

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Bárbara Villa

**MONITORAMENTO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES
DE TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE
CRÔNICA**

Santa Maria, RS
2019

Bárbara Villa

**MONITORAMENTO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES DE
TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS
2019

VILLA, BÁRBARA
MONITORAMENTO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES DE
TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE
CRÔNICA / BÁRBARA VILLA.- 2019.
66 p.; 30 cm

Orientador: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Coorientadora: VIRGÍNIA MARIA CÔSER
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

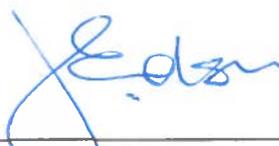
1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA 2. RESPOSTA MOLECULAR 3.
INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE 4. BCR-ABL I. SILVA, JOSÉ
EDSON PAZ DA II. CÔSER, VIRGÍNIA MARIA III. Título.

Bárbara Villa

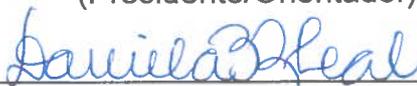
**MONITORAMENTO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES DE
TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

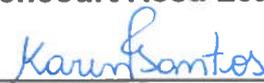
Aprovado em 28 de fevereiro de 2019:



José Edson Paz da Silva, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra (UFSM)



Karen Freitas Santos, Dra (URI)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

A todos que menciono aqui agradeço pela coragem que me deram para passar por esse momento difícil que tive durante a finalização desta dissertação.

Agradeço a minha família (Hélia, Edmar, Augusto e Camila) que sempre incentivou meu aprimoramento e por serem meu porto-seguro nas horas mais difíceis, além de garantirem minhas melhores risadas.

Agradeço às amigas por todas as horas que passamos nos divertindo.
Às mais próximas: Helô, Shani, Larissa, Dessa, Ana, Stephanie, Briane, muito obrigada!

Agradeço ao Pipeto por todo amor que trocamos todos os dias e pela companhia que me faz, apesar de pedir muita atenção para brincar entre uma escrita e um latido.

Agradeço aos colegas que são meu exemplo para buscar sempre o melhor a fim de enriquecer profissionalmente o trabalho que tenho no HUSM. Agradeço especialmente a minha colega e amiga Patrícia, principalmente por sua revisão do trabalho e amizade!

Agradeço a Dra Virgínia Maria Coser por sua ajuda na construção deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador José Edson Paz da Silva por ter aceitado orientar meu trabalho.

Agradeço a chefia do meu trabalho que permitiu este aprimoramento.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino gratuito e de qualidade.

RESUMO

MONITORAMENTO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

AUTOR: Bárbara Villa

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) está associada ao cromossomo Philadelphia. Este cromossomo anormal forma o gene quimérico *BCR-ABL1*, o qual é responsável por produzir uma proteína com atividade de tirosino quinase. Os fármacos inibidores desta proteína (ITQs) usados no Brasil são: mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe e nilotinibe. A resposta a estes tratamentos farmacológicos pode ser expressa em três níveis: hematológica, citogenética e molecular. Esta última é a mais sensível e é avaliada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RQ-PCR). O tratamento visa o alcance da Resposta Molecular Maior (RMM), cuja razão dos níveis do transcrito quimérico *bcr-abl1* e o controle endógeno são menores ou iguais a 0,1%. O *European Leukemia Net* (ELN) estabelece diretrizes para as respostas moleculares de acordo com a quantificação dos transcritos e o tempo de tratamento com ITQs, classificando-as como resposta ótima, alerta e falha. Segundo a literatura, sabe-se que aproximadamente 15-25% dos pacientes tratados com MI não alcançam a resposta ótima. Em virtude do baixo número de trabalhos que mostram o monitoramento molecular da LMC no Brasil, avaliamos a resposta molecular ao tratamento com os ITQs de pacientes com LMC tratados no HUSM através do monitoramento por RQ-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*. A análise se deu através do banco de dados do Serviço de Hematologia-Oncologia do HUSM e a quantificação dos transcritos e a pesquisa de mutação no gene *ABL* foram realizadas em laboratório externo. Foram revisados 117 prontuários, sendo que 58,11% eram da população masculina. A média de idade ao diagnóstico foi de 48,1 anos e 9,4% dos pacientes foram a óbito. Seis pacientes foram analisados à parte por características diferenciadas dos demais. Assim, dos 111 pacientes, 52,25% dos pacientes receberam exclusivamente MI, 42,30% atingiram a RMM aos 12 meses e 73,40% tiveram RMM em algum momento durante o tratamento com MI. 54,25% dos pacientes que usaram exclusivamente o MI alcançaram a RMM e a mantiveram até o fim. Dos 47,74% que mudaram de ITQ, 58,82% alcançaram a RMM logo após a troca e mantiveram até o fim esta resposta. Dos 19 (37,25%) pacientes que falharam ao longo da troca, 14 foram para a terceira linha de terapia. Atualmente 91,06% dos pacientes que usam MI estão com RMM, assim como 65,37% dos pacientes que usam nilotinibe e 58,81% dos que usam dasatinibe. Dos pacientes que foram testados para mutação no gene *ABL*, 40% tinham presença. Segundo os critérios do estudo *EURO-SKI* cinco pacientes seriam elegíveis para entrar num protocolo de estudo de Remissão Livre de Tratamento. Observamos uma melhora no monitoramento ao longo do tempo, bem como bons resultados de RMM frente aos três ITQs usados no HUSM atualmente. Nossos resultados estão em acordo com a literatura e o HUSM tem sido bem visto no cenário brasileiro com o monitoramento molecular que tem com seus pacientes para avaliar as respostas do uso de ITQs.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica. Monitoramento molecular. BCR-ABL1. Resistência ao Imatinibe.

ABSTRACT

MONITORING OF MOLECULAR RESPONSE TO THYROSINO-KYNASE INHIBITORS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

AUTHOR: Bárbara Villa
ADVISOR: José Edson Paz da Silva

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is associated with the chromosome Philadelphia. This abnormal chromosome forms the chimeric *BCR-ABL1* gene, which is responsible for producing a protein with tyrosine kinase activity. Tyrosine kinase inhibitors drugs (ITKs) used in Brazil are imatinib mesylate (IM), dasatinib and nilotinib. The response to these tests can be rated at three levels: hematological, cytogenetic and molecular. This last one is more sensitive and evaluated with Reaction in Chain of Real Time Polimerase (RQ-PCR). The treatment aims at achieving the Major Molecular Response (MMR), whose ratio of bcr-abl1 chimeric transcript levels and endogenous control are less than or equal to 0.1%. *European Leukemia Net* (ELN) establishes guidelines for molecular responses according to the quantification of transcripts and the time of treatment with ITQs, classifying them as optimal response, alert and failure. According to the literature, it is known that approximately 15-25% of patients treated with IM do not reach optimal response. Due to the low number of studies that show how the molecular monitoring of CML in Brazil is we decided to evaluate the molecular response to treatment with the ITQs of CML patients treated in HUSM through RQ-PCR monitoring for quantification of transcripts of the *BCR-ABL1* fusion gene. The analysis was did through the database of the Hematology-Oncology Service of the HUSM and the quantification of the transcripts and the mutation search in the *ABL* gene were performed in an external laboratory. 117 medical records were reviewed, of which 58.11% were male. The mean age at diagnosis was 48.1 years and 9.4% of the patients died. Six patients were analyzed separately for different characteristics of the others. Thus, of the 111 patients, 52.25% of the patients received exclusively IM, 42.30% reached MMR at 12 months and 73.40% had MMR at some point during IM treatment. 54.25% of the patients who exclusively used IM reached the MMR and maintained it to the end. Of the 47.74% that changed ITQ, 58.82% reached MMR shortly after the exchange and maintained this response to the end. Of the 19 (37.25%) patients who failed during the exchange, 14 went to the third line of therapy. Currently, 91.06% of patients who use IM are with MRM, as are 65.37% of patients using nilotinib and 58.81% of those who use dasatinib. Of the patients who were tested for mutation in the *ABL* gene, 40% had presence. According to the criteria of the EURO-SKI study, five patients would be eligible to enter a study protocol for Treatment-Free Referral. We observed an improvement in monitoring over time, as well as good MMR results compared to the three ITQs currently used in HUSM. Our results are in agreement with the literature and the HUSM has been

Keywords: Chronic myeloid leukemia. Molecular monitoring. BCR-ABL1. Resistance to Imatinib

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

Figura 1 - Formação do gene quimérico <i>BCR-ABL1</i> pela translocação t(9q;22q)	19
Figura 2 - Mecanismo de ação do MI e outros ITQs.....	21
Quadro 1 - Avaliação da resposta aos ITQs usados como primeira linha de terapia.....	23
Quadro 2-Definições de resposta para segunda linha de terapia em caso de falha de MI.....	25

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO

Figura 1- Curva de sobrevida global dos pacientes com LMC.....	39
Figura 2- Curva de sobrevida livre de evento dos pacientes com LMC.....	40
Figura 3- Curva de sobrevida global – comparação entre sexo.....	41
Figura 4- Curva de sobrevida livre de evento – comparação por sexo.....	42
Quadro 1 - Avaliação da resposta aos ITQs usados como primeira linha de terapia.....	36
Quadro 2 - Definições de resposta para segunda linha de terapia em caso de falha de MI.....	37

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 - Características demográficas dos 117 pacientes.....	38
Tabela 2 - Primeiro exame de monitoramento molecular dos pacientes em uso de primeira linha de terapia –MI- e suas respostas moleculares (n=94).....	43
Tabela 3 – Resultados de RQ-PCR dos pacientes de LMC ao tratamento com MI n=94).....	45
Tabela 4 – Primeiro exame de monitoramento molecular dos pacientes em uso de segunda linha de terapia - dasatinibe ou nilotinibe – e suas respostas moleculares (n=51).....	46
Tabela 5 – Resultados dos RQ-PCR dos pacientes de LMC ao tratamento com a segunda linha de terapia: dasatinibe ou nilotinibe (n=51).....	46
Tabela 6 – Respostas moleculares atuais (n=99).....	47

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LMC: Leucemia Mieloide Crônica
Ph: Philadelphia
MI: mesilato de Imatinibe
ITQs: inibidores de tirosino quinase
RQ-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
EI: escala internacional
RMM: resposta molecular maior
RMC: resposta molecular completa
ELN: *European Leukemia Net*
RLT: Remissão Livre de Tratamento
EURO-SKI: *European Stop ITQ Study*
EI: Escala Internacional
FC: Fase Crônica
FA: Fase Acelerada
FB: Fase Blástica
mRNA: RNA mensageiro
LLA: Leucemia Linfocítica Aguda
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase de Transcriptase Reversa
FDA: *Food and Drug Administration*
TCTH: Transplante de Células Tronco Hematopoiética
RHC: Resposta Hematológica Completa
RCC: Resposta Citogenética Completa
IRIS: *International Randomized Study of Interferon and STI-571*
CTH: células-tronco hematopoiéticas
GPA: glicoproteína ácida-1
IC 50: concentração inibitória
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
ASH: *American Society of Hematology*
NCCN: National Comprehensive Center Network
SG: Sobrevida Global
SLE: Sobrevida Livre de Eventos

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
1.3 JUSTIFICATIVA.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA E ETIOLOGIA.....	15
2.2 HISTÓRICO.....	15
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.4 DIAGNÓSTICO.....	16
2.5 CROMOSSOMO PHILADELPHIA.....	17
2.6 O GENE QUIMÉRICO <i>BCR-ABL1</i>	17
2.7 TRATAMENTO.....	19
2.8 ANÁLISE DE RESPOSTAS E MONITORAMENTO DO TRATAMENTO...	22
2.9 RESISTÊNCIA AO MESILATO DE IMATINIBE.....	25
2.10 MUTAÇÕES NO GENE ABL.....	27
2.11 REMISSÃO LIVRE DE TRATAMENTO.....	29
3 MANUSCRITO	31
Resumo	31
Introdução	32
Objetivos	34
Métodos	34
Resultados	37
Discussão	48
Conclusão	55
Referências	55
4 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO	61

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste em uma INTRODUÇÃO onde através de uma breve apresentação relatamos a importância do assunto investigado. Após temos a REVISÃO DE LITERATURA onde foi realizada uma revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados ao longo da dissertação.

Os métodos utilizados neste trabalho bem como resultados e discussão destes estão apresentados sob a forma de artigo, que se encontra no MANUSCRITO.

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia caracterizada pela desordem clonal das células precursoras hematopoiéticas e pela proliferação excessiva de células da série mieloide (MOREIRA E BOECHAT, 2009). A incidência mundial desta patologia é de 1 a 2 casos para cada grupo de 100 mil habitantes por ano e representa aproximadamente 15% a 20% de todos os casos de leucemia (INCA, 2018).

O cromossomo “Philadelphia” (Ph) é um marcador citogenético característico da LMC e sua descoberta foi de fundamental importância no entendimento da patogênese da doença (MOREIRA E BOECHAT, 2009). Este cromossomo anormal é resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 em que o gene de fusão *BCR-ABL1* formado produz uma onco-proteína BCR-ABL1 p210 (de 210 KD) que apresenta atividade aumentada de tirosino quinase, ou seja, de proliferação celular (FUNKE, 2008). Em razão desse estímulo, verifica-se o aumento no número de leucócitos e a proliferação excessiva de células da linhagem mieloide (CARVALHO, 2003).

