diferem quanto ao grau de resistência que conferem, sendo que alguns são completamente resistentes e outras apenas parcialmente. No último caso a sensibilidade pode ser restaurada com o escalonamento da dose de MI. Alguns estudos realizados por PCR alelo-específica demonstraram que tais mutações podem pré-existir antes do início do tratamento com MI, havendo seleção dos clones resistentes durante o tratamento, já que as mesmas mutações foram encontradas em amostras pré-tratamento e no momento da resistência (Roche-Lestienne C et al, 2002). Outro estudo, porém, mostrou que estes clones mutantes presentes antes do início do tratamento com MI podem desaparecer durante o tratamento e, portanto a pesquisa de mutações com métodos muito sensíveis ao diagnóstico pode não ser relevante e pode levar a uma conduta precipitada (Willis et al, 2005).

As mutações podem ser categorizadas em 4 grupos: (i) mutações que impedem diretamente a ligação do MI; (ii) mutações que ocorrem no sítio de ligação do ATP; (iii) mutações que ocorrem na alça de ativação e (iv) mutações que ocorrem no domínio catalítico (Melo & Chuah, 2007).

Figura 5: Mapa das mutações do domínio quinase associadas à resistência clínica ao MI. P, alça de fosfato; B, sítio de ligação do MI; C, domínio catalítico; A, activation loop. Amino ácidos em verde indicam mutações detectadas em 2-10% e em vermelho em mais de 10% dos pacientes com mutações (Melo & Chuah, 2007).

A substituição do amino ácido treonina na posição 315 da proteína BCR-ABL por uma isoleucina foi a primeira mutação a ser detectada em pacientes resistentes. Baseada na análise cristalográfica do domínio catalítico do ABL complexado com uma variante do MI, esta substituição reduz a afinidade pela droga por duas vias. Na primeira o átomo de oxigênio pela cadeia lateral da treonina 315 não está presente e isso não permite a formação da ponte de hidrogênio com o grupo amino secundário do MI. Na segunda, a isoleucina contém um grupo hidrocarboneto extra na sua cadeia lateral e impede estericamente a ligação do MI. (Gorre et al, 2001).

As mutações do domínio quinase do gene *ABL* também podem ocorrer no sítio de ligação do ATP (alça-P). Este domínio é uma sequência rica em glicina e altamente conservada, localizada do amino ácido 248 ao 256 e interage com o MI

através de pontes de hidrogênio e forças de van der Waals (Hochhaus et al, 2002). Estas mutações modificam a flexibilidade da alça-P e desestabilizam a conformação necessária para a ligação do MI, formando uma gaiola hidrofóbica (Shah et al, 2002). Além da insensibilidade ao MI, uma característica importante destas mutações é que elas conferem um pior prognóstico que as demais (Branford et al, 2003).

A alça de ativação da proteína BCR-ABL inicia no amino ácido 381 com um motivo altamente conservado de 3 amino ácidos (aspartato-fenilalanina-glicina). Esta região do domínio quinase pode se adaptar entre uma conformação fechada (inativa) ou aberta (ativa). O MI é incapaz de se ligar à conformação ativa (Nagar et al, 2002). Portanto mutações na alça de ativação podem perturbar o balanço energético necessário para estabilizar a conformação fechada (inativa) e assim favorecer a conformação aberta (ativa) (Shah et al, 2002).

O domínio catalítico é uma região próxima à alça de ativação e que acomoda o MI quando este se encontra ligado à proteína BCR-ABL e, portanto mutações nesta região também podem influenciar sua ligação (Shah et al, 2002).

2. OBJETIVOS

- 1) Acompanhamento molecular através da técnica de PCR em tempo real (QRT-PCR) dos pacientes tratados com MI, mensalmente até atingir a resposta molecular completa e a cada 3 meses após atingir a resposta molecular completa.
- 2) Seqüenciamento do material genético dos pacientes ao diagnóstico e no momento do desenvolvimento da resistência ao MI para caracterizar se a mutação é um evento inicial da doença ou se houve seleção do clone com mutação durante o tratamento.
- 3) Estudar a expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* através do emprego da técnica de QRT-PCR nas amostras de pacientes tratados com MI ao diagnóstico para verificar o valor preditivo deste mecanismo na resposta ao tratamento.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram acompanhados 61 pacientes, 33 (54,1%) do sexo masculino e 28 (45,9%) do feminino, com idade média de 45,5 anos (18,4 – 72,8 anos), portadores de leucemia mielóide crônica em fase crônica do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, tratados com mesilato de imatinibe e com início de tratamento em até 12 meses após o diagnóstico.

O diagnóstico confirmatório foi realizado pela pesquisa de cromossomo Ph por citogenética de bandamento G e/ou PCR qualitativa para o gene *BCR-ABL*. O primeiro paciente foi incluído em outubro de 2005 e o último em setembro de 2007 e a última visita médica em setembro de 2008. Os pacientes foram acompanhados através do teste de RTQ-PCR até setembro de 2008. O surgimento de resistência ao tratamento com MI foi definido pelos critérios de falha ao tratamento segundo o Leukemia Net:

1. Menos que resposta citogenética parcial aos 12 meses de tratamento.
2. Perda da RCC em qualquer momento.

Dentre o grupo de 61 pacientes 8 (13%) foram considerados resistentes pelos critérios citados acima. As características do grupo de pacientes incluídos neste estudo estão descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4: Características do grupo de pacientes incluídos no estudo: N (número de pacientes de cada grupo), sexo, idade média, fase da doença e intervalo de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento com MI.

	Respondedores	Resistentes
N	53 (87%)	8 (13%)
Sexo	31 (51%)	2 (3%)
Masculino	22 (36%)	6 (10%)
Feminino		
Idade média (anos)	45,85 (18,6-70,7)	43,5 (18,4-72,8)
Fase da doença	Crônica	Crônica
Intervalo entre diagnóstico e início do tratamento (meses)	0,80 (0,00-9,07)	2,28 (0,87-11,93)

O projeto para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 28 de julho de 2005 (protocolo nº 583/05) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi entregue e assinado pelos pacientes incluídos no estudo

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de RNA

Para a obtenção do botão de leucócitos, foram utilizados 20mL de sangue periférico, colhidos em tubo contendo EDTA, e o mesmo volume de tampão de lise (1 mM NH_4HCO_3 ; 14 mM NH_4Cl). A solução foi então acondicionada em gelo e mantida em agitação por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, a solução foi submetida à centrifugação a 4°C, 3.000 rpm por 15 minutos. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado e uma segunda lavagem foi realizada. O sobrenadante foi novamente desprezado e o botão de leucócitos foi ressuspensionado em 1mL de TrizolTM reagente (Invitrogen, USA). Então, foram adicionados 200µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas manualmente e centrifugadas a 4°C, 12.000 g por 15 minutos. A fase aquosa foi separada em um novo tubo e precipitada com isopropanol. Após descanso de 10 minutos em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas a 4°C, 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de RNA foi lavado com etanol 70%, centrifugando-se as amostras a 4°C, 12.000 g por 5 minutos. O etanol foi descartado e o botão de RNA foi brevemente seco e ressuspensionado em água MiliQ estéril com DEPEC em volume proporcional ao tamanho e estocado em freezer -80°C. A integridade do RNA obtido foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% para a visualização das bandas 18S e 28S referentes ao RNA ribossomal.