Os fármacos inibidores de tirosino quinase (ITQs) foram os primeiros tratamentos para LMC a usarem uma molécula sinalizadora intracelular como alvo terapêutico, atuando através do bloqueio da atividade quinase da p210 através da ligação competitiva com o sítio de ligação com ATP, impedindo assim a proliferação de células com cromossomo Ph+. O mesilato de Imatinibe (MI) é atualmente preconizado como primeira linha de tratamento para LMC pelo SUS. Outros ITQs disponíveis pelo SUS usados para segunda linha são dasatinibe e nilotinibe (JABBOUR E KANTARJIAN, 2014).

A resposta a estes tratamentos pode ser expressa em três níveis: hematológica, citogenética e molecular. A resposta molecular é avaliada por PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) no sangue periférico. Tal técnica é muito mais sensível que o exame citogenético. A resposta molecular pode ser definida como a razão entre o número de transcritos do gene *BCR-ABL1* e o número de transcritos do gene controle (genes *ABL1*, *BCR* ou *GUSB*), expressa em escala internacional (EI) e relatada em escala logarítmica (BACCARANI et al., 2013). A resposta molecular maior

(RMM) é o objetivo a ser alcançado no tratamento com MI e representa uma quantificação dos transcritos $bcr-abl1 \leq 0,1\%$; a resposta molecular completa (RMC) é definida quando o número de transcritos atinge níveis indetectáveis pelo método do RQ-PCR.

Os atuais critérios estabelecidos pelo *European Leukemia Net* (ELN) para classificar o tipo de resposta ao tratamento com MI são úteis para identificar pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento e que necessitam de uma mudança no tipo desse tratamento o mais precocemente possível. Esses critérios classificam a resposta em ótima e falha, com um grupo intermediário denominado de sinais de alerta. A resposta ao tratamento com MI é definida como ótima se: aos 3 meses após o início do tratamento a quantificação dos transcritos $bcr-abl1$ alcançou a redução de 1 log (10%); aos seis meses a quantificação $bcr-abl1$ atingiu a redução de 2 logs (1%) e aos 12 meses a quantificação $bcr-abl1$ alcançou a RMM, ou seja, redução de 3 logs ($bcr-abl1 \leq 0,1\%$). Os pacientes com resposta de alerta requerem um monitoramento mais frequente para garantir que esses pacientes possam se beneficiar da mudança de abordagem terapêutica em tempo hábil para não evoluírem para falha.

A frequência da realização dos exames moleculares por RQ-PCR durante o tratamento deve ser a cada 3 meses até atingir RMM; após RMM, a cada 3 a 6 meses. Se houver falha de resposta ou progressão, realizar RQ-PCR, análise mutacional e citogenética (BACCARANI et al., 2013).

Apesar dos bons resultados obtidos com a terapêutica do MI, 15-25% dos pacientes em fase crônica evoluem com resistência – sem nunca terem respondido ao tratamento (resistência primária) ou com a perda da sensibilidade ao fármaco ao longo do tempo (resistência secundária) (JABBOUR E KANTARJIAN, 2014; VIGIL et al., 2011). Esta resistência ao MI tem sido associada a vários mecanismos heterogêneos, entre eles mecanismos moleculares como mutações no gene *ABL*. As resistências primária e secundária são definidas de acordo com critérios de alerta e falha segundo o ELN (PAGNANO, 2008).

Alguns estudos de Remissão Livre de Tratamento têm sugerido a suspensão do uso de ITQs de primeira linha em pacientes que entram em fase de remissão molecular da doença (ETIENNE et al., 2015; ROSS et al., 2010; ROSS et al., 2013).

Segundo o *European Stop ITQ Study* (EURO-SKI), cerca de metade dos pacientes tratados com os ITQs durante pelo menos três anos e em resposta molecular com queda de 4 log ($\text{bcr-abl1} \leq 0,01\%$) durante pelo menos um ano permaneceu livre de recidiva da doença após dois anos de acompanhamento, sem o uso de inibidor (SAUSSELE et al., 2016).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Principal

Avaliar a resposta molecular ao tratamento com os ITQs de pacientes com LMC através do monitoramento por RQ-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e analisar o perfil epidemiológico dos pacientes, bem como taxas de Sobrevida Global, Sobrevida Livre de Eventos
- Analisar e avaliar as respostas moleculares aos ITQs
- Identificar o número de pacientes com presença de mutação no gene *ABL*
- Analisar quantos pacientes seriam elegíveis para entrar num protocolo de estudo de Remissão Livre de Tratamento.

1.3 JUSTIFICATIVA

A escassez de trabalhos que mostrem como está o monitoramento molecular da LMC nas instituições brasileiras nos motivou a investigar como está o Hospital Universitário de Santa Maria no cenário nacional e mundial. Tendo em vista que o monitoramento molecular por RQ-PCR é a melhor opção para definir resposta terapêutica e o seguimento do paciente segundo o *National Comprehensive Center Network* (NCCN) e a ELN (BRANDFORD et al., 2006), torna-se de fundamental relevância investigar a resposta molecular ao tratamento com os ITQs dos pacientes atendidos pelo HUSM, além de oferecer subsídios aos médicos que tratam esses pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA E ETIOLOGIA

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia resultante da proliferação clonal de uma célula tronco hematopoiética pluripotente que envolve principalmente a linhagem mieloide. Caracteriza-se pela hiperplasia mieloide na medula óssea e granulocitose no sangue periférico, além da presença de uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo Philadelphia (Ph). Sugere-se que esta seja uma desordem adquirida através de mutações somáticas ocorridas ao longo da vida (KANTARJIAN et al., 1993). A exposição à radiação ionizante é o único fator de risco documentado para LMC, haja vista a alta incidência da doença nos sobreviventes da bomba atômica em Hiroshima e Nagasaki (HEYSSEL et al., 1960).

Em torno de 50% dos pacientes são diagnosticados comumente durante exames laboratoriais de rotina, como hemogramas. A LMC pode ser classificada em três fases: Fase Crônica (FC) onde aproximadamente 90-95% dos pacientes são diagnosticados na qual os principais sinais e sintomas (fadiga, perda de peso e mal-estar) quando presentes são resultados de anemia e esplenomegalia; Fase Acelerada (FA) onde normalmente há sintomas sistêmicos como febre, falta de apetite e perda de peso. Nesta fase os pacientes não respondem ao tratamento tão bem quanto na fase crônica; e Fase Blástica (FB) onde a LMC se comporta como uma leucemia mieloide aguda em que as células blásticas frequentemente se espalham para tecidos e órgãos além da medula óssea. (CAPRA, 2008; JABBOUR E KANTARJIAN, 2017).

2.2 HISTÓRICO

A LMC foi pela primeira vez descrita na Escócia em 1845 por Bennett em um jovem que apresentava fraqueza, enorme aumento do baço e após 20 meses de doença evoluiu a óbito por “supuração do sangue”. Quase que de forma concomitante, Virchow na Alemanha descreveu quadro semelhante, chamando, porém de “sangue branco”, ou “*leukämie*”, origem do termo leucemia (GOLDMAN E MELO, 2003). Posteriormente foram descritas as fases da doença, sendo que a FC é definida pela

presença de menos de 15% de blastos, menos de 20% de basófilos e menos de 30% de blastos mais promielócitos em sangue periférico ou medula óssea (BACCARANI, et al., 2006).

Esta doença é considerada um modelo de neoplasia devido a uma série de descobertas que a associaram a um defeito genético específico. Em 1960 a demonstração de um cromossomo do grupo G encurtado em células da medula óssea e sua ausência em fibroblastos da pele associou a doença ao defeito genético, denominado de cromossomo Ph (BARNETT E EAVES, 2002).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A LMC é a doença mieloproliferativa mais frequente. Representa 15 a 20% de todos os casos de leucemia, apresentando uma incidência mundial de 1 a 2 casos por 100.000 pessoas/ano (INCA, 2018). A LMC é mais frequentemente diagnosticada entre indivíduos entre 40 a 60 anos de idade, com uma média de 53 anos, e somente 10% são diagnosticados com menos de 20 anos (BORTOLHEIRO E CHIATTONE, 2008; SAWYERS, 1999). A cada ano, são estimados 5.940 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres no Brasil. Isso corresponde a um valor de 5,75 novos casos para cada cem mil homens e 4,56 para cada cem mil mulheres (INCA, 2018).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LMC baseia-se em dados clínicos e laboratoriais, normalmente hemogramas com leucocitose e desvio à esquerda. Frente a um quadro clínico sugestivo, o exame da medula óssea é mandatório, de modo a realizar a contagem diferencial das células, colher material para estudo citogenético, imunofenotipagem (em casos de fase blástica) e RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase de Transcriptase Reversa) para *BCR-ABL1* (VARDIMAN *et al.*, 2001).

A demonstração da t(9;22) na citogenética pode ser detectada em 95% dos pacientes. O gene de fusão *BCR-ABL1* pode ser detectado em um terço dos pacientes cromossomo Ph negativos. Ambos achados são fundamentais para o diagnóstico, apesar de haver casos em que nem o cromossomo Ph nem o rearranjo bcr-abl1 são

encontrados (TEFFER, 1998; FADERL et al., 1999).

Através da PCR ocorre a amplificação da região de junção entre o *BCR* e o *ABL1*. Os testes de PCR podem ser tanto qualitativos (RT-PCR), em que se obtém informações sobre a presença do transcrito *bcr-abl1*, ou quantitativo no qual se obtém informações sobre a contagem de transcritos *bcr-abl1* por RQ-PCR (PCR em Tempo Real). A PCR qualitativa é útil para o diagnóstico de LMC; a quantitativa é ideal para o monitoramento da Doença Residual Mínima (DRM) (BACCARANI et al., 2013).

2.5 CROMOSSOMO PHILADELPHIA

O cromossomo Ph foi identificado pela primeira vez na cidade de Filadélfia em 1960 pelos pesquisadores Nowell e Hungerford da Universidade da Pensilvânia, EUA (NOWELL E HUNGERFORD, 1960) e em 1973 a pesquisadora Janet Rowley da Universidade de Chicago, EUA encontrou a translocação entre os cromossomos 9 e 22 (RANDOLPH, 2005; ROWLEY, 1973).

O cromossomo Ph é um cromossomo 22 encurtado, resultante da translocação $t(9;22)(q34;q11)$ que ocorre de forma recíproca entre o proto-oncogene *c-ABL* (presente no braço longo do cromossomo 9) e o gene *BCR* (localizado no próprio braço longo do cromossomo 22). A translocação gera o gene quimérico *BCR-ABL1*, que é traduzido em uma proteína (p210) de 210 KD, com atividade aumentada de tirosino quinase. Em razão do estímulo na proliferação celular desencadeado por esta atividade da proteína, verifica-se o aumento no número de leucócitos e a proliferação excessiva de células da linhagem mieloide. Em consequência, há depleção de nutrientes que comprometem a diferenciação e maturação das células das linhagens eritrocíticas e linfocíticas da medula óssea (CARVALHO, 2003).

2.6 O GENE QUIMÉRICO *BCR-ABL1*

O gene *ABL1* (*Abelson Leukemia Virus*) normal possui 230kb de comprimento e codifica uma proteína de 145 KD (p145) que expressa uma atividade tirosino quinase. Sua função está relacionada ao crescimento celular, à indução da apoptose e ao reparo no DNA, além do processo de transdução de sinais. O gene *BCR*

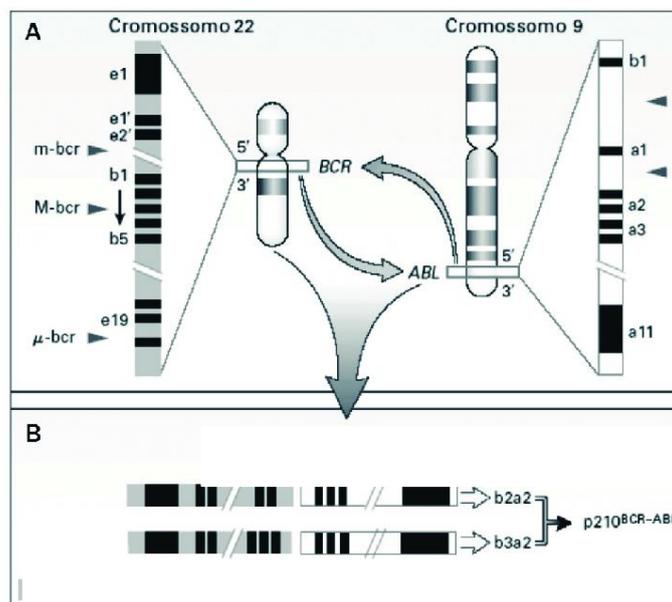
(*Breakpoint Cluster Region*) normal possui aproximadamente 100kb de comprimento e codifica uma proteína de 160 KD que é expressa em vários tipos celulares, sendo mais expressa em células hematopoiéticas e também está envolvida na transdução de sinais (LUCAS et al., 2009).

O gene híbrido *BCR-ABL1* é formado através da translocação recíproca do segmento 3' do gene *ABL* ao segmento 5' do gene *BCR* (Figura 1). Este será transcrito em um RNA mensageiro (mRNA) *bcr-abl1*, que por sua vez será traduzido na oncoproteína de mesmo nome (MELO et al., 1993). O ponto de quebra do gene *ABL* no 9q34 pode ocorrer entre os exons 1b e 1a ou entre 1a e a2, entretanto o *splicing* do mRNA primário faz com que seja sempre o exon a2 a se ligar a um dos três pontos de quebra do *BCR*, formando um fragmento *ABL* de tamanho constante (FADERL et al., 1999). O local do ponto de quebra do *BCR* ocorre no ponto de quebra maior (M-*BCR*, *Major Breakpoint Cluster Region*). Geralmente, a quebra do M-*bcr* ocorre dentro de íntrons localizados entre os exons b2 e b3 ou b3 e b4, que devido ao *splicing* alternativo juntam-se ao exon a2 do *ABL*, formando os chamados transcritos e13a2 (formalmente b2a2) e e14a2 (formalmente b3a2) (SAWYERS, 1999).