A concentração do RNA obtido foi medida em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA). Só foram utilizadas as amostras de RNA que apresentaram relação A_{280}/A_{260} igual a 0,5 e as bandas 18S e 28S íntegras.

Figura 6. Foto de gel de agarose 8% para avaliação da integridade do RNA. As bandas 28S e 18S que indicam a integridade do RNA estão indicadas pelas setas.

3.2.2 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Após a extração de RNA, o cDNA foi sintetizado para que a reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa e quantitativa fosse realizada, bem como o seqüenciamento, para tanto utilizamos o *kit* Super Script™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA).

Em um microtubo estéril e livre de nucleases, adicionamos água MiliQ autoclavada em volume proporcional ao volume de RNA necessário para que obtivéssemos 1µg de RNA. O volume final entre água e RNA não deve ultrapassar

10µL. Então, foram adicionados 2µL de uma solução 0,3µg/µL de oligonucleotídeos não específicos (Invitrogen, USA) e 1µL de uma mistura de dNTPs na concentração de 10mM (10mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP). A solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e logo após colocada no gelo. Posteriormente, foram adicionados 5µL do tampão 5X que acompanha o a enzima, 2µL de DTT 0,1M e 1µL da enzima SuperScript III RT (200U/µL). Foi realizada uma nova incubação a 25°C por 10 minutos, seguida de 42°C por 50 minutos e para finalizar, 70°C por 15 minutos. Após a síntese, o cDNA foi armazenado em freezer a -20°C.

3.2.3 PCR QUALITATIVA PARA PESQUISA DA QUEBRA DA FUSÃO *BCR-ABL*

Após a síntese do cDNA realizamos a PCR qualitativa a fim de identificarmos o tipo de transcrito *BCR-ABL* que o paciente apresentava, b3a2 ou b2a2. A reação foi padronizada utilizando 0,15µL de Platinum TaqPolymerase 5U/µL (Invitrogen,USA), 2,5µl de tampão 10X que acompanha o kit da enzima, 1µL de MgCl₂ 50mM, 0,5µL de dNTP 10mM, 1µL de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, senso e antisenso 10pmol/µL, água estéril para o volume final de cada reação de 25µL. Após a mistura dos reagentes pipetamos 1µL de cDNA. A PCR foi então, incubada em um termociclador PTC-200 (MJ Research) e amplificadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 30 segundos, 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de 16°C por 8 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2% coradas com brometo de etídeo.

Tabela 5. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR qualitativa para pesquisa da quebra da fusão *BCR-ABL*

	SEQÜÊNCIA
BCR b1-A	5' GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC 3'
ABL a3-B	5' GTTTGGGCTTCACACCCATTCC 3'
BCR b2-C	5' CAGATGCTGACCAACTCGTGT 3'
ABL A3-D	5' TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA 3'

3.2.4 CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TRANSCRITO *BCR-ABL*.

As curvas padrões foram preparadas através de clonagem do fragmento do gene *BCR-ABL*, b3a2 e b2a2, amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das quebras. Para a amplificação de quebra b3a2 utilizamos a linhagem celular K562 e para a quebra b2a2, células mononucleares de uma paciente que apresentava esta quebra. Além destes dois fragmentos, também clonamos o gene *BCR* que foi utilizado como gene interno. Os fragmentos amplificados foram

clonados através do kit comercial TOPO TA™ (Invitrogen, USA). A um tubo limpo, adicionamos 3µL do produto de PCR, 1µL de solução salina, 1µL de vetor TOPO® e água q.s.p 6µL. Esta mistura foi agitada gentilmente e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo a reação foi colocada no gelo e após seu resfriamento adicionamos 2µL desta reação a One Shot® Chemically Competent *E.Coli*, misturando gentilmente. A reação foi então colocada no gelo por 30 minutos. Transcorrido este tempo realizamos um choque térmico para a transformação da bactéria, incubando a reação a 42°C por 30 segundos sem agitação. Imediatamente transferimos a reação para o gelo, adicionamos 250µL de meio S.O.C. à temperatura ambiente e mantivemos o tubo sob agitação horizontal a 37°C por 1 hora. Antes de iniciar o procedimento de transformação preparamos duas placas de Petri, com meio de cultura Luria-Bertani (LB) (1g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl e água Milli-Q q.s.p. 100mL), uma com ampicilina 100µg/mL e outra sem. O crescimento de colônias na placa com ampicilina e ausência de crescimento na placa sem ampicilina indicavam, respectivamente, que as bactérias que tinham crescido continham o vetor de interesse, o qual confere à bactéria resistência à ampicilina e a esterilidade do meio.

O plaqueamento foi realizado utilizando-se todo o volume da solução contendo a bactéria e foi incubado à 37° por uma noite sem agitação.

No dia seguinte pudemos observar o crescimento de colônias, as quais foram transferidas para meio de cultura LB líquido com 100µg/mL de ampicilina. A reação foi incubada a 37°C por mais uma noite e o crescimento da bactéria foi constatado devido à turvação do meio.

3.2.5 PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO

Após a clonagem o DNA do plasmídeo foi purificado utilizando-se o S.N.A.P.TM Miniprep (Invitrogen,USA).

A purificação foi realizada a partir da centrifugação o meio líquido LB que estava incubado à 37°C. O sobrenadante foi desprezado e o botão obtido após a centrifugação acrescido de 150µL de “Resuspension Buffer” e 150µL de “Lysis Buffer”. Esta reação foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, foi adicionado 150µL de “Precipitation Salt” gelado e homogeneizado por inversão. A centrifugação foi realizada à temperatura ambiente, por 5 minutos a 14.000 x g em microcentrífuga (Centrifuge 5415C, eppendorf).

O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5mL estéril e o botão gelatinoso desprezado após a centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado 600µL de “Binding Buffer” e homogeneizado por inversão. O volume total foi transferido para a parte superior da coluna e submetido à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g. O volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado. Na parte superior da coluna foi adicionado 500µL de “Wash Buffer”, e submetido à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g, o volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado.

Nesta fase foi adicionado 900µL de “Final Wash” 1X e a coluna foi submetida à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g. O volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado e a coluna foi submetida à centrifugação em velocidade máxima para secar a resina.

A coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5mL estéril e na parte superior foi pipetado 60µL de água Milli Q estéril. Após ficar incubada por 3 minutos em temperatura ambiente, a coluna foi submetida à centrifugação em velocidade máxima por 30 segundos. Nesta fase o DNA estava eluído na água milli-Q e a coluna foi descartada.

3.2.6 DIGESTÃO DO PLASMÍDEO

A enzima escolhida para a digestão foi a enzima de restrição Hind III (Invitrogen, USA) por não apresentar sítio de restrição na região do inserto.

A digestão foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 20µL do DNA de plasmídeo foi acrescido de 20U da enzima de restrição, 1X do tampão da enzima REact[®] 2 (Invitrogen, USA) e água Milli Q estéril q.s.p. 40µL. A reação ficou por uma noite em banho à 37°C e no dia seguinte, foi acrescida de 1µL de glicogênio, 1:10 do volume inicial de acetato de sódio (C₂H₃NaO₂) 3M e etanol gelado absoluto 2,5 vezes o volume inicial.