Os pontos de quebra do gene *BCR* podem ocorrer em três regiões de diferentes tamanhos que formarão um dos três tipos diferentes de proteínas de fusão *BCR-ABL1*: p190, p210 ou p230, responsáveis pelo desenvolvimento, respectivamente, da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), da LMC e Leucemia Neutrofílica Crônica (Figura 1) (SAWYERS, 1999).

Devido à fusão dos genes *BCR* e *ABL*, a atividade quinase do gene *ABL1* é aumentada promovendo autofosforilação e desencadeando uma série de mudanças funcionais na regulação celular de proteínas importantes, como a família Ras, MAPK, STAT5, P13K e MYC. O *BCR* gera perda da função e mantém o *ABL1* no citoplasma garantindo sua interação com as proteínas. Assim, todas estas alterações são responsáveis pelo fenótipo maligno da doença (CILLONI E SAGLIO, 2012; VIGERI E WANG, 2001).

Figura 1 - Formação do gene quimérico BCR-ABL1 pela translocação t(9q;22q)



Fonte: Adaptado de Faderl et al. (1999)

Em A observamos os pontos frágeis dos genes BCR e ABL (setas) e os rearranjos cromossômicos possíveis. Em B estão os produtos da translocação t(9;22), que resultam na produção da proteína p210.

2.7 TRATAMENTO

2.7.1 Primeira Geração de ITQs

O curso natural da LMC mudou muito a partir de 1996, quando Druker et al (1996) desenvolveram um inibidor da tirosina quinase (ITQ) capaz de bloquear a atividade constante da porção ABL da proteína BCR-ABL1. Seus experimentos *in vitro* resultaram na redução da proliferação de colônias de células BCR-ABL1 positivas do sangue de pacientes com LMC, porém sem efeitos nas células saudáveis. Deininger et al (1997) mostrou no ano seguinte que o MI induzia a morte só de células BCR-ABL1 positivas. Até então o tratamento consistia em Hidroxiureia, Interferon-alfa ± Citarabina e o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH).

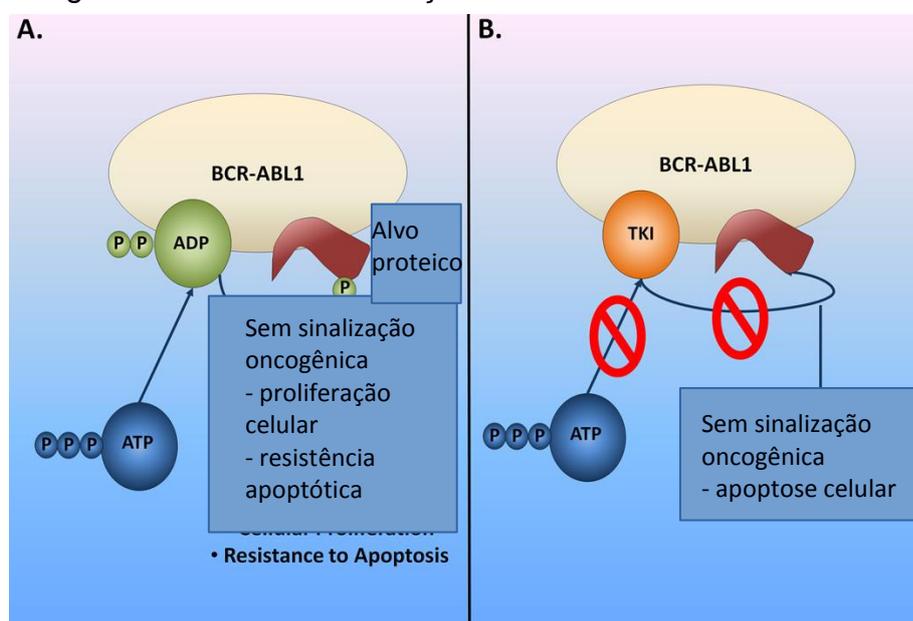
A nova droga na época foi denominada de ST1-571 ou Mesilato de Imatinibe (MI) e marcou o início da nova era do tratamento do câncer ao usar uma molécula sinalizadora intracelular como alvo terapêutico que mostrou resultados eficazes em pacientes com prognósticos malignos. Dessa forma, o MI atua competindo com o receptor de ATP no domínio ABL1 da tirosina quinase, prevenindo a ativação da cascata de transdução de sinais. Assim, sua atuação é destruir os clones leucêmicos

Ph+, reduzindo a proliferação do tumor pela disrupção da via oncogênica dependente, levando a apoptose celular (DRUKER et al., 1996; GADZICKI et al., 2005).

Aprovado em 2001 pelo FDA (Food and Drug Administration), o MI foi por anos a terapia padrão da LMC devido a sua atividade notável e toxicidade mediana, incluindo poucos efeitos colaterais (WEI et al., 2010). Sua implementação causou uma redução drástica na realização de TCTH, obtendo uma resposta citogenética completa em mais de 80% dos pacientes e aumentando a longo prazo a sobrevida. Apesar de todo este sucesso, a presença de casos de resistência ou intolerância ao MI levou à necessidade de se desenvolver novos inibidores, já que as células leucêmicas são geneticamente instáveis e suscetíveis a múltiplas mutações, o que causa o progresso da doença. Os tratamentos farmacológicos dos ITQs têm por objetivo manter a doença em níveis indetectáveis a nível clínico, citogenético e molecular, com qualidade de vida aceitável (HUGHES et al., 2003; RABINOWITZ E LARSON, 2004).

No Brasil, o MI é atualmente preconizado como primeira linha de tratamento para LMC pelo SUS. Os outros ITQs fornecidos pelo SUS são dasatinibe e nilotinibe (JABBOUR E KANTARJIAN, 2014). Na Figura 2 apresentamos o mecanismo de ação do MI e outros ITQs.

Figura 2 - Mecanismo de ação do MI e outros ITQs.



Fonte:

Adaptado de Santos et al. (2011)

Mecanismo de ação do MI e outros ITQs. Em A observamos a tirosino quinase oncogênica BCR-ABL1 que fosforila os alvos proteicos levando à ativação das vias intracelulares associadas ao aumento da proliferação celular e resistência apoptótica. O ATP se liga ao BCR-ABL1 e fornece grupos fosfato à reação de fosforilação. Em B observamos que os ITQs disponíveis são compostos de ATP miméticos que competem com ATP para a ligação do ATP ao sítio BCR-ABL1. A ligação do ITQ ao BCR-ABL1 evita a fosforilação de substratos proteicos, uma vez que nenhum grupo fosfato está disponível para a reação ocorrer. Como consequência, as vias de sinalização oncogênicas não são mais ativadas e a célula sofre apoptose.

2.7.2 Segunda Geração de ITQs

Em 2008 e 2009, respectivamente, os ITQs de segunda geração (dasatinibe e nilotinibe) foram aprovados pela ANVISA e eram inicialmente reservados para pacientes com resistência -seja pela presença de mutações ou outras razões- ou intolerância ao MI, entretanto posteriormente em 2016 passaram a ser recomendados aos pacientes em FC recém-diagnosticados como primeira linha de terapia devido ao seu alto potencial em controlar a doença (AGARWAL, 2014). Apesar de dasatinibe e nilotinibe mostrarem-se superiores em relação à eficácia do MI (WEI et al., 2010), no SUS eles só podem ser empregados no tratamento da LMC em 2ª linha, ou seja, após falha terapêutica ou intolerância ao MI (BRASIL, 2014).

2.7.3 Terceira Geração de ITQs

Como alternativa ao tratamento dos pacientes resistentes às drogas de segunda geração, a terceira geração de ITQs emergiram: ponatinibe (AP24534) e bosutinibe. Essas drogas visam evitar resistência ao MI. A mutação T315I, por exemplo, exibe resistência para todos os ITQs atualmente disponíveis, exceto o ponatinibe (JABBOUR E KANTARJIAN, 2016) . Este medicamento é o primeiro ITQ a possuir atividade contra a LMC em pacientes que possuem esta mutação. Atualmente, estudos sugerem o uso de interferon-alfa combinado com ITQ, bem como TCTH para certos pacientes em FA ou FB (MALAGOLA et al., 2014).

Devido aos diferentes perfis de toxicidade de cada ITQ, o clínico deve tomar conhecimento a respeito destes para melhor decidir sobre uma terapia. A maioria dos ITQs é razoavelmente bem tolerada com monitoramento adequado e cuidados de suporte. Por exemplo, pacientes com risco de desenvolver derrames pleurais e que usam anticoagulantes, outros ITQs que não dasatinibe devem ser preferidos. Pacientes com predisposição diabética e/ou eventos vasculares vaso-oclusivos devem evitar nilotinibe (JABBOUR E KANTARJIAN, 2017; MONTANI et al., 2012).

2.8 ANÁLISE DE RESPOSTAS E MONITORAMENTO DO TRATAMENTO

Em 2006 um grupo de especialistas - o *European Leukemia Network (ELN)* - propôs (BACCARANI et al., 2006) que a avaliação dos resultados frente aos tratamentos deveria ser por meio de análise das respostas hematológica, citogenética e molecular. Essas recomendações foram revisadas em 2009 (BACCARANI et al., 2009) e em 2013 (BACCARANI et al., 2013). Os critérios atuais estabelecidos para classificar o tipo de resposta ao tratamento com MI são úteis para identificar pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento e que necessitam de uma mudança no tipo de tratamento o mais precocemente possível. Esses critérios classificam a resposta em ótima e falha de resposta, com um grupo intermediário denominado de sinais de alerta. O termo resposta de alerta indica um grupo de pacientes nos quais as características clínicas da doença e a resposta ao tratamento requerem um monitoramento mais frequente para garantir que esses pacientes possam se beneficiar da mudança de abordagem terapêutica em tempo hábil para

não evoluírem para falha (BACCARANI et al., 2013; FUNKE E PASQUINI, 2013).

A resposta terapêutica ideal para pacientes que fazem uso de ITQ de primeira linha de terapia e que confere ao paciente uma melhor sobrevida é o alcance da resposta ótima (Quadro 1). Esta inclui o alcance da Resposta Hematológica Completa (RHC) aos 3 meses em que através do monitoramento por hemograma o paciente deve ter leucometria $< 10 \times 10^9/L$, basófilos $< 5\%$, plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ e sem presença de precursores mieloides imaturos no diferencial; além de parâmetros citogenéticos e moleculares os quais devem ser monitorados respectivamente por cariótipo da medula óssea e RQ-PCR de sangue periférico (BACCARANI et al., 2013).

A resposta molecular permite detectar uma célula doente em até 10^4 a 10^6 células, sendo portanto, mais sensível que o exame hematológico e citogenético. Ela pode ser definida como a razão entre o número de transcritos do gene *BCR-ABL1* e o número de transcritos do gene controle (genes *ABL1*, *BCR* ou *GUSB*), expressa em escala internacional (EI) e relatada em escala logarítmica. Segundo Baccarani et al. (2013), define-se como resposta ótima à primeira linha de terapia se aos três meses após o início do tratamento a quantificação dos transcritos bcr-abl1 alcançou a redução de 1 log (10%) ou RM1; aos seis meses a quantificação bcr-abl1 atingiu a redução de 2 logs (1%) ou RM2 e aos 12 meses a quantificação bcr-abl1 alcançou a redução de 3 logs (bcr-abl1 $\leq 0,1\%$) ou RM3 (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliação da resposta aos ITQs usados como primeira linha de terapia.

	Resposta ótima	Resposta de alerta	Resposta de falha
Diagnóstico		CCA em céls Ph+	
3 meses	Ph+<35% e/ou bcr-abl1 $\leq 10\%$	Ph+ 36-95% e/ou bcr-abl1 >10%	Ph+>95% e/ou sem RHC
6 meses	Ph+0% e/ou bcr-abl1 <1%	Ph+ 1-35% e/ou bcr-abl1 – 10%	Ph+>35% e/ou bcr-abl1 >10%
12 meses	bcr-abl1 $\leq 0.1\%$	bcr-abl1 0.1-1%	bcr-abl1 >1% e/ou Ph+>0%
Qualquer tempo	bcr-abl1 $\leq 0.1\%$	CCA em céls Ph- (-	perda de RHC,

		7 ou 7q)	RCC; perda de RMM confirmada*; CCA em ph + céls
--	--	----------	---

Fonte: Adaptado de ELN, 2013

As informações deste quadro servem para pacientes que se encontram tanto em FC, FA ou FB, além de pacientes que tiveram intolerância à primeira linha de tratamento (no caso do Brasil, imatinibe). CCA: anormalidades cromossômicas clonais; RMM= $bcr-abl1 \leq 0.1\%$ = RM3 ou melhor; * Em dois testes consecutivos em que cada um com nível de transcritos $\geq 1\%$.

Assim, a resposta molecular permite quantificar o número de transcritos do gene. No caso, a RMM (objetivo a ser alcançado no tratamento com ITQ em doze meses) representa uma quantificação dos transcritos $bcr-abl1 \leq 0,1\%$ (RM3). Conforme demonstrado no estudo *International Randomized Study of Interferon and STI-571* (IRIS), uma redução de 3 logaritmos no número de transcritos estaria associada a um melhor prognóstico. A proporção de pacientes neste estudo que atingem a RMM depois de 12 meses de uso de MI varia de 18 a 58% (BACCARANI et al., 2009; HUGHES et al., 2009). Atingir uma resposta molecular profunda (RM4 ou RM4,5) é essencial para a inserção do paciente em estudos de descontinuação de tratamento. Estas respostas representam níveis muito baixos de transcritos, próximo do limite de detecção técnica (níveis de BCR-ABL1 inferiores a 0,01% para a RM4 e inferiores a 0,0032% para a RM4,5). Outro parâmetro é a resposta molecular completa (RMC) ou leucemia molecularmente indetectável, definida quando o número de transcritos atinge níveis indetectáveis pelo método do RQ-PCR (BACCARANI et al., 2013).

A frequência da realização dos exames moleculares ideal deve ser ao diagnóstico com PCR qualitativa (RT-PCR) para determinação do tipo de transcrito $bcr-abl1$; durante o tratamento, RQ-PCR a cada 3 meses até atingir RMM; após RMM, a cada 3 a 6 meses. Se houver falha de resposta ou progressão, realizar RQ-PCR, análise mutacional e citogenética. Na presença de sinais de alerta, estas análises moleculares e de citogenética devem ser realizadas com maior frequência. (BACCARANI et al., 2013).

2.9 RESISTÊNCIA AO MESILATO DE IMATINIBE

Apesar dos excelentes resultados do MI, observou-se que uma minoria de pacientes em fase crônica (15-25%) evoluem com resistência, sem nunca terem respondido ao tratamento (resistência primária) ou com a perda da sensibilidade ao longo do tempo e recaída (resistência secundária) (JABBOUR E KANTARJIAN, 2014; VIGIL et al., 2011).

Os critérios atuais segundo o estudo IRIS, do grupo *European Leukemia Net*, definem como falha de tratamento (resistência) a resposta de falha segundo o Quadro 1. Mutações com alto grau de insensibilidade ao MI e aumento de transcritos bcr-abl1 também estão associados às resistências primária e secundária (BACCARANI et al., 2013; PAGNANO, 2008). Nestas condições, é indicado aumento de dose ou de troca para segunda linha de terapia, e o monitoramento deve ser seguido conforme as recomendações do Quadro 2.

Quadro 2 - Definições de resposta para segunda linha de terapia em caso de falha de MI

	Resposta ótima	Resposta de alerta	Resposta de falha
Início		Sem RHC ou perda de RHC com MI ou perda de RCC a primeira linha de ITQ ou de alto risco	
3 meses	bcr-abl1 ≤10% e/ou Ph+ <65%	bcr-abl1 >10% e/ou Ph+ 65-95%	Sem RHC ou Ph+ >95% ou novas mutações
6 meses	bcr-abl1 ≤10% e/ou Ph+ <35%	Ph+ 35-65%	bcr-abl1 >10% e/ou Ph+ >35% ou novas mutações
12 meses	bcr-abl1 <1% e/ou Ph+ 0%	bcr-abl1 1-10% e/ou ph+ 1-35%	bcr-abl1 >10% e/ou Ph+ >35% e/ou novas mutações
Qualquer tempo	bcr-abl1 ≤0.1%	CCA/Ph- ou bcr-abl1 >0.1%	Perda da RHC ou da RCC ou RCP;

			novas mutações; perda confirmada da RMM*; CCA ph+
--	--	--	---

Fonte: adaptado de ELN, 2013

Essas definições são principalmente baseadas em estudos para nilotinibe e dasatinibe, mas podem ser provisoriamente aplicadas para bosutinibe e ponatinibe até que mais estudos sejam realizados. CCA: anormalidades cromossômicas clonais; RMM= $BCR-ABL1 \leq 0.1\%$ = RM3 ou melhor; * Em dois testes consecutivos em que cada um com nível de transcritos $\geq 1\%$

A resistência das células-tronco hematopoiéticas (CTH) da LMC ao ITQs tem sido associada a múltiplos mecanismos heterogêneos. Estes podem ser dependentes ou não do *BCR-ABL1*: Os dependentes do *BCR-ABL1* -responsáveis pela resistência secundária- incluem amplificação ou superexpressão da sequência ABL, mutação gênica na molécula ABL, evolução clonal. Os mecanismos de resistência independentes ABL e, assim, responsáveis pela resistência primária ao MI, incluem: efluxo da droga por meio da expressão glicoproteína P, embora não se saiba precisamente se esse mecanismo é clinicamente relevante; baixa atividade do transportador celular hOCT-1; ligação do MI com glicoproteína ácida-1 (GPA), o que reduz sua atividade; ativação de outras vias de sinalização, como por exemplo Ras (JORGENSEN E HOLYOAKE, 2007).

As causas de resistência secundária são mais conhecidas. Os pontos de mutação no oncogene *BCR-ABL1* representam a causa mais comum, ocorrendo entre 35 a 70% dos pacientes com resistência secundária. Outros mecanismos conhecidos de resistência secundária incluem a superprodução de bcr-abl1 decorrente de amplificação gênica, aparecimento de cromossomos Ph adicionais ou outras anormalidades cromossômicas além do cromossomo Ph1 (evolução clonal). A ocorrência destes mecanismos ocorre em aproximadamente 10% dos casos de resistência (SHAH, 2005). A evolução clonal está associada a um risco maior de transformação para fases avançadas. Há também evidências de persistência do BCR-ABL1 em células precursoras quiescentes que seriam resistentes ao MI (DEININGER et al., 2007).

Há uma série de outros mecanismos envolvidos na resistência e ainda pouco estudados, como alterações na absorção, efluxo e influxo de droga para o interior das células. Como todo medicamento oral, deve-se também considerar outros fatores como problemas na ingestão do MI (má aderência ao tratamento); uso de medicamentos concomitantes que podem interferir com MI, diminuindo sua ação; problemas na absorção, metabolização, ligação com proteínas plasmáticas e inativação enzimática podem também interferir na ação terapêutica, levando a uma diminuição dos níveis plasmáticos da droga (PAGNANO, 2008).

2.10 MUTAÇÕES NO GENE ABL

Mutações no domínio quinase do *BCR-ABL1* são normalmente detectáveis em 50% dos pacientes com falha e progressão da doença (APPERLEY, 2007). As mutações são mais frequentes na resistência secundária do que primária (57% vs 30%) e também nas fases avançadas (80% na fase blástica vs 14% na fase crônica) (SHAH, 2005; HOCHHAUS E ROSÉE, 2004). Em termos das técnicas disponíveis, o sequenciamento direto é o método mais frequentemente utilizado na detecção de mutações e tem uma sensibilidade de cerca de 10%-20%. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) tem sido usada para triagem de mutações e mostrou ser um método mais sensível que o sequenciamento (PAGNANO, 2008).

A análise de mutações pode identificar as mutações relacionadas à resistência que podem auxiliar no planejamento do tratamento, dependendo da sensibilidade ao determinado ITQ, que pode ser avaliado através da concentração inibitória (IC 50), um índice que avalia o quanto a droga é capaz de inibir a linhagem mutante. Quanto maior o IC 50, mais medicamento é necessário para inibir a tirosina quinase e, portanto, mais resistente é a mutação. Mutações com baixo grau de insensibilidade ao MI (M244V e M351T) podem responder ao aumento de dose. Mutações com alto grau de insensibilidade necessitam mudança no tratamento (BRANDFORD et al., 2003).

Mais de 90 mutações foram descritas no domínio tirosino quinase, conferindo

resistência aos tratamentos com ITQs. A mais comum e perigosa mutação ocorre devido a uma troca de treonina a uma isoleucina na posição 315 (T315I). Essa mutação é resistente ao MI e outras drogas de segunda geração e terceira geração, exceto o ponatinibe. Mutações de ponto no domínio tirosina quinase do ABL levam a mudanças conformacionais na estrutura da proteína o que dificulta a ligação desta com o ITQ (BACCARANI et al., 2009; CHUNG, 2014).

As mutações podem ocorrer em diversos domínios da quinase, como na alça do fosfato (P-loop), alça de ativação e domínio catalítico. O MI se liga e estabiliza uma conformação inativa da quinase na qual a alça de ativação encontra-se em uma posição fechada. Mutações que ocorrem em sítios de contato com MI eliminam pontes de hidrogênio críticas para a ligação. Outras que ocorrem na alça de fosfato impedem que a quinase assuma uma conformação adequada para a ligação do MI e, por fim, aquelas da alça de ativação estabilizam uma forma ativa, inacessível para o MI (KALEEM et al., 2015).

No momento da falha do tratamento, os pacientes devem ser submetidos a exame da medula óssea a fim de determinar em qual fase da doença o paciente se encontra e analisar se houve evolução clonal. Todos os pacientes com falha devem ser testados para mutações no domínio BCR-ABL1 quinase, pois isso ajudará a guiar a seleção do ITQ (JABBOUR et al., 2011) Ao selecionar entre dasatinibe, bosutinibe e nilotinibe, os dados *in vitro* e *in vivo* identificam mutações distintas que apresentam diminuição da sensibilidade a cada um dos agentes (HUGHES et al., 2009; MULLER et al., 2009). O médico pode optar por dasatinibe ou bosutinibe se o paciente apresentar as seguintes mutações: Y253H, E255K/V ou F359C/V/I. Alternativamente, o nilotinibe pode ser favorecido na presença das mutações V299L, F317L/V/I/C ou T315A. Para os pacientes que não possuem essas mutações, a escolha deve ser guiada com base nas condições pré-existentes, perfis de toxicidade e custo (JABBOUR E KANTARJUAN, 2017).

O bosutinibe pode ser usado em pacientes com a maioria das mutações conhecidas que levam à insuficiência do imatinibe (CORTES et al., 2011). Como o dasatinibe e o nilotinibe, o bosutinibe não possui uma atividade contra o T315I. O

bosutinibe pode ser uma escolha razoável para pacientes que falham no imatinibe e que não são bons candidatos para dasatinibe ou nilotinibe (KANTARJIAN et al., 2014).

O ponatinibe deve ser considerado o agente de escolha em pacientes com a mutação T315I e em casos em que outros ITQ não são indicados (pacientes com resistência a pelo menos um ITQ de segunda geração). Nenhum outro ITQ comercialmente disponível tem atividade contra a mutação T315I. O risco de toxicidades graves (doença vaso-oclusiva, pancreatite, hipertensão, erupções cutâneas graves) e de eventos trombóticos com ponatinibe é significativo, mas os benefícios superam os riscos para a maioria dos pacientes com uma mutação T315I, pois não existem outras opções para a doença (KANTARJIAN et al., 2017; O'HARE et al., 2009).

2.11 REMISSÃO LIVRE DE TRATAMENTO

Alguns estudos de Remissão Livre de Tratamento (RLT) têm sugerido a suspensão do uso de inibidores de tirosino quinase de primeira linha em pacientes que entram em fase de remissão molecular da doença (ETIENNE et al., 2015; ROSS et al., 2010; ROSS et al., 2013). Atualmente, ainda não existem dados suficientes para recomendar que os pacientes possam interromper os seus tratamentos fora de estudos clínicos que não sejam bem estruturados e controlados. Se implementada como uma nova diretriz segundo as recomendações internacionais, os benefícios da parada na medicação seriam a redução dos efeitos colaterais (ganho de peso, fadiga, edema, dores musculares e ósseas, náuseas) oriundos do uso contínuo de medicação, a possibilidade de gestação em mulheres com LMC que fazem uso do medicamento -já que a gravidez é desaconselhada durante o tratamento com ITQs- além do benefício econômico da suspensão do medicamento (SAUSSELE et al., 2016).

O estudo *European Stop ITK Study* (EURO-SKI) é o maior de descontinuação de ITQs, pois foi iniciado em 2012, ainda está em andamento e inclui doze países. Os critérios de inclusão foram: pacientes em FC, maiores de 18 anos, ambos os sexos

(mulheres em idade fértil que façam uso de método contraceptivo), tratamento com qualquer ITQ por pelo menos 36 meses e sem falha de resposta, Resposta Molecular Profunda (RM4) por pelo menos doze meses (SAUSSELE et al., 2016).

Segundo o EURO-SKI, 755 pacientes foram acompanhados ao longo de 27 meses do estudo. Cerca de metade dos pacientes permaneceu livre de recidiva da doença após dois anos de acompanhamento, sem o uso de inibidor. Houve sobrevida livre de recorrência molecular em 61% dos pacientes após seis meses e em 53% dos pacientes ao fim de 18 meses. A interrupção do ITQ foi associada com a economia de grandes custos, estimados em 22 milhões de euros. Estes resultados foram apresentados no *Annual Meeting, 2016 pela American Society of Hematology (ASH)* (LANEUVILLE, 2018; SAUSSELE et al., 2016).

As diretrizes atuais recomendam que a maioria dos pacientes que atingiu remissão fazendo a terapia com ITQs mantenha o uso desses medicamentos por tempo indeterminado, já que ainda não está claro se a manutenção do tratamento é necessária para todos os pacientes, de acordo com um comunicado da ASH. Ainda, quanto mais tempo um paciente estiver em remissão, maior é a chance dele de permanecer em remissão livre de tratamento. Admitindo-se que os critérios de elegibilidade ideais estão abertos ainda, observou-se que os dados até agora sugerem ser necessária uma resposta molecular profunda (RM4 ou melhor) com duração de 12 meses antes de considerar a suspensão dos inibidores da tirosina quinase. Somente os pacientes em FC sem histórico de falha, de acordo com critérios da ELN, devem ser considerados para a suspensão. Alcançar e manter uma RM4 por um certo tempo antes de parar é obrigatório, assim como após a parada de medicação também (SAUSSELE et al., 2016).