A reação permaneceu por 1 hora em freezer a - 80°C, sendo submetida após este período à centrifugação por 15 minutos em microcentrífuga (Centrifuge 5415C, eppendorf) em velocidade máxima. O sobrenadante foi desprezado e a reação permaneceu a temperatura ambiente até secar. O botão foi ressuspendido em 30µL de água Milli-Q estéril.

A reação de digestão foi submetida a um gel de agarose 1% para verificar a eficiência da enzima de restrição.

3.2.7 QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO PLASMÍDEO

Após o processo de digestão o DNA do plasmídeo foi quantificado utilizando espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280nm. A concentração encontrada foi utilizada no cálculo de moléculas/ μ L conforme a fórmula descrita:

$$\text{No de moléculas}/\mu\text{L} = \text{Xg}/\mu\text{L DNA} / [\text{n}^\circ \text{ pares de base do plasmídeo} \times 6,022 \times 10^{23}]$$

A partir desse resultado preparamos diluições seriadas com intervalos de 1 Log.

Figura 7: Curva padrão utilizada para a quantificação do transcrito BCR-ABL e do gene interno BCR com intervalos de 1log, 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias para cada um dos genes.

3.2.8 RT-PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DO TRANSCRITO *BCR-ABL*

As PCRs quantitativas para quantificação do número de transcritos *BCR-ABL* foram realizadas no equipamento Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Austrália), utilizando o sistema Taqman de sondas de hibridização (Applied Biosystems, USA).

Para quantificarmos cada transcrito *BCR-ABL* foram preparadas duas reações, uma para o gene alvo (quebra b3a2 ou b2a2) e outra para o gene interno *BCR*. As sondas utilizadas foram marcadas com FAM (repórter) em 5' e TAMRA (*quencher*) em 3'. Cada amostra foi quantificada em duplicata tanto para o gene alvo como para o gene interno e a curva padrão, controle negativo, controle positivo e branco foram realizadas uma única vez em cada corrida. Para cada amostra a reação foi realizada com volume final de 15µL da seguinte forma: 1X de Taqman Master Mix (Applied Biosystems, USA), sonda a uma concentração final de 0,1µM, primer senso e antisenso a uma concentração final de 0,2µM, 1,5µL de cDNA e água estéril para um volume final de 15µL. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores e das sondas utilizados na quantificação do transcrito BCR-ABL estão descritas nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 6. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para quantificação do número de transcritos *BCR-ABL*.

SEQUÊNCIA		
<i>BCR-ABL</i> b2a2	senso	5' ATC CGT GGA GCT GCA GAT G 3'
	antisenso	5' CGC TGA AGG GCT TCT TCC TT 3'
<i>BCR-ABL</i> b3a2	senso	5' GGG CTC TAT GGG TTT CTG AAT G 3'
	antisenso	5' CGC TGA AGG GCT TTT GAA CT 3'
<i>BCR</i>	senso	5' CCT TCG ACG TCA ATA ACA AGG AT 3'
	antisenso	5' CCT GCG ATG GCG TTC AC 3'

Tabela 7. Sequência das sondas utilizadas na PCR em tempo real para quantificação do número de transcritos *BCR-ABL*.

SEQUÊNCIA	
BCR-ABL b2a2	5' CCA ACT CGT GTG TGA AAC TCC AGA CTG TCC 3'
BCR-ABL b3a2	5' CAT CGT CCA CTC AGC CAC TGG ATT TAA GC 3'
BCR	5' TCC ATC TCG CTC ATC ATC ACC GAC A 3'

Os ciclos para a amplificação das amostras foram os seguintes: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minutos. Para validarmos uma corrida a eficiência da curva deveria estar próxima de 100%, a inclinação da reta ("slope") próximo de 3,3 e o R, de 1. O resultado obtido foi expresso como a relação do número de transcritos *BCR-ABL*

(b2a2 ou b3a2) pelo número de transcritos do gene interno *BCR*, o que compensa as variações de qualidade do RNA e da síntese do cDNA. O valor foi comparado a um "baseline" (68%) determinado no laboratório quantificando-se o número de transcritos *BCR-ABL* de 30 pacientes portadores de LMC ao diagnóstico. Como o "baseline" obtido não foi de 100%, calculamos um fator de correção de 1,47 para que pudéssemos comparar os valores obtidos a uma escala internacional, na qual o "baseline" é de 100% e a RMM é de 0,1%. Os valores de *BCR-ABL* (%) da escala internacional estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Valores de *BCR-ABL* da escala internacional

Número de transcritos <i>BCR-ABL</i> (%)	Escala logarítmica (log)
100	0
10	1
1	2
0,1	3*
0,01	4**

*Resposta Molecular Maior (RMM)

**Resposta Molecular Completa

Cálculo do fator de correção:

$$F.C = 100(\%)/68(\%) = 1,47$$

3.2.9 RT-PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS GENES *MDR1* e *BCRP*.

O número de cópias dos genes *MDR1* e *BCRP* foi determinado utilizando-se Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, USA), um corante fluorescente intercalante de DNA que é captado pelo termociclador a cada novo ciclo da reação de PCR e permite que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra. O gene interno utilizado para esta análise foi o *ABL*.

O volume total de reação de 15µL foi composto de: 1µl de cDNA, 1X Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen[™], USA), e 3pmol de cada iniciador para cada um dos genes estudados *MDR1*, *BCRP* e *ABL*, este último utilizado como gene interno.

O protocolo de amplificação constituiu-se de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os iniciadores utilizados nesta reação de qPCR encontram –se descritos na Tabela 9. Todas as reações foram realizadas em termociclador (Rotorgene[™] 3000, Corbett Research, Australia) e compostas de um controle negativo (linfócitos de doadores normais) e um controle de contaminação da reação ausente de cDNA. A quantificação relativa foi avaliada pela relação do Ct (“threshold cycle”) obtido na amostra dos pacientes em relação ao Ct de linfócitos de doadores voluntários normais.

O Ct é o primeiro ciclo de amplificação, no qual o “amplicon” de DNA é detectado acima da linha basal. Desta forma, os possíveis fatores interferentes, associados aos estágios tardios da reação são minimizados.

A partir dos valores de Ct encontrados, foi calculado o valor do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, 2001), onde:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

com, E= eficiência da reação de PCR

ΔCt do gene alvo = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra controle (Ct médio dos linfócitos normais) para este gene.

ΔCt do gene controle = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra controle (Ct médio dos linfócitos normais) para este gene.

De modo a comprovar a eficiência da reação, realizamos diluições seriadas de cDNA tanto para o gene alvo como para o gene interno. Isto resultou em variações no valor do Ct visto que quanto mais diluída a amostra mais tardiamente aparece a amplificação. A partir dos valores de Ct de cada uma das diluições, o termociclador desenha uma reta, formada a partir dos valores do Ct e da concentração da amostra em cada uma das diluições. As reações que apresentaram eficiência próxima a 100% e inclinação da reta (“slope”) entre 3,1 e 3,9 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação “melting”, a qual foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico. As seqüências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo da expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* estão descritas na **Tabela 9**.

Tabela 9. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no estudo da expressão dos genes *MDR1* e *BCRP*.

GENES		SEQÜÊNCIA
<i>MDR1</i>	senso	5' CTC ATG ATG ATG CTG GTG TTG G 3'
	antisenso	5' TGG TCA TGT CTT CCT CCT CCA GA 3'
<i>BCRP</i>	senso	5' TTC GGC TTG CAA CAA CTA TG 3'
	antisenso	5' TCC AGA CAC ACC ACG GAT AA 3'

3.2.10 SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO DOMÍNIO QUINASE DO GENE *ABL*

A pesquisa de mutações do domínio quinase do gene *ABL* foi realizada pela técnica de seqüenciamento direto. Para tanto as amostras foram amplificadas por uma PCR “seminested” para obtermos o fragmento de interesse. Nesta reação utilizamos 0,3µL de enzima Platinum TaqPolymerase High Fidelity 5U/µL (Invitrogen,USA), 5µL de tampão 10X, 1µL de dNTPs 10mM, 1,5µL de MgSO₄ 50mM, 2µL dos iniciadores senso e antisenso 10pmol/µL, água estéril para completarmos o volume final da reação de 50µL e 2µL de cDNA.

Na primeira fase desta reação empregamos o iniciador senso localizado no exon 2 do gene *BCR* e o anti-senso na região de quinase do gene *ABL*. Já na segunda fase, o produto de reação da primeira fase foi amplificado novamente seguindo o mesmo protocolo, porém com o iniciador senso da região quinase do gene *ABL* e o mesmo iniciador anti-senso da primeira reação. Este tipo de PCR é denominado de

“seminested”. A reação foi realizada em termociclador PTC 200 (MJ Research, USA) e o parâmetro de amplificação foi: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 68°C por 2 minutos e 1 ciclo a 68°C por 10 minutos. O produto final da reação foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no seqüenciamento direto estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Seqüências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no seqüenciamento do domínio quinase do gene *BCR-ABL*.

SEQÜÊNCIA	
BCR F	5´ TGA CCA ACT CGT GTC TGA AAC TC 3´
ABL Kinase F	5´ CGC AAC AAG CCC ACT GTC T 3´
ABL Kinase R	5´ TCC ACT TCG TCT GAG ATA CTG GAT T 3´

Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o Perfectprep® Gel Cleanup (Eppendorf, Alemanha) e dosadas para determinarmos a concentração do produto de PCR obtido em um espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA). A partir daí realizamos a reação de seqüenciamento no sentido 5´ (senso) e 3´ (antisenso) utilizando o kit BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA). Para um volume final de reação de 10µL para cada amostra, a reação de seqüenciamento foi realizada com aproximadamente 100ng de produto de PCR purificado, 2pmol de oligonucleotídeos iniciadores (ABL kinase F para o sentido 5´ e ABL kinase R para o 3´), 1µL de BigDye, 1µL de tampão 5X e água suficiente para completar o volume final de 10µL. A reação foi incubada

em tremociclador PTC-200 (MJ Research, USA) com os seguintes parâmetros: 1 ciclo a 96°C por 1 minuto, 40 ciclos a 94°C por 10 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 2 minutos. Ao término da incubação as amostras foram transferidas para uma placa de seqüenciamento e o produto foi precipitado com 100µL de isopropanol 65% e deixado em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Transcorrido esse tempo a placa foi centrifugada a 4000rpm por 35 minutos e o isopropanol foi removido por inversão. Adicionamos 100µL de etanol 60% e a placa foi novamente centrifugada a 4000rpm por 10 minutos. Ao término deste tempo o etanol foi desprezado por inversão. Esta etapa de lavagem com etanol foi repetida mais uma vez e então centrifugamos a placa invertida sobre papel absorvente a 600rpm por 30 segundos para que todo etanol fosse removido.

Depois de precipitadas as amostras foram desnaturadas com 10µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, USA) a 95°C por 5 minutos e imediatamente após este tempo a placa foi colocada em gelo. As amostras foram analisadas em um seqüenciador automático GA 3130 (Applied Biosystems, USA), com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems, USA). Para pesquisarmos a presença ou não de mutações no domínio quinase do gene *ABL* utilizamos o software MutationSurveyor V3.10 (SoftGenetics, USA) que alinha as seqüências senso e anti-senso geradas pelo seqüenciamento com uma seqüência referência de mRNA do GenBank (X16416). Utilizamos como critério para confirmação de uma mutação a presença da mesma tanto na fita senso como anti-senso.

3.2.11 ASO-PCR PARA PESQUISA DA MUTAÇÃO T315I

Para a pesquisa da mutação do domínio quinase T315I ao diagnóstico utilizamos a reação em cadeia da polimerase alelo específica, na qual o oligonucleotídeo iniciador utilizado possui a sequência da mutação a ser pesquisada. Para esta reação utilizamos 1X Platinum[®] SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen[™], USA), 0,5X PCR Enhancer (Invitrogen, USA), 20pmol de cada um dos iniciadores, 2µL de cDNA diluído 1:10 e água qsp para 15µL. Experimentos preliminares demonstraram a sensibilidade do ensaio pode ser aumentada com a diluição 1:10 do cDNA, apesar de a razão para isso ser desconhecida.

O protocolo de amplificação constituiu-se de 50 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os iniciadores utilizados nesta reação da ASO-PCR encontram-se descritos na Tabela 9. Todas as reações foram realizadas em termociclador (Rotorgene[™] 3000, Corbett Research, Australia). Utilizamos como controle negativo cDNA de células K562 que possuem *BCR-ABL* tipo selvagem e portanto não podem amplificar para a mutação, como controle positivo cDNA de um paciente com a presença da mutação T315I e um controle de contaminação da reação ausente de cDNA. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na ASO-PCR estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na ASO-PCR.

	SEQUÊNCIA
Bcr 2671F	5'ACTCCAGACTGTCCACAGCAT 3'
315R	5'CGTAGGTCATGAACTCAA 3'

As amostras foram consideradas como positivas quando a curva de “melting” correspondente ocorreu à mesma temperatura do controle positivo e tanto o controle negativo como o branco não apresentarem amplificação específica (Willis et al, 2005).

3.11.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliarmos a diferença de expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* entre os grupos de pacientes que respondem e pacientes resistentes ao tratamento com MI utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A diferença de resposta aos 3 meses de tratamento entre os grupos com menos de 1% de transcritos *BCR-ABL* e com 1% ou mais foi analisada pelo teste Log-Rank. Para ambos os testes o nível de significância adotado foi de 5%, utilizando-se o programa SPSS for Windows versão 16.0.

4 RESULTADOS

4.1 RT-PCR QUALITATIVA PARA PESQUISA DA FUSÃO *BCR-ABL*

A PCR qualitativa para pesquisa da fusão *BCR-ABL* foi realizada tanto para confirmação do diagnóstico de LMC como para que pudéssemos definir qual a quebra de um determinado paciente e assim posteriormente realizarmos a PCR em tempo real monitorando o número de transcritos *BCR-ABL* ao longo do tratamento. A reação foi realizada segundo o item 3.2.3 e após a corrida em gel de agarose 2% visualizamos produtos de PCR com 417 bp e 342 bp para a quebra b3a2 e b2a2, respectivamente. Todos os pacientes incluídos neste estudo foram *BCR-ABL* positivos e 36/61 (59%) possuem quebra b3a2, 24/61 (39%) a quebra b2a2 e 1 (2%) paciente ambas as quebras.