3 MANUSCRITO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA MOLECULAR AOS INIBIDORES DE TIROSINO QUINASE ATRAVÉS DE MONITORAMENTO POR RQ-PCR EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA NO HUSM

RESUMO

AUTOR: Bárbara Villa

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) está associada ao cromossomo Philadelphia. Este cromossomo anormal forma o gene quimérico *BCR-ABL1*, o qual é responsável por produzir uma proteína com atividade de tirosino quinase. Os fármacos inibidores desta proteína (ITQs) usados no Brasil são mesilato de imatinibe (MI), dasatinibe e nilotinibe. A resposta a estes tratamentos pode ser expressa em três níveis: hematológica, citogenética e molecular. Esta última é a mais sensível e é avaliada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RQ-PCR). O tratamento visa o alcance da Resposta Molecular Maior (RMM), cuja razão dos níveis do transcrito quimérico *bcr-abl1* e o controle endógeno são menores ou iguais a 0,1%. O *European Leukemia Net* (ELN) estabelece diretrizes para as respostas moleculares de acordo com a quantificação dos transcritos e o tempo de tratamento com ITQs, classificando-as como resposta ótima, alerta e falha. Segundo a literatura, sabe-se que aproximadamente 15-25% dos pacientes tratados com MI não alcançam a resposta ótima. Em virtude do baixo número de trabalhos que mostram como é o monitoramento molecular da LMC no Brasil resolvemos avaliar a resposta molecular ao tratamento com os ITQs de pacientes com LMC tratados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) através do monitoramento por RQ-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*. A análise se deu através do banco de dados do Serviço de Hematologia-Oncologia do HUSM e a quantificação dos transcritos e a pesquisa de mutação no gene *ABL* foram realizadas em laboratório externo. Foram revisados 117 prontuários, sendo que 58,11% eram da população masculina. A média de idade ao diagnóstico foi de 48,1 anos e 9,4% dos pacientes foram a óbito. Seis pacientes foram analisados à parte por características diferenciadas dos demais. Assim, dos 111 pacientes, 52,25% dos pacientes receberam exclusivamente MI, 42,30% atingiram a RMM aos 12 meses e 73,40% tiveram RMM em algum momento durante o tratamento com MI. 54,25% dos pacientes que usaram exclusivamente o MI alcançaram a RMM e a mantiveram até o fim. Dos 47,74% que mudaram de ITQ, 58,82% alcançaram a RMM logo após a troca e mantiveram até o fim esta resposta. Dos 19 (37,25%) pacientes que falharam ao longo da troca, 14 foram para a terceira linha de terapia. Atualmente 91,06% dos pacientes que usam MI estão com RMM, assim como 65,37% dos pacientes que usam nilotinibe e 58,81% dos que usam dasatinibe. Dos pacientes que foram testados para mutação no gene *ABL*, 40% tinham presença. Observamos uma melhora no monitoramento ao longo do tempo, bem como bons resultados de RMM frente aos 3 ITQs, o que está em acordo com a literatura. O HUSM tem sido bem visto no cenário brasileiro com o monitoramento molecular que tem com seus pacientes para avaliar as respostas do uso de ITQs.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica. Monitoramento molecular. BCR-ABL1. Resistência ao Imatinibe

Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa caracterizada por hiperplasia mieloide na medula óssea e granulocitose no sangue periférico (MOREIRA E BOECHAT, 2009). A LMC se caracteriza também pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) em que a t(9;22) gera por consequência a fusão dos genes *BCR* e *ABL*, cujo produto é uma proteína com atividade de tirosino-quinase de mesmo nome (FUNKE, 2008). A produção desta proteína é controlada pelos inibidores de tirosino-quinase (ITQs). No Brasil, o ITQ usado como primeira linha de tratamento é o Mesilato de Imatinibe (MI) e para os pacientes com resistência ou intolerância os ITQs usados como segunda linha de terapia são os de segunda geração: dasatinibe e nilotinibe (JABBOUR E KANTARJIAN, 2014).

A resposta a estes tratamentos pode ser expressa em três níveis: hematológica, citogenética e molecular. Esta última é avaliada por método quantitativo da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RQ-PCR) no sangue periférico. Esta técnica é muito mais sensível que o exame hematológico e citogenético. A resposta molecular pode ser definida como a razão entre o número de transcritos do gene *BCR-ABL1* e o número de transcritos do gene controle (genes *ABL1*, *BCR* ou *GUSB*), expressa em escala internacional (EI) e relatada em escala logarítmica (BACCARANI et al., 2013). A resposta molecular maior (RMM) é o objetivo a ser alcançado no tratamento com MI e representa uma quantificação dos transcritos *bcr-abl1* $\leq 0,1\%$; A resposta molecular completa (RMC) é definida quando o número de transcritos atinge níveis indetectáveis pelo método do RQ-PCR.

O *European Leukemia Net* (ELN) estabelece diretrizes para as respostas aos tratamentos com ITQs, classificando-as como resposta ótima, alerta e falha. Entre essas diretrizes estão as respostas moleculares de acordo com a quantificação dos transcritos e o tempo de tratamento com ITQs. A resposta ao tratamento com MI é definida como ótima se: aos 3 meses após o início do tratamento a quantificação dos transcritos *bcr-abl1* alcançou a redução de 1 log (10%); aos seis meses a quantificação *bcr-abl1* atingiu a redução de 2 logs (1%) e aos 12 meses a

quantificação bcr-abl1 alcançou a RMM, ou seja, redução de 3 logs ($\text{bcr-abl1} \leq 0,1\%$). Os pacientes com resposta de alerta requerem um monitoramento mais frequente para garantir que esses pacientes possam se beneficiar da mudança de abordagem terapêutica em tempo hábil para não evoluírem para falha (BACCARANI et al., 2013)

A frequência da realização dos exames moleculares por RQ-PCR durante o tratamento deve ser a cada 3 meses até atingir RMM; após RMM, a cada 3 a 6 meses. Se houver falha de resposta ou progressão, realizar RQ-PCR, análise mutacional e citogenética (BACCARANI et al., 2013).

Apesar dos bons resultados obtidos com a terapêutica do MI, 15-25% dos pacientes em fase crônica evoluem com resistência – sem nunca terem respondido ao tratamento (ou seja, resistência primária)- ou com a perda da sensibilidade ao fármaco ao longo do tempo (resistência secundária) (VIGIL et al., 2011). Esta resistência ao MI tem sido associada a vários mecanismos heterogêneos, entre eles mecanismos moleculares como mutações no gene *ABL*. As resistências primária e secundária são definidas como respostas de alerta e falha até os 6 meses e após os 6 meses, respectivamente (PAGNANO, 2008).

Devido à escassez de trabalhos que mostrem como está este monitoramento da LMC nas instituições brasileiras nos motivamos a investigar como está o Hospital Universitário de Santa Maria no cenário nacional e mundial. Tendo em vista que o monitoramento molecular por RQ-PCR é a melhor opção para definir resposta terapêutica e o seguimento do paciente segundo o *National Comprehensive Center Network* (NCCN) e a ELN (BRANDFORD et al., 2006), torna-se de fundamental relevância investigar a resposta molecular ao tratamento com os ITQs dos pacientes atendidos pelo HUSM, além de oferecer subsídios aos médicos que tratam esses pacientes.

Objetivos

O Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria atende um grande número de pacientes com diagnóstico de Leucemia Mieloide Crônica que fazem o monitoramento molecular por intermédio do Laboratório de Biologia Molecular. Sendo assim, pretendeu-se com este trabalho avaliar a resposta molecular ao tratamento com os ITQs de pacientes com LMC tratados no HUSM através do monitoramento por RQ-PCR para quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*.

Métodos

Realizamos um estudo descritivo retrospectivo entre 2001 e 2018 onde foram incluídos pacientes com diagnóstico de LMC estabelecido a partir de análise cariotípica convencional ou *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) para identificação do cromossomo Ph, com identificação qualitativa do gene quimérico *BCR-ABL1* através de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa), que estivessem fazendo uso de ITQs e que tivessem sido submetidos ao monitoramento molecular através do Serviço de Hematologia-Oncologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

Realizamos a coleta de dados pelo Banco de Dados do Serviço de Hematologia-Oncologia do HUSM através de acesso aos prontuários dos pacientes e aos exames de RQ-PCR dos transcritos do gene *BCR-ABL1* e de pesquisa de mutação do gene *ABL*. A quantificação dos transcritos e a pesquisa de mutação no gene *ABL* foram realizadas em laboratório externo padronizado, validado e certificado, seguindo a Escala Internacional (EI), com apoio financeiro da *Novartis Brasil* e *Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA*, respectivamente. A coleta do material biológico foi feita pelos coletadores do Serviço de Hematologia-oncologia.

O monitoramento molecular qualitativo por RT-PCR é realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular desde 1999. Já o monitoramento quantitativo por

RQ-PCR é feito rotineiramente pelo Serviço de Hematologia-Oncologia desde 2013 e os pacientes foram coletados sequencialmente para determinar de quantos logs foi a redução da razão *BCR-ABL1*/gene controle (%). Branford et al. (2008) validou a utilização de uma EI para reportar os resultados da PCR, permitindo a comparação das taxas de resposta molecular entre diferentes laboratórios através do cálculo do fator de conversão. O uso do fator de correção permite que seja feita uma comparação dos resultados do tratamento em diferentes populações.

A coleta de dados foi feita através de planilhas que contemplavam os resultados dos testes moleculares de quantificação do transcrito *bcr-abl1* de acordo com os critérios de resposta da *European Leukemia Net* (Quadro 1 e 2) (BACCARANI et al., 2013). O tempo de intervalo foi determinado levando-se em consideração os tempos mais próximos segundo o recomendado pela ELN para monitorar a resposta ao tratamento (3 meses, 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, etc). Os pacientes incluídos nesta planilha foram também estratificados de acordo com sexo, idade, data do diagnóstico, início do MI, data do exame molecular, tempo do tratamento em meses, quantificação dos transcritos e sua respectiva resposta, dados clínicos relevantes de desfecho e presença de mutação.

Quadro 1 - Avaliação da resposta aos ITQs usados como primeira linha de terapia

	Resposta ótima	Resposta de alerta	Resposta de falha
Diagnóstico		CCA em céls Ph+	
3 meses	Ph+<35% e/ou <i>bcr-abl1</i> ≤10%	Ph+ 36-95% e/ou <i>bcr-abl1</i> >10%	Ph+>95% e/ou sem RHC
6 meses	Ph+0% e/ou <i>bcr-abl1</i> <1%	Ph+ 1-35% e/ou <i>bcr-abl1</i> – 10%	Ph+>35% e/ou <i>bcr-abl1</i> >10%
12 meses	<i>bcr-abl1</i> ≤0.1%	<i>bcr-abl1</i> 0.1-1%	<i>bcr-abl1</i> >1% e/ou Ph+>0%
Qualquer tempo	<i>bcr-abl1</i> ≤0.1%	CCA em céls Ph- (-7 ou 7q)	perda de RHC, RCC; perda de RMM confirmada*; CCA em ph + céls

Fonte: Adaptado de ELN, 2013

As informações deste quadro servem para pacientes que se encontram tanto em FC, FA ou FB, além de pacientes que tiveram intolerância à primeira linha de tratamento (no caso do Brasil, imatinibe). CCA: anormalidades cromossômicas clonais; RMM= $bcr-abl1 \leq 0.1\%$ = RM3 ou melhor; RHC: resposta hematológica completa (leucometria $< 10 \times 10^9/L$, basófilos $< 5\%$, plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ e sem presença de precursores mieloides imaturos no diferencial)* Em dois testes consecutivos em que cada um com nível de transcritos $\geq a 1\%$.

Quadro 2 - Definições de resposta para segunda linha de terapia em caso de falha de MI

	Resposta ótima	Resposta de alerta	Resposta de falha
Início		Sem RHC ou perda de RHC com MI ou perda de RCC a primeira linha de ITQ ou de alto risco	
3 meses	$bcr-abl1 \leq 10\%$ e/ou $Ph+ < 65\%$	$bcr-abl1 > 10\%$ e/ou $Ph+ 65-95\%$	Sem RHC ou $Ph+ > 95\%$ ou novas mutações
6 meses	$bcr-abl1 \leq 10\%$ e/ou $Ph+ < 35\%$	$Ph+ 35-65\%$	$bcr-abl1 > 10\%$ e/ou $Ph+ > 35\%$ ou novas mutações
12 meses	$bcr-abl1 < 1\%$ e/ou $Ph+ 0\%$	$bcr-abl1 1-10\%$ e/ou $ph+ 1-35\%$	$bcr-abl1 > 10\%$ e/ou $Ph+ > 35\%$ e/ou novas mutações
Qualquer tempo	$bcr-abl1 \leq 0.1\%$	CCA/Ph- ou $bcr-abl1 > 0.1\%$	Perda da RHC ou da RCC ou RCP; novas mutações; perda confirmada da RMM*; CCA ph+

Fonte: adaptado de ELN, 2013

Essas definições são principalmente baseadas em estudos para nilotinibe e dasatinibe, mas podem ser provisoriamente aplicadas para bosutinibe e ponatinibe até que mais estudos sejam realizados. CCA: anormalidades cromossômicas clonais; RMM= $BCR-ABL1 \leq 0.1\%$ = RM3 ou melhor; RHC: resposta hematológica completa (leucometria $< 10 \times 10^9/L$, basófilos $< 5\%$, plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ e sem presença de precursores mieloides imaturos no diferencial) * Em dois testes consecutivos em que cada um com nível de transcritos $\geq a 1\%$

Após a coleta dos dados, estes foram compilados através de uma análise estatística do tipo descritiva e analítica. Na estatística descritiva, os resultados foram apresentados utilizando-se médias aritméticas, medianas, valores mínimos e

máximos, frequências e porcentagens. Na analítica, o tempo de sobrevida foi medido em meses e definido como o período entre a data de diagnóstico e a ocorrência do evento de interesse (óbitos) ou até o término do estudo. Na sobrevida global (SG) foi considerado evento o óbito e na sobrevida livre de evento (SLE) foi considerado como evento a troca de medicação/falha. Para comparar, por sexo, as curvas de sobrevida de *Kaplan-Mayer* foi utilizado o teste de *log-rank*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O presente estudo foi submetido à aprovação com o título de AVALIAÇÃO DO USO DE INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM CAAE 46884415.2.0000.5346 e pela Unidade de Pesquisa Clínica do HUSM.