Figura 8. Foto de gel de agarose 2% para visualização dos produtos de PCR para a pesquisa da quebra do transcrito *BCR-ABL*. O produto de 417 bp corresponde à quebra b3a2 (b3) e o de 342 bp à b2a2 (b2). As amostras A1 e A3 foram negativas. B: branco ou ausência de amostra. C-: controle negativo. M: marcador de 100bp.

4.2 SEQUENCIAMENTO DIRETO DO DOMÍNIO QUINASE DO GENE *BCR-ABL*

Todas as amostras pré-tratamento dos pacientes incluídos neste estudo foram sequenciadas a fim de verificarmos a presença de mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL* antes do início do tratamento com MI. A amplificação das amostras foi realizada segundo o item 3.2.10 e o produto de PCR obtido na 1ª fase da reação foi visualizado em gel de agarose 2% com 1530 pares de base (PB). Caso o produto de PCR estivesse fraco ou não fosse visualizado realizamos a 2ª fase da reação ou “seminested”. O novo produto da PCR, agora com 863 pares de base foi visualizado em gel de agarose 2%. Não observamos a presença de mutações em nenhuma das 61 amostras pré-tratamento analisadas pela técnica de sequenciamento direto.

Figura 9. Visualização do produto da 1ª fase da PCR para amplificação do domínio quinase do gene *BCR-ABL* com 1530 bp. M: marcador de 100bp. B: branco ou ausência de amostra. C-: controle negativo. A: amostra.

Figura 10. Visualização do produto da 2ª fase da PCR para amplificação do domínio quinase do gene *BCR-ABL* com 863 bp. M: marcador de 100bp. A: amostra. C+: controle negativo. B: branco ou ausência de amostra.

Ao longo do acompanhamento 8 (13,1%) pacientes apresentaram falha ao tratamento, sendo que dois deles apresentaram as mutações Q252H e G250E, localizadas no sítio de ligação do ATP (alça de fosfato).

Figura 11. Eletroferograma da mutação Q252H. A troca de um nucleotídeo guanina (G - em preto) por uma timina (T - em vermelho) resulta na troca de um aminoácido glutanina por uma histidina.

Figura 12: Eletroferograma da mutação G250E. Presença de dupla população guanina e adenina que confere a troca de uma glicina por um ácido glutâmico.

4.3 ASO-PCR PARA PESQUISA DA MUTAÇÃO T315I AO DIAGNÓSTICO

A pesquisa da mutação T315I por ASO-PCR foi realizada nas amostras pré-tratamento de todos os pacientes incluídos neste estudo já que esta mutação confere total resistência ao MI. A ASO-PCR foi a metodologia escolhida por apresentar maior sensibilidade (0,01%) quando comparada ao sequenciamento direto (10%).

Todas as 61 amostras analisadas foram negativas para a mutação T315I.

Figura 13: Curva de dissociação da ASO-PCR realizada para pesquisa de mutação T315I em amostras pré-tratamento. Pico máximo de fluorescência entre 85 e 90°C. As amostras foram consideradas positivas quando amplificadas na mesma temperatura de dissociação do controle positivo (C+).

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *MDR1* E *BCRP* NAS AMOSTRAS PRÉ-TRATAMENTO.

A expressão relativa dos genes *MDR1* e *BCRP*, responsáveis pelo efluxo da droga foi avaliada em todas nas amostras pré-tratamento dos pacientes deste estudo. Uma amostra foi considerada positiva quando o resultado obtido foi maior que a mediana de expressão do gene ao diagnóstico.

A mediana de expressão do gene *MDR1* ao diagnóstico foi 0,27 (0,007-3,5), sendo que o grupo de pacientes respondedores apresentou uma mediana de 0,26 e o grupo de pacientes resistentes de 0,41. Ao correlacionarmos a expressão do gene *MDR1* entre os dois grupos não houve diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, teste Mann-Whitney).

A mesma análise foi realizada para a avaliação da expressão do gene *BCRP*. A mediana de expressão deste gene nas amostras pré-tratamento foi de 0,30 (0,01-1,8), sendo que a mediana do grupo de pacientes respondedores foi de 0,32 e a do grupo de resistentes foi de 0,2. Quando correlacionamos os dois grupos não houve diferença estatística significativa ($p = \text{NS}$, teste Mann-Whitney U). As medianas da expressão ao diagnóstico dos genes *MDR1* e *BCRP* estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12. Mediana da expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* ao diagnóstico de pacientes respondedores e resistentes.

Gene	Respondedores (N=53)	Resistentes (N=8)	p
<i>MDR1</i>	0,26	0,41	NS
<i>BCRP</i>	0,32	0,20	NS

Figura 14. Gráfico da expressão do gene *MDRI* ao diagnóstico do grupo atingiu a RCC aos 12 meses, com mediana de 0,26 e do grupo resistente, com mediana de 0,41.

Figura 15. Gráfico da expressão do gene *BCRP* ao diagnóstico do grupo que atingiu RCC aos 12 meses, com mediana de 0,32 e do grupo resistente, com mediana de 0,20.

4.5 ACOMPANHAMENTO MENSAL DO NÚMERO DE TRANSCRITOS *BCR-ABL*

Todos os pacientes foram acompanhados mensalmente até atingirem a RMM através da quantificação dos transcritos *BCR-ABL* para que pudéssemos monitorar a resposta ao tratamento com MI. Após 12 meses de acompanhamento 27/61 (44,3%) dos pacientes atingiram a RMM, com uma mediana 6,5 meses entre o início do tratamento até a RMM. Quando analisamos a resposta aos 3 meses de tratamento observamos que os pacientes que apresentaram um número de transcritos *BCR-ABL* menor que 1% neste período atingiram a RMM aos 7 meses de tratamento, enquanto que aqueles que apresentaram número de transcritos igual a 1% ou mais atingiram-na em 12 meses com diferença estatística significativa ($p = 0,03$, teste Log rank).

Figura16. Gráfico: Probabilidade de atingir a RMM dependendo da relação *BCR-ABL/BCR* aos 3 meses de tratamento com mesilato de imatinibe.

Figura 17. Gráfico de monitorização do número de transcritos *BCR-ABL* de um paciente que responde ao tratamento com MI, com número decrescente de transcritos.

Figura 18. Gráfico de número de transcritos *BCR-ABL* de um paciente que perdeu a resposta ao tratamento com MI após atingir a RMM.