Resultados

Foram incluídos neste estudo 117 pacientes que receberam tratamento com ITQ para LMC entre 2001 e 2018; portanto, 17 anos de acompanhamento, sendo a última revisão de prontuários em novembro de 2018. Destes 117 pacientes, cinco receberam tratamento com transplante de medula óssea (TMO) alogênico e foram analisados à parte bem como outro paciente que será discutido individualmente por incoerência entre a resposta molecular e as respostas citogenética e hematológica.

Na Tabela 1 apresentamos as características demográficas dos 117 pacientes quanto ao sexo, idade ao diagnóstico e óbitos. Em relação ao óbito verificamos que houve a perda de 11 pacientes (9,40%), sendo que 8 foram relacionados diretamente à LMC.

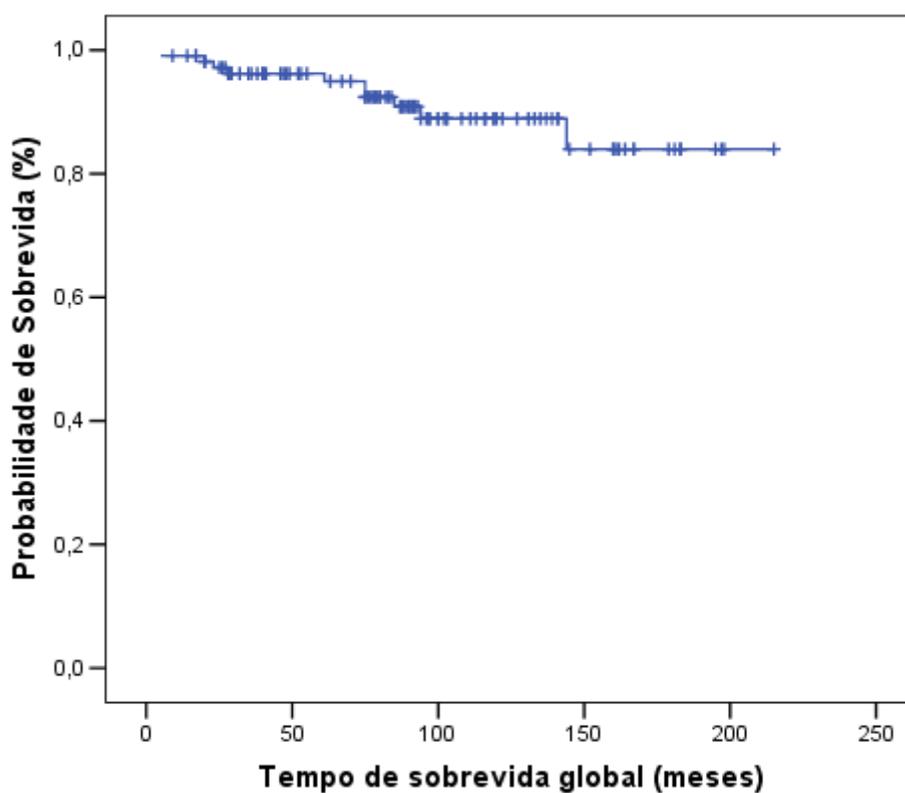
Tabela 1 - Características demográficas dos 117 pacientes

Gênero	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Feminino	49	41,88
Masculino	68	58,11
Idade ao diagnóstico	Média (anos)	Varição (anos)
Feminino	50,8	10,6 – 82,4
Masculino	46,1	16,8 – 83
Média geral	48,1	10,6 – 83,0
Óbito	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Sim	11	9,40
Não	106	90,6

Fonte: autores

A Figura 1 apresenta os resultados da sobrevida global dos 117 pacientes com LMC em meses. Observamos que a probabilidade de sobrevida dos pacientes em 2 anos foi de 97,2%; em 5 anos, a probabilidade de sobrevida encontrada foi de 96,2% e em 10 anos foi de 88,9%.

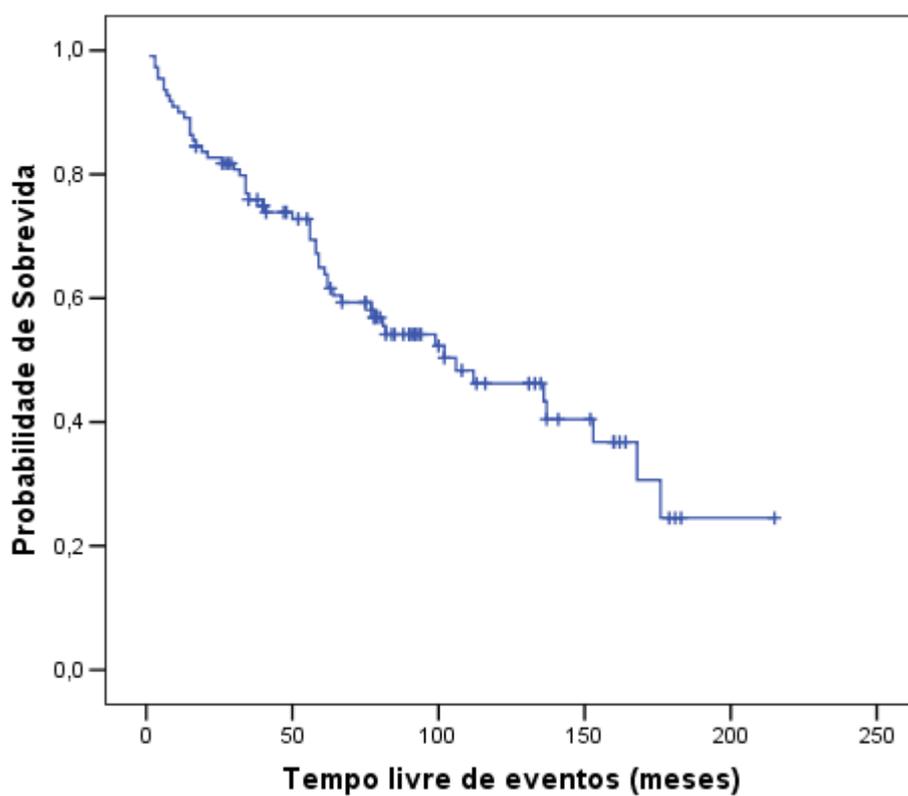
Figura 1- Curva de sobrevida global dos pacientes com LMC



Fonte: autores

A Figura 2 apresenta os resultados da sobrevida livre de eventos dos 117 pacientes com LMC em meses. Pode-se observar que em 24 meses a probabilidade de sobrevida livre de evento para os pacientes foi de 82,7%; em 60 meses, foi de 65,0% e em 120 meses, 46,2%.

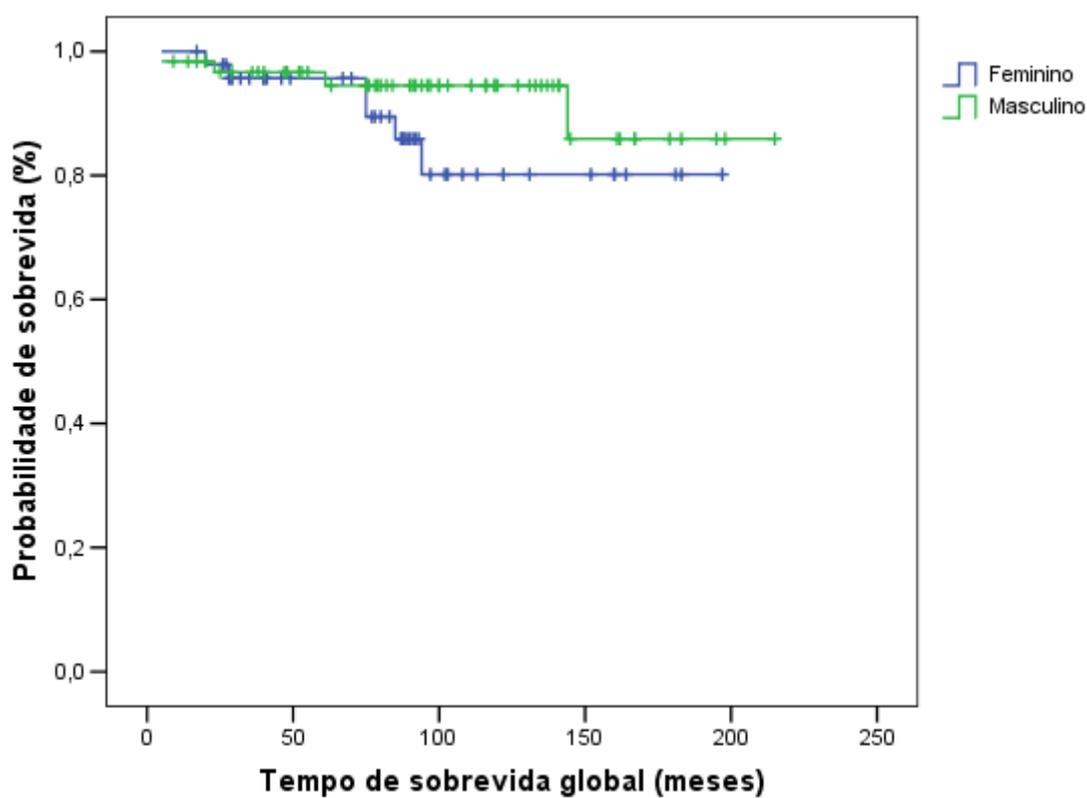
Figura 2- Curva de sobrevida livre de evento dos pacientes com LMC



Fonte: autores

Na Figura 3, podemos observar que não existiu diferença na probabilidade de sobrevida global entre os sexos ($\log\text{-rank}=0,238$). Analisando os resultados em 24 meses, verifica-se que esta é de 97,9% para as mulheres e de 96,6% para os homens; e em 60 meses, a probabilidade de sobrevida global é de 95,6% para as mulheres e de 96,6%.

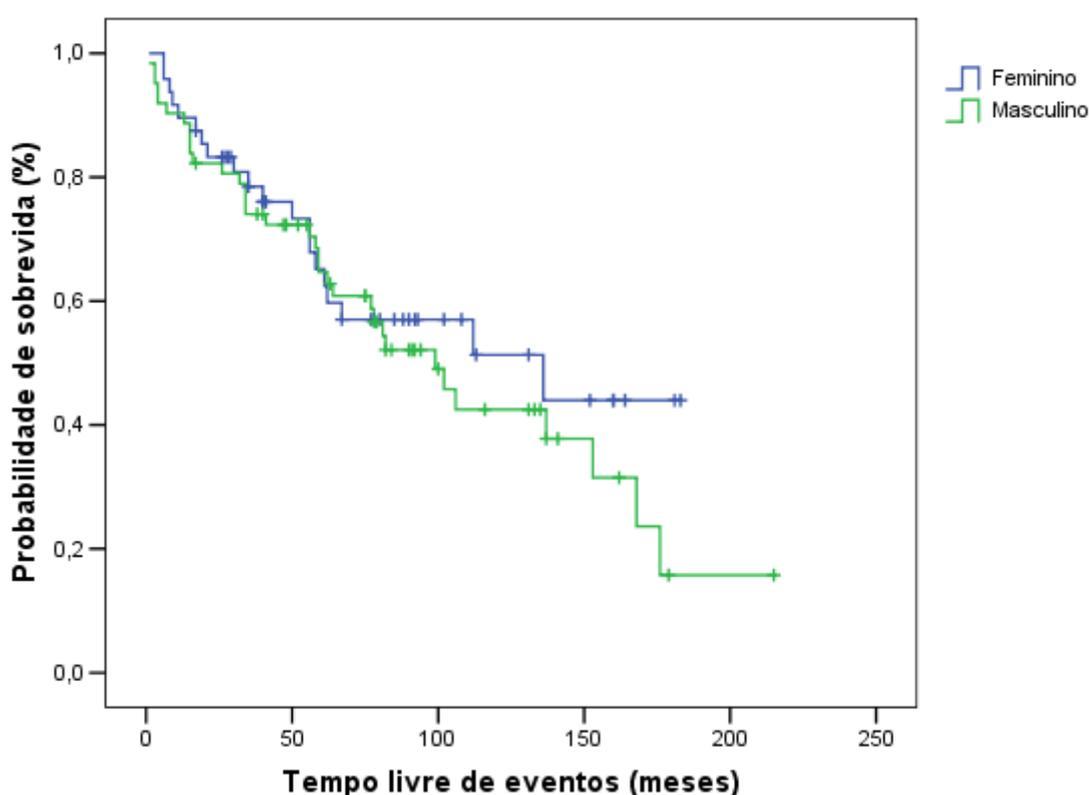
Figura 3- Curva de sobrevida global – comparação entre sexo



Fonte: autores

Quando avaliados os resultados apresentados na Figura 4, verifica-se que não existe diferença entre as curvas de sobrevida ($\log\text{-rank}=0,418$). Em 24 meses, a probabilidade de sobrevida livre de evento dos pacientes do sexo feminino era de 83,2%, enquanto que a dos pacientes do sexo masculino era de 82,3%. Em 60 meses a probabilidade era de 65,2% e o sexo masculino era de 64,7%.