5. DISCUSSÃO

A LMC é uma das doenças malignas humanas mais estudadas e melhor caracterizadas, sendo o primeiro câncer a ser associado a uma anormalidade cromossômica e servindo de modelo para outras doenças malignas. O entendimento das bases celulares e moleculares da LMC permitiu o desenvolvimento de novas terapias e métodos de acompanhamento mais sensíveis e acurados (Jabbour et al, 2008). A introdução dos inibidores de tirosina quinase, uma terapia alvo, alterou o curso natural da doença. A primeira droga desta classe a ser utilizada para uso clínico foi o MI que apresentou taxas de remissões impressionantes e com boa tolerância, o que o levou a ser considerado como terapia de primeira escolha para pacientes com LMC (Druker et al, 2001). Com o uso do MI foram estabelecidos critérios de resposta ao tratamento (Baccarani, 2006). Tanto a RCC como a RMM possuem uma associação significativa com a sobrevida livre de progressão. O estudo IRIS mostrou que nenhum dos pacientes com RCC e RMM aos 12 meses de tratamento progrediu para a fase acelerada ou crise blástica após 60 meses de acompanhamento (Druker et al, 2006). Apesar das altas taxas de resposta ao tratamento com MI uma parcela dos pacientes apresenta resistência primária ou secundária e por isso, um dos maiores desafios no tratamento da LMC é a identificação de marcadores capazes de predizer a resposta ao MI (Volpe et al, 2008). Um dos mecanismos de resistência ao MI mais frequentes são as mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL* que impedem ou interferem na ligação da droga ao seu alvo diminuindo a sua ação (Branford et al, 2002). Além deste mecanismo, alguns estudos *in vitro* demonstraram que o MI pode ser substrato para os transportadores de efluxo de drogas como ABCB1 ou MDR e

ABCG2 ou BCRP, o que acarretaria uma redução da concentração intracelular de droga reduzindo sua ação (Mahon et al, 2003; Burger et al, 2004).

Neste estudo foi investigada a presença de mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL* e a expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas *MDR1* e *BCRP* nas amostras pré-tratamento de 61 pacientes com LMC em fase crônica tratados com MI a fim de detectar precocemente uma possível resistência e verificar o valor preditivo destes mecanismos em relação à resposta ao tratamento. No caso de surgimento de resistência foi realizada uma nova pesquisa de mutação. O acompanhamento mensal do número de transcritos *BCR-ABL* foi realizado com o objetivo de detectar precocemente o seu aumento, já que este é considerado um marcador de perda de resposta ao tratamento e indicador para estudo de mutação do gene *BCR-ABL*. Branford et al demonstrou que pacientes com aumento de 2 vezes o número de transcritos em relação à quantificação anterior possuem maior incidência de mutações do gene *BCR-ABL* (Branford et al, 2004).

A pesquisa de mutações do domínio quinase do gene *BCR-ABL* foi realizada pelo seqüenciamento direto que apesar de apresentar uma sensibilidade de cerca 10%, permite uma análise do domínio quinase do gene *BCR-ABL* como um todo, podendo detectar uma ou mais mutações em pacientes em diferentes estágios de resposta ao tratamento (Branford, 2003).

O seqüenciamento direto não detectou nenhuma mutação nos 61 pacientes estudados na amostra pré-tratamento. Este resultado está em concordância com outros estudos realizados (Branford et al, 2003; Willis et al, 2005). Ao longo do acompanhamento 8/61 (13,1%) dos pacientes apresentaram falha ao tratamento, ou seja, apresentaram menos que uma resposta citogenética parcial (1-35% Ph) ou

perderam a RCC, segundo as recomendações do Leukemia Net (Baccarani, 2006) e então foi realizada uma nova pesquisa de mutação do gene *BCR-ABL*. Destes 8 pacientes 2 (25%) apresentaram mutações na alça de fosfato, uma mutação Q252H e uma G250E, que estão associadas a um pior prognóstico (Branford et al, 2003). O paciente com a mutação Q252H passou a receber um inibidor de tirosina quinase de segunda geração ao qual respondeu apresentando RMM e o paciente com a mutação G250E evoluiu para crise blástica e foi a óbito.

As amostras pré-tratamento foram testadas para a mutação T315I pela técnica ASO-PCR, pois apresenta maior sensibilidade (0,01%) do que o sequenciamento direto. Desta forma, amostras que apresentassem esta alteração genética não seriam elegíveis para o tratamento com MI ou qualquer outro inibidor de tirosina quinase de segunda geração. Nenhuma amostra apresentou a mutação T315I ao diagnóstico.

Os genes *MDR1* e *BCRP* fazem parte da família de transportadores ABC que são importantes no mecanismo de resistência a múltiplas drogas.

Estudos *in vitro* mostraram que MI é substrato tanto do *MDR1* como do *BCRP* e a expressão destes dois genes poderia estar relacionada com a resistência ao tratamento (Burger et al, 2004; Mahon et al, 2003), porém não está estabelecido o impacto destes transportadores na resposta ao tratamento de pacientes.

A expressão dos genes *MDR1* e *BCRP* nas 53 amostras pré-tratamento de pacientes que responderam e nas 8 que apresentaram falha ao tratamento, não mostrou diferença estatística significativa entre os dois grupos para ambos os genes. Estes dados são consistentes com estudos realizados anteriormente no qual a expressão de *MDR1* e *BCRP* em amostras pré-tratamento de pacientes respondedores e resistentes foi similar, porém a avaliação foi realizada em uma população

heterogênea, com pacientes com LMC em fase crônica, acelerada e crise blástica (Crosman et al, 2005; Wang et al, 2008). Neste estudo foi estabelecida uma população homogênea de pacientes com LMC em fase crônica precoce para verificar se o resultado poderia estar sendo influenciado pelas fases mais avançadas da doença. Assim, o aumento da expressão dos *MDR1* e *BCRP* não pode ser utilizado como mecanismo preditivo de resposta ao tratamento com MI.

Ao fim de 12 meses de acompanhamento 27/61 (44,3%) pacientes atingiram a RMM em 12 meses de tratamento em um intervalo de 6,5 meses. A taxa de redução dos transcritos *BCR-ABL* alcançada logo no início do tratamento com MI é um bom indicador de resposta subsequente. Pacientes que não atingiram 10% na relação *BCR-ABL/BCR* aos 3 meses possuem menor probabilidade de atingir a RMM (13%) aos 30 meses quando comparados com aqueles que apresentam menos de 1% (100%) e entre 1% e 10% (69%) (Hughes & Branford, 2006). Com base neste estudo foi observado em nossa população que pacientes com menos de 1% de transcritos aos 3 meses atingem a RMM mais precocemente com mediana de 7 meses que aqueles com número de transcritos de 1% a 10% e com mais de 10% onde a mediana foi de 12 meses com diferença estatística significativa e portanto podemos inferir que a resposta ao tratamento aos 3 meses pode ser utilizada como um fator com valor preditivo de resposta.

Em conclusão, o estudo de mutação ao diagnóstico não apresenta nenhum valor no acompanhamento dos pacientes em fase crônica tratados com MI em primeira linha e que o aparecimento destas mutações podem ser resultado do curso natural da doença. Por outro lado, o acompanhamento molecular precoce, isto é, desde o início do tratamento demonstrou que a redução do número de transcritos *BCR-ABL* aos 3

meses pós-início do tratamento é indicador de boa resposta e este grupo de pacientes vai atingir a RMM precocemente.

Quanto ao estudo da expressão dos genes *ABCB1* e *ABCG2* pré-tratamento não apresentou nenhuma valia na identificação de prováveis pacientes que por ventura não respondessem ao tratamento com o MI.

6. CONCLUSÕES

1. O acompanhamento mensal do número de transcritos *BCR-ABL* não se mostrou diferente do trimestral, porém nos 3 primeiros meses, a monitoração precoce pode auxiliar na avaliação daqueles pacientes com maior ou menor probabilidade de atingir a RMM, já que pacientes que apresentam menos de 1% aos 3 meses atingem a RMM (0,1% pela escala internacional) em período menor (mediana de 7 meses) do que aqueles que apresentam 1% ou mais (mediana de 12 meses).

2. O estudo de mutação ao diagnóstico não apresentou nenhum valor no acompanhamento dos pacientes em fase crônica tratados com MI em primeira linha e que o aparecimento destas mutações pode ser resultado do curso natural da doença como ficou demonstrado nos 2 pacientes resistentes que apresentaram mutação na alça de fosfato.

3. O aumento da expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas (*MDR1* e *BCRP*) em pacientes com LMC em fase crônica ao diagnóstico não apresentou correlação com o aparecimento de resistência secundária ao MI.

7. REFERÊNCIAS

Anafi M, Gazit A, Zehavi A, Ben-Neriah Y, Levitzki A. Tyrphostin-induced inhibition of p210bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood* 1993; 12: 3524-29.

Baccarani M, Saglio G, Goldman JM, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum E, Apperley JF, Cervantes F, Cortes J, Deininger MW, Gratwohl A, Guilhot et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from a expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2006; 108:1809-20.

Baskiewicz-masiuk M, Machalinski B. The role of STAT5 proteins in proliferation and apoptosis of CML and AML cells. *Eur J Haematol* 2004; 72: 420 – 29.

Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, Hasford J, Heimpel H, Hossfeld H, Kolb H-J, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Hehlmann R and the German CML-Study Group. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long term results from randomized studies. *Leukemia* 2005; 19: 984-89.

Bose S, Deininger M, Gora-Tybok J, Goldman JM, Melo JV. The presence of BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998; 92: 3362 – 67.

Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 2474 – 88.

Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP,

Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive cute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002; 99: 3472-3475.

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. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276-83.

Branford S, Rudzik Z, Parkinson I, Grigg A, Taylor K, Seymour JF, Durrant S, Browett P, Schwarer AP, Arthur C, Catalano C Leahy MF, Filshie R, Bradstock K, Herrmann R, Joske D, Lynch K, Hughes T. 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: 2926-2932.

Branford S, Hughes T. Protocol for diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. Imatinib Therapy: Value of Molecular Monitoring. Novartis Preceptorship Programme 2005.

Buchdunger E, Matter A, Druker BJ. Bcr-Abl inhibition as a modality of CML therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1551: M11-M18.

Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EAC, Stoter G, Nooter K. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*; 2004; 104: 2940-42.

Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Ferrer A, Cid J and Montserrat E. The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival. *Haematologica* 1999; 84:324-7.

Coppo P, Flamant S, De Mas V, Jarrier P, Guillier M, Bonnet ML, Lacout C, Guilhot F, Vainchenker W, Turhan AG. BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br J Haematol*. 2006; 134: 171-79

Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hemato Oncol Clin N Am*. 2004; 18:569-84.

Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5531-41.

Crossman L, Druker B, Deininger M, Pirmohamed M, Wang L, Clark R. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005; 106: 1133-1134.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by p210^{bcr/abl} gene of Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-30.

Datta SR, Brunet A, Grennberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Dev*. 1999; 13: 2905 – 27.

Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-56.

Deininger MWN and Druker B J. Specific target therapy of chronic myelogenous leukemia with Imatinib. *Pharmacol Rev* 2003; 55:401-23.

Deininger MW, McGreevey L, Willis S, Bainbridge TM, Druker BJ, Heinrich MC. Detection of ABL kinase domain mutation with denaturing high performance liquid chromatography. *Leukemia* 2004; 18: 864-871.

Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2640-53.a

Deininger MW. Manegement of early stage disease. *Hematology* 2005; 174-82.b

Dieckmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 1991; 351: 400-2.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344 (14): 1031-7.

Druker B, Guilhot F, O'Brien S, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger M, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408 – 17.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann Intern Med* 1999; 131:207-19.

Fausel C. Targeted Chronic Myeloid Leukemia Terapy: Seeking a Cure. Supplement to *JMCP* 2007; 13: 8-12.

Galimberti S, Cervetti G, Guerrini F, Testi R, Pacini S, Fazzi R, Simi P, Petrini M. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with

chronic myeloid leukemia during imatinib treatment. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2005, 162: 57-62.

Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelle P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Incalci M. Role of $\alpha 1$ acid glycoprotein in the *in vivo* resistance of human BCR-ABL+ leukemic cells to the Abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 2000; 20: 1641-50.

Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2000; 110 (1): 2-11.

Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876-80.

Groffen J, Stephenson JR, Heinterkamp N, De Klein A, Bartram CR, Grosveld G: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984; 36: 93-9.

Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2003; 307: 824-828.

Heaney NB, Holyoake TL. Therapeutic targets in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol* 2007; 25: 66-75.

Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J et al. Randomized comparison of bussulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 1993; 82: 398-407.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic Myeloid Leukemia. *Lancet* 2007; 370:

342-50.

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NCP, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190-6.

Hochhaus A, Hughes T. Clinical resistance to imatinib: mechanisms and implications. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 641 – 56.

Houghton PJ, Germain GS, Harwood F, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, Traxler P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 *in vitro*. *Cancer Research* 2004; 64: 2333-7.

Hughes T, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley M, 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: 1423 – 32.

Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of *BCR-ABL* as a guide to clinical management in chronic myeloid leukemia. *Blood Reviews* 2006; 20:29-41.

Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NCP, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kame-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring 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:

28-37.

Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitor and prognostic implications. *Cancer* 2008; 112:2112-2118.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001.

Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Hemtol.* 2002; 107:76-94.

Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346: 654-52.

Kantarjian HM, Giles F, Quintás-Cardama, Cortez J. Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin Cancer Res* 2007; 13(4): 1089 – 97.

Keeshan K, Cotter TG, McKenna SL. High BCR-ABL expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia* 2002; 16: 1725 – 34.

Kozubek S, Lukasova E, Ryznar L et al. Distribution of ABL and BCR genes in cell nuclei of normal and irradiated lymphocytes. *Blood* 1997; 89: 4537-45.

Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias, *N. Engl. J. Med.* 1988; 319: 990-8.

Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, Bastie

JN, Degos L, Berthaud P, Marolleau JP, Calvo F, Chomienne C, Mahon FX, Rousselot P. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec[®]) *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1907-13.

Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The Oncologist* 2003; 8: 411-24.

Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. *Williams Hematology*. 7th Edition. USA: McGraw-Hill Medical, 2006.

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-08.

Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96: 1070-8.

Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; 101: 2368-1373.

Maru Y, Witte ON. The *BCR* gene encodes a novel serine /threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 1991; 67: 96-102.

Mauro MJ, O'Dwyer M, Heinrich MC, Druker BJ. STI571: A paradigm of new agents for cancer therapeutics. *J Clin Oncology* 2002; 20: 325 – 34.

Melo JM. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88:2375-84.

Melo J, Chuah c. Resistance to imatinibe mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Letters* 2007; 249: 121-32.

Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kriyan J. Crystal structure of the kinase domain of c-ABL in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Research* 2002; 62: 4236-43.

Nakanishi T, Shiozawa K, Hassel BA, Ross DD. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR_ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood* 2006; 108: 678-84.

Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, RARA α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 1999; 93:1197-207.

Nowell P, Hungerford D. A minute chromossome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960; 132:1497 – 1500.