Figura 4- Curva de sobrevida livre de evento – comparação por sexo



Fonte: autores

Os 111 pacientes do estudo receberam MI como primeiro ITQ para tratamento a partir de 2001 e passaram a ser monitorados por RQ-PCR a partir de maio de 2013. Assim, 78 pacientes começaram o seu tratamento antes desta data e 33 pacientes após maio de 2013. O tempo de seguimento deste estudo foi de 215 meses com uma mediana de 88.50 meses (5 meses – 215 meses) e a média de exames RQ-PCR por

paciente foi de 6,08.

Monitoramento durante o uso de MI

Dos 111 pacientes, 58 (52,25%) foram tratados exclusivamente com MI durante uma mediana de tempo de 86.50 meses (17 meses - 215 meses), sendo que dois destes foram a óbito enquanto usavam MI por causas não decorrentes da LMC: insuficiência renal crônica prévia ao diagnóstico de LMC e ruptura de aneurisma abdominal, com 28 e 85 meses de tratamento com MI, respectivamente.

Na Tabela 2 pode ser observada a distribuição dos pacientes que fizeram uso de MI de acordo com o primeiro exame de RQ-PCR e suas respectivas respostas moleculares. Dos 111 pacientes analisados, 94 (84,68%) foram monitorados quando utilizavam a primeira linha de terapia. Apenas 21 (18,91%) pacientes realizaram seu primeiro exame de monitoramento aos três meses de tratamento com MI, conforme preconiza a ELN, e 36 (32,43%) pacientes só fizeram exames de RQ-PCR após 36 meses de tratamento com este ITQ.

Tabela 2 - Primeiro exame de monitoramento molecular dos pacientes em uso de primeira linha de terapia –MI-e suas respostas moleculares (n=94)

Resposta	Tempo (meses)						
	3m (2-4)	6m (5-8)	12m (9-14)	18m (15-21)	24 m (22-27)	36m (28-38)	>36m
Ótima	14	3	3	4	0	8	21
Alerta	7	3	0	3	6	1	5
Falha	0	1	3	1	0	1	10
Total	21	7	6	8	6	10	36

Fonte: autores

Os resultados de RQ-PCR também foram agrupados em seis primeiros intervalos de tempo próximos aos considerados ideais pela ELN a fim de avaliar as respostas ao tratamento com MI (Tabela 3). Oito (8,51%) pacientes tiveram um monitoramento próximo do ideal quando no uso de MI, tendo em vista que foram monitorados durante 5 intervalos de tempo. Apenas 1 (1,06%) paciente foi monitorado durante os 6 primeiros intervalos de tempo.

Foram monitorados 26 pacientes por RQ-PCR aos 12 meses. Destes, 15 (57,69%) tiveram resposta de alerta/falha e 11 (42,30%) atingiram RMM aos 12 meses, sendo que 8 permaneceram com RMM e 2 não realizaram mais exames de RQ-PCR. Tiveram em algum momento RMM durante o tratamento com MI 69 (73,40%) pacientes e destes 51 (54,25%) mantiveram a RMM até a última análise de prontuário.

Tabela 3 – Resultados de RQ-PCR dos pacientes de LMC ao tratamento com MI durante os 6 primeiros intervalos de tempo (n=94)

Tempo (meses)	3m (2-4)	6m (5-8)	12m (9-14)	18m (15-21)	24m (22-27)	36m (28-38)
Transcritos bcr-abl1						
≥10% (SRM)	7	2	2	0	1	2
≤10 - 1% (RMI)	7	7	5	5	4	1
≤1 - 0.1% (RMI)	6	5	8	3	8	7
≤0.1% (RM3)	1	4	6	8	3	10
≤0.01 (RM4)	0	2	2	3	6	8
≤0.0032 (RM4,5)	0	0	3	4	2	5
RMC	0	0	0	0	0	2
Total de exames	21	20	26	23	24	35

Fonte: autores

SRM: Sem Resposta Molecular= Sem Queda; RMI: Resposta Molecular Incompleta= Queda de 1 e 2 log; RM3: Resposta molecular maior com queda de 3 log; RM4: Resposta molecular maior com queda de 4 log; RM 4,5: Resposta molecular maior com queda de 4,5 log; RMC: Resposta molecular completa: níveis indetectáveis de transcritos

Monitoramento durante o uso de ITQs de segunda linha de terapia

Os 53 (47,74%) pacientes em que o MI foi suspenso, por falha ou intolerância, fizeram uso deste ITQ por 49,25 meses (1m – 176m) e mudaram para um dos inibidores de segunda linha de terapia: 26 para o dasatinibe e 25 para nilotinibe. Destes, dois pacientes foram a óbito nos 3 primeiros meses em que mudaram de ITQ por causas decorrentes da LMC.

A distribuição dos pacientes que fizeram uso de ITQ de segunda linha de terapia de acordo com o primeiro exame de RQ-PCR e suas respectivas respostas moleculares está na Tabela 4. Dezesete pacientes tiveram seu primeiro exame de monitoramento molecular somente quando já recebiam um segundo ITQ. Dos 51 pacientes, 40 (78,43%) tiveram resposta ótima no primeiro exame de monitoramento (20 para dasatinibe e 20 para nilotinibe), sendo que 25 foram vistos aos 3 meses, conforme preconiza a ELN.

Tabela 4 – Primeiro exame de monitoramento molecular dos pacientes em uso de segunda linha de terapia - dasatinibe ou nilotinibe – e suas respostas moleculares (n=51)

Resposta	Tempo (meses)						
	3m (2-4)	6m (5-8)	12m (9-14)	18m (15-21)	24m (22-27)	36m (28-38)	>36m
Ótima	25	4	5	1	3	1	1
Alerta	0	0	0	0	0	0	1
Falha	3	1	3	1	1	0	1
Total	28	5	8	2	4	1	3

Fonte: autores

Os resultados de RQ-PCR foram agrupados em seis primeiros intervalos de tempo próximos aos considerados ideais pela ELN a fim de avaliar as respostas ao tratamento com os ITQs usados em segunda linha de terapia (Tabela 5). Nove (17,64%) pacientes tiveram um monitoramento próximo do ideal quando no uso do segundo ITQ, já que foram monitorados durante 5 intervalos de tempo.

Dos 40 pacientes com resposta ótima após a troca, 30 seguiram com esta resposta até o exame de monitoramento mais recente, ou seja, 58,82% dos 51 monitorados. Dezenove (37,25%) pacientes tiveram resposta de alerta e falha molecular ao longo do tratamento com a segunda linha de terapia e 4 destes vieram a óbito por causas decorrentes da LMC e 1 por causas não decorrentes da LMC. Treze pacientes passaram para a terceira linha de terapia com uso de ITQ de segunda geração (5 mudaram para o dasatinibe e 8 para nilotinibe) e 1 para terceira geração (ponatinibe), entretanto 2 pacientes foram a óbito por causas decorrentes da LMC.

Tabela 5 – Resultados dos RQ-PCR dos pacientes de LMC ao tratamento com a segunda linha de terapia: dasatinibe ou nilotinibe (n=51)

Transcritos bcr-abl1	Tempo (meses)					
	3 (2-4)	6 (5-8)	12 (9-14)	18 (15-21)	24 (22-27)	36 (28-38)
≥10% (SRM)	6	3	6	6	2	5
≤10 - 1% (RMI)	12	4	8	7	4	4
≤1 - 0.1% (RMI)	5	4	5	3	0	2
≤0.1% (RM3)	9	6	7	4	7	6
≤0.01 (RM4)	1	0	2	3	3	3
≤0.0032 (RM4,5)	1	2	1	0	2	4
RMC	0	0	1	0	0	0
Total de exames	34	19	30	23	18	24

Fonte: autores

SRM: Sem Resposta Molecular= Sem Queda; RMI: Resposta Molecular Incompleta= Queda de 1 e 2 log; RM3: Resposta molecular maior com queda de 3 log; RM4: Resposta molecular maior com queda de 4 log; RM 4,5: Resposta molecular maior com queda de 4,5 log; RMC: Resposta molecular completa: níveis indetectáveis de transcritos

Na Tabela 6 temos as respostas moleculares de 99 pacientes de acordo com seus inibidores utilizados. Nota-se que houve a perda de 11 pacientes por óbito e a mudança de 14 pacientes para a terceira linha de terapia - o que inclui um paciente que hoje faz uso de ponatinibe e não foi considerado para análise desta tabela já que

seu monitoramento molecular ainda não havia sido realizado devido ao pouco tempo de uso.

Tabela 6 – Respostas moleculares atuais (n=99)

Resposta	Imatinibe N=56	Dasatinibe n=17	Nilotinibe N=26
RMC	16,07%	5,88%	3,84%
RMM	74,99%	52,93%	61,53%
RMI	7,14%	35,29%	23,07%
SRM	1,78%	5,88%	11,53%

Fonte: autores

SRM: Sem Resposta Molecular= Sem Queda; RMI: Resposta Molecular Incompleta= Queda de 1 e 2; RMM: somatório das RM3, RM4 e RM4,5; RMC: Resposta molecular completa: níveis indetectáveis de transcritos

Em relação às mutações no gene *ABL*, dos 53 pacientes com falha/intolerância no uso de MI, 25 foram submetidos a exames de pesquisa de mutação. Observou-se a presença de 9 tipos diferentes de mutação em 10 pacientes (40%): F359V, T315I (2), F317L, M351T, Q252H, F486S, F359I, N244V e E255K.

Dos 5 pacientes que receberam tratamento com TMO alogênico, o tempo médio de sobrevida destes foi de 205 meses (180m-234m). Quatro destes pacientes mantêm RMM segundo RQ-PCR e um teve ausência de bandas na PCR qualitativa.

Tivemos um paciente que teve incoerência entre as respostas moleculares e as citogenética e hematológica: JIK, masculino, 34,5 anos ao diagnóstico em setembro de 2010, recebeu MI a partir de 10/02/2011 como primeira linha. Já ao diagnóstico, a citogenética apresentava nulissomia do Y e ao PCR qualitativo uma banda atípica de 800pb. A Resposta Hematológica Completa (RHC) foi observada até 56 meses do uso de MI, simultaneamente com a RMM. Porém, apresentou falha hematológica com citogenética de agudização e RQ-PCR em RMM. À mudança de ITQ houve RHC e RCC com duração de 23 meses quando houve nova falha hematológica e citogenética, porém, mantendo RMM.

Discussão

O HUSM, maior hospital público do interior do Rio Grande do Sul, é vinculado à Universidade Federal de Santa Maria. Além de ser referência no tratamento de doenças hematológicas-oncológicas, incluindo a LMC, atende a população centro-oeste do estado exclusivamente pelo SUS (HUSM, 2018).

A Organização Mundial da Saúde aponta que a maior incidência de LMC é entre a quinta e sexta década de vida (DEININGER E DRUKER, 2003), todavia estudos brasileiros apontam que a média de idade em países em desenvolvimento como o Brasil é dez anos mais baixa (WANG et al., 2010; CAMPOS et al., 2010), o que corrobora com nossos achados (48,1 anos). Quanto ao sexo, há uma leve predominância do sexo masculino em nosso estudo (58,11%) assim como em outros relatos (CALZADA et al., 2016; VIEIRA-MION et al., 2017; RÊGO, 2014). A perda de pacientes por óbito em nossos pacientes se assemelha ao encontrado por Varela-Briceño et al (2018) de 8,3% e é mais baixa do que a encontrada em estados nordestinos como observado por Rêgo (2014) no estado do Piauí (11,8%) e por Aquino et al (2009) no estado do Ceará (30,7%).

As taxas de Sobrevida Global (SG) dos nossos pacientes foram semelhantes às encontradas pelo estudo argentino em que a probabilidade de SG em dois anos foi de 100%, em cinco anos foi de 97% e em dez anos foi de 93% (OSÓRIO et al., 2017), assim como em estudo realizado no Rio Grande do Sul que encontrou uma taxa de SG em 18 meses de 98,2% (SANTOS, 2007). As taxas de SG dos pacientes atendidos em Santa Maria são mais altas do que no estudo boliviano de Calzada et al (2016) que apontavam uma taxa de SG em cinco anos de 64% e em dez anos de 36%.

As taxas de Sobrevida Livre de Evento (SLE) do nosso estudo possuem uma queda nos períodos de tempo analisados (dois, cinco e dez anos) e mostram-se inferiores aos encontrados pelo estudo argentino (OSORIO et al., 2017), mas ao considerarmos a SLE do estudo boliviano (CALZADA et al., 2016) aos cinco anos (42%) e dez anos (19%), nossos resultados são melhores. Nossa SLE aos dois anos (82,7%) é mais alta que a do estudo costa-riquenho em que a SLE após três anos de

tratamento foi de 65,7% (VARELA-BRICEÑO et al., 2018) e a do estudo brasileiro de Silveira (2011) que foi de 67,5%.