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 myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 994 – 1004.

O'Hare T, Eide CA, Deininger MWN. BCR-ABL kinase domain mutations, drug

resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110:2242-49.

Okabe M, Uehara Y, Miyagishima T, et al. Effect of herbimycin A, antagonist of tyrosine kinase, on bcr/abl oncoprotein-associated cell proliferation: abrogative effect on the transformation of murine hematopoietic cells by transfection of a retroviral vector expressing oncoprotein P210bcr/abl and preferential inhibition on Ph1-positive leukemia cell growth. *Blood* 1992; 80: 1330 – 38.

Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44(9): 879-94.

Randolph TR. Chronic Myelocytic Leukemia – Part I: History, Clinical Presentation and Molecular Biology. *Clin. Lab. Science* 2005; 18(1):1-12. A

Randolph TR. Chronic Myelocytic Leukemia – Part II: Approches to and Molecular Monitoring of Therapy. *Clin. Lab. Science* 2005; 18(1):1-12. B

Ravandi F, Talpaz M, Estrov Z. Modulation of cellular signaling pathways: prospects for targeted therapy in hematological malignancies. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 535 – 50.

Redaelli A, Bell C, Casagrande J, et al: Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4:85.

Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 467-73.

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï JL, Philippe N, Facon T,

Fenaux P, Preudhomme C. *Blood* 2002; 100:1014-18.

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290 - 93.

Salesse S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR-ABL induced defects in integrin function in CML. *Oncogene* 2002; 21: 8605-11.

Sawyers CL, Mc Laughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77:121-31.

Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, Sawyers CL. Multiple *BCR-ABL* kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117-125.

Shtalrid M, Talpaz M, Blick M, Romero P, Kantarjian H, Taylor K, Trujillo J, Schachner J, Gutterman JU, Kurzrock R. Philadelphia –negative chronic myelogenous leukemia with breakpoint cluster region rearrangement : molecular analysis , clinical characteristics, and response to therapy. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1569-75.

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR-ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome – positive leukemias. *Blood* 1995; 86(2): 726 – 36.

Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, Iacobucci I, Amabile M, Abruzzese E, Orlandi E, Radaelli F, Ciccone F, Tiribelli M, Di Lorenzo R, Caracciolo C, Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G. 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: 7374-7379.

Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman M. Targeting Mutidrug resistance in cancer. *Nature* 2006; 5: 219-32.

Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2007; 1-11.

Thomas J, Wang L, Clarck RE, Pimohamed M. Active transport into and out of cells: implications for drug resistance. *Bood* 2004; 104(12): 3739-45.

Uemura N, Griffin JD. The adapter protein Crkl links CBL to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J Biol Chem*. 1999; 274: 37525-32.

Van Dongen JJM, Maccyntyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Sagli G, Gottardi, E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diás MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.

Van Etten RA. Cycling, stressed –out and nervous: cellular functions of c-ABL. *Trends Cell Biol*. 1999; 9:179-86.

Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms Underlying Abnormal Trafficking of Malignant Progenitors in Chronic Myelogenous Leukemia. *J. Clin. Invest.* 1992; 90:1232-41.

Volpe G, Panuzzo C, Ulisciani S, Cilloni D. Imatinib resistance in CML. *Cancer Lett* 2008, doi:10.1016/j.canlet.2008.06.003.

Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 258-64.

Wertheim JA, Forsythe K, Druker BJ, Hammer D, Boettiger D, Pear WS. BCR-ABL-induced adhesion defects are tyrosine-independent. *Blood* 2002; 99:4122-30.

Willis SG, Lange T, Demehri S, Otto S, Crossman L, Niederwieser D, Stoffregen EP, McWeeney S, Kovacs I, Park B, Druker BJ, Deininger MW. High-sensitive detection of BCR-ABL kinase domain mutation in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 2005; 106: 2128-37.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.07.05, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 583/05, intitulado: "Estudo de 50 pacientes com diagnóstico de leucemia mielóide crônica tratados com mesilato de imatinibe na disciplina de hematologia e hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Importância no acompanhamento molecular do transcrito BCR-ABL e futuras implicações na detecção precoce de mutações no sítio de ligação do ATP no gene ABL e hiperexpressão dos genes de resistência a múltiplas drogas: MDR1, MRP1, MRP3 e BCRP." apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Drº Israel Bendit

CAPPesq, 28 de Julho de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
VCN

Апexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE
.....
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL _____ LEGAL _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : _____ SEXO: M() F()

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: TELEFONE: DDD (.....)-.....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "ESTUDO DE 50 PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE NO DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. IMPORTÂNCIA NO ACOMPANHAMENTO MOLECULAR DO TRANSCRITO *BCR-ABL* E FUTURAS IMPLICAÇÕES NA DETECÇÃO PRECOCE DE MUTAÇÕES NO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO ATP NO GENE *ABL* E HIPEREXPRESSÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS: *MDR1*, *MRP1*, *MRP3* E *BCRP*."

PESQUISADOR: Dr Israel Bendit

CARGO/FUNÇÃO: Médico..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40.933.....

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Hematologia e Hemoterapia.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :..Dois anos.....

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Como já foi informado, você é portador de uma doença chamada de Leucemia Mieloide Crônica, também conhecida como LMC. Esta doença como o próprio nome diz é crônica, isto é, apresenta um curso lento e que em algum momento da sua vida esta fase crônica pode se tornar acelerada ou aguda, fazendo com que a doença seja mais agressiva. O Sr.(Sra.) será tratado com uma droga cujo nome é GLIVEC que é sabidamente eficaz no tratamento desta doença. Durante o tratamento o Sr.(Sra) será submetido a exames laboratoriais de rotina para controle da doença. Desta forma solicitamos a sua autorização para coletarmos mais 20 mL (vinte mililitros) de sangue periférico para a realização de dois exames importante no acompanhamento de sua doença. Um dos exames que será realizado é a monitoração a cada três meses do número de cópias do gene que é causador da LMC, denominado de BCR/ABL. A importância desta determinação se baseia em estudos anteriores que demonstraram quando não há diminuição no número de cópias até 12 meses de tratamento estamos autorizados a mudar a dose do GLIVEC e, desta forma, controlar melhor a sua doença. Outro exame que iremos realizar com esta mesma amostra é a pesquisa de mutações no gene ABL. Mutação é um termo utilizado em biologia que significa uma alteração genética em seu DNA e que possa ser responsável pela não resposta ao tratamento com o GLIVEC.

A participação neste estudo não trará nenhum desconforto ou risco esperado além da coleta de sangue que já faz parte da rotina da avaliação laboratorial da sua doença. É importante salientar que o Sr. (a) terá total liberdade de acessar qualquer informação sobre os procedimentos que estarão sendo realizados como também dirigir qualquer dúvida. Durante o acompanhamento de sua doença na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da FMUSP você terá total liberdade de retirar seu consentimento e/ou de deixar de participar do estudo, sem que isto traga nenhum prejuízo à continuidade de sua assistência no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. As informações obtidas durante esta pesquisa terão total sigilo, privacidade e não trará nenhum prejuízo a sua saúde.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 2005

sujeito da pesquisa ou responsável

Dr. Israel Bendit
CRM 40933
Hematologia Oncologia Pediátrica

pesquisador (carimbo)