É interessante destacar que tanto a NCCN e a ELN consideram o monitoramento molecular por RQ-PCR a melhor opção para definir resposta terapêutica e o seguimento do paciente (BRANDFORD et al., 2006), sendo a partir de 2006 indicado a todos pacientes com LMC após a divulgação das recomendações pelo ELN 2006 (BACCARANI et al., 2006), entretanto estudos que avaliavam resultados de transcritos bcr-abl1 já aconteciam antes disso, incluindo estudo brasileiro (FUNKE et al., 2005; HUGHES et al., 2003; HUGHES et al., 2004). No Brasil existem poucos laboratórios certificados capazes de realizar o monitoramento do BCR-ABL1 e relatar os resultados de acordo com a escala internacional (EI) já que a padronização destes exames envolve troca de amostras com laboratórios de referência, equipamentos, equipe treinada, reagentes e calibradores (HUGHES et al., 2006; PAGNANO, 2017). O monitoramento nos pacientes do HUSM foi iniciado em 2013 e em virtude disso 32,43% dos pacientes foram monitorados tardiamente (após 36 meses que iniciaram o MI) assim como 15,35% dos pacientes foram monitorados quando já haviam trocado de inibidor. Tiveram seu primeiro exame de monitoramento no tempo preconizado, ou seja, aos três meses 18,91% dos pacientes em uso de primeira linha: MI. Metade dos pacientes que recebiam ITQ de segunda linha de terapia foram monitorados após três meses de início do novo tratamento, o que sugere uma melhora do monitoramento ao longo do tempo já que os pacientes que tiveram seu diagnóstico antes de 2013 foram monitorados independente de intervalo de tempo e para os pacientes que tiveram seu diagnóstico após 2013 tentou-se na medida do possível um monitoramento sequencial.

A dificuldade para iniciar o monitoramento molecular nas instituições é uma realidade não apenas do HUSM, mas também de centros bem reconhecidos na área da hematologia-oncologia como o do HC-UFPR que realizam em seus próprios laboratórios estas análises, conforme Vieira-Mion et al (2017). O monitoramento molecular de maneira sequencial como preconiza a ELN é um desafio para as instituições que tratam de pacientes com LMC, principalmente as públicas, pois estas

reconhecem sua importância, porém os recursos técnicos, estruturais e financeiros são muitas vezes limitados para sua completa execução. No estudo de Vieira-Mion et al (2017) em que 1403 amostras de pacientes de 26 instituições brasileiras participaram, apenas 5,8% destes foram analisados em todos os seis primeiros intervalos de tempo preconizados. Em nosso estudo, 8,5% pacientes que recebiam MI foram analisados de maneira próxima do ideal, ou seja, em cinco intervalos de tempo. Salientamos aqui mais uma vez que os pacientes que tiveram seu diagnóstico a partir de 2013 passaram a ser melhor monitorados, haja vista que dos pacientes que receberam ITQ de segunda linha, 18% foram monitorados em cinco intervalos de tempo.

A RMM alcançada aos 12 meses com MI de 42,3% teve correspondência ao encontrado por Machado e Pagnano (2010) de 40%, Varela-Briceño et al (2018) de 43,4% e também se manteve próxima do estudo australiano TIDEL (47.4%) (HUGHES et al., 2004). Nosso resultado também foi semelhante aos seguintes: Um estudo francês comparou diferentes doses de 400 mg e 600 mg de MI e suas RMM aos 12 meses mostrou resultados de 40% e 52% (GUILHOT, 2008); Em estudo semelhante da Novartis em que avaliou-se a dosagem de 400 mg e 800 mg, foram alcançados RMM aos 3 meses (3% vs 12%), 6 meses (17% vs 34%), 9 meses (33% vs 45%) e aos 12 meses (40% vs 46%) (CORTES, 2008). Nosso resultado foi inferior ao encontrado no estudo IRIS onde a proporção de pacientes que atingiram a RMM depois de 12 meses foi de 53% (HUGHES et al, 2003). O alcance da RMM aos 12 meses é tido como o objetivo do tratamento com MI, segundo o ELN, já que se o paciente até os 12 meses não tiver atingido esta resposta, o médico tem indicação para investigar a possibilidade de presença de mutação no gene ABL e/ou trocar de ITQ tendo em vista a relação existente entre a maior sobrevida de pacientes que atingem a RMM aos 12 meses (BACCARANI et al., 2013).

Durante o tratamento com MI, 73,40% dos nossos pacientes tiveram em algum momento RMM, resultado muito similar ao encontrado na Costa Rica (76%) (VARELA-BRICEÑO et al., 2018). Quanto aos pacientes que iniciaram com MI, alcançaram a RMM e a mantiveram, nosso resultado de 54,25% em uma mediana de tempo de

86,50 meses foi superior a estudo britânico em que durante um seguimento de 60 meses, 39% alcançaram a RMM e 35% a mantiveram (DE LAVALLADE et al., 2008), mas foi inferior ao estudo *International Randomized Study of Interferon and STI-571* (IRIS) em que 80% dos pacientes alcançaram e mantiveram a RMM num seguimento mediano de 60 meses. O estudo IRIS é um estudo de fase III que comparou interferon associado à citarabina em baixa dose ao MI, em pacientes com LMC recém-diagnosticados (DRUKER et al., 2006). Esta variação entre o resultado deste estudo e o nosso pode ser devido a diferenças na metodologia utilizada: enquanto que o estudo IRIS foi prospectivo e randomizado, o nosso foi retrospectivo.

A proporção de pacientes que fizeram uso exclusivo de MI (52,25%) foi praticamente a mesma que alcançou a RMM (54,25%) e também muito parecida com a de estudo brasileiro em que 52,8% dos pacientes ainda faziam uso de MI ao término da avaliação (RÊGO, 2014), entretanto a proporção de pacientes no nosso estudo que mudaram para um inibidor de segunda linha de terapia (47,74%) foi superior ao observado na cidade de Santos (29,73%) e nos países do Reino-Unido (17%), Argentina (20%) e Costa Rica (21,1%) (MARTINO E FERREIRA, 2015; DE VALADALE, OSÓRIO et al., 2017; VARELA-BRICEÑO et al., 2018). Esta proporção de pacientes maior que trocaram de ITQ pode ser justificada pelos seguintes dados que conseguimos levantar: 17 pacientes (15,35%) que passaram a utilizar um segundo inibidor quando ainda não fazíamos monitoramento por RQ-PCR (4 por intolerância, 6 não alcançaram RHC e 7 não alcançaram RCC) e por 15 pacientes (13,63%) que estavam em falha molecular após o primeiro de exame de monitoramento aos 36 meses de tratamento. A falta de aderência ao tratamento (o que inclui o mau uso das drogas devido aos efeitos colaterais) pode ser uma justificativa para a menor resposta encontrada por nós em relação a RMM dos pacientes em uso de MI (BACCARANI et al., 2013).

Em virtude desta porcentagem maior de pacientes que trocaram de medicação, sem ter sua resposta molecular avaliada, e do número baixo de pacientes que foram monitorados sequencialmente antes e após 6 meses de tratamento com MI não podemos diferenciar os pacientes com resistência primária e secundária. Apesar

disso, são esperados que 15 a 25% dos pacientes evoluam com resistência ao tratamento com IM (VIGIL et al., 2011; JABBOUR E KANTARJIAN, 2014). Os mecanismos de resistência independentes ABL e, assim, responsáveis pela resistência primária ao IM, incluem: efluxo da droga por meio da expressão da glicoproteína P; baixa atividade do transportador celular hOCT-1; ligação do IM com glicoproteína ácida-1 (GPA), o que reduz sua atividade; ativação de outras vias de sinalização, como por exemplo Ras (JORGENSEN E HOLYOAKE, 2007). Os dependentes do *BCR-ABL1* - responsáveis pela resistência secundária - incluem amplificação ou superexpressão da sequência ABL, mutação gênica na molécula ABL, evolução clonal ou administração inadequada do medicamento. As causas de resistência secundária são mais conhecidas, especialmente, pelos pontos de mutação no oncogene *BCR-ABL1*, os quais representam a causa mais comum, ocorrendo entre 35 a 70% dos pacientes com resistência secundária (PAGNANO, 2008; SHAH, 2005).

Dos 25 pacientes com possível falha que foram submetidos a pesquisa de mutação no gene ABL, 40% tiveram positividade. Portanto, podemos dizer que a resistência de nossos pacientes é causada por 40% de pacientes que possuem a presença de mutação. Este resultado foi praticamente o dobro dos resultados encontrados por Varela-Briceño et al (2018) e Costa et al (2018), 24.5% e 24.87%, respectivamente. Nossos achados vão ao encontro dos 41% de positividade observados por Visani et al (2010) e 36,4% por Alves (2009). Nosso resultado é inferior ao que Apperley (2007) esperava encontrar dos pacientes com falha: 50%. As mutações de ponto no domínio quinase da p210 constituem o principal mecanismo de resistência secundária dos ITQs fazendo com que interfiram na ligação da droga à proteína alvo levando à reativação da atividade quinase (BACCARANI et al., 2008; WIECZOREK E UHAREK, 2015). Este domínio é dividido em 4 regiões e é em decorrência da posição da mutação que diferentes níveis de resistência são observados, o que requer mudanças na terapia. Na análise da localização das mutações encontradas em nosso estudo, percebemos que a região CD (*catalytic domain*) é a região com maior incidência de mutações dos nossos pacientes (3/9), depois vem a TKI-BS (*tyrosine kinase inhibitor binding site*) onde se localiza a mutação

T315I (2/9), seguida da região PL (*P-loop*) com uma mutação. As demais se localizam em regiões adjacentes. Diferentemente do que encontramos, a região que mais costuma ter incidência de mutações é a PL e também a que se correlaciona com prognóstico mais desfavorável (BRANFORD et al., 2003; COSTA et al., 2018). Esta diferença pode ser explicada devido ao número de pacientes analisados em nosso estudo ser menor do que os destes autores. Nossos achados vão ao encontro dos demais que apontam que a mutação T315I além de ser a mais resistente é a mais comum (COSTA et al., 2018; NICOLINI et al., 2006; SOVERINI et al., 2007).

Em relação aos 53 pacientes que usaram ITQs de segunda linha de terapia, 56,6% alcançaram a RMM desde o início da troca e a mantiveram – coincidentemente esta proporção é muito semelhante à dos pacientes que usaram MI (55%). Em estudo realizado com pacientes atendidos na cidade de Santos (*MARTINO E FERREIRA, 2015*) a proporção de pacientes que atingiram a RMM (referente aos usuários de MI, dasatinibe e nilotinibe) foi de 27,03%, portanto inferior aos nossos achados. Segundo estudo de eficácia do dasatinibe, dos pacientes em uso deste ITQ após resistência/intolerância ao MI, 37% alcançaram a RMM em 2 anos, 44% em 5 anos e 46% em sete anos. No estudo START-R (*KANTARJIAN et al., 2009*) em que pacientes que falharam ao uso de MI e foram randomizados para receberem dasatinibe 70 mg duas vezes ao dia ou 800 mg de MI, os pacientes que receberam dasatinibe tiveram RMM de 29% *versus* 12% do MI após 2 anos. Embora não existam estudos da indústria farmacêutica que tenham comparado diretamente a eficácia do nilotinibe em relação ao alcance da RMM em pacientes resistentes ou intolerantes ao MI, um estudo de eficácia que avaliou as respostas citogenética mostrou que a taxa de alcance da RCC foi de 44% na fase crônica e 21% de RCC na fase acelerada. Conforme estudo de *Cliquet et al. (2016)* dos pacientes que passaram para a segunda linha de terapia com nilotinibe devido à resistência ao MI, 86% atingiram a RMM ou a RMC. Dos pacientes que trocaram de inibidor devido à toxicidade, 50% atingiram a RMM ou RMC. Ao fazermos a média destes pacientes que alcançaram a RMM temos 68%, já que não diferenciamos os pacientes que trocaram de ITQ por resistência ou intolerância. Assim, nossos resultados em relação ao nilotinibe (65,37%) mostraram-

se semelhantes. Ao analisarmos os estudos com o dasatinibe, nossos achados (58.81%) foram superiores. Nossos resultados foram o somatório das RMM e RMC referentes aos pacientes vivos e que já realizaram trocas de ITQs quando em falha ou intolerância. Assim, também temos uma alta porcentagem de pacientes que usam MI e que estão respondendo bem ao tratamento, ou seja, com RMM (91,06%).

Milojkovic et al (2012) afirmam que aproximadamente 52% dos pacientes irão descontinuar a segunda linha de terapia devido à resistência ou intolerância, o que é um número mais elevado do que encontramos (37,25%) até o momento. O transplante alogênico seria a escolha para estes pacientes, entretanto não é aconselhável para pacientes mais idosos (RADICH et al., 2016; HANFSTEIN et al., 2015). Devido a isso, a outra opção é usar outro ITQ que não havia sido usado antes (o que foi o caso dos nossos 14 pacientes que trocaram para outro ITQ de segunda geração). Pacientes que vão para a terceira linha de terapia devem ser monitorados com maior periodicidade, pois possuem mais chances de desenvolver uma mutação, o que aumenta o risco de resistência (HUGHES et al., 2009; CORTES et al., 2007).

A discordância encontrada entre os exames moleculares do paciente JIK e suas respostas hematológicas, citogenéticas e clínicas são indicativos de um *BCR-ABL1* anômalo que não pode ser totalmente detectado pelas técnicas quantitativas convencionais e que está sendo investigado com maior profundidade por sequenciamento. As sondas e *primers* são comumente desenhadas para se anelarem numa região muito conservada do gene a fim de detectar o maior número de pacientes possível, entretanto esta discordância pode ser justificada pelo uso de primer e sonda que não se anelaram nas regiões esperadas do oncogene *BCR-ABL1* possivelmente pela presença de mutações na região que impedem o anelamento dos *primers* ou sonda e sua consequente detecção (EDWARDS E SAUNDERS, 2004; NASCIMENTO et al.,2015).

Conclusão

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que as respostas moleculares dos pacientes com LMC atendidos no HUSM estão em acordo com a maioria dos achados da literatura. Estas constatações refletem o uso do monitoramento molecular bem como da detecção de mutação do gene *ABL* por parte dos médicos para avaliar e direcionar a conduta terapêutica a fim de detectar precocemente a perda de resposta (resistência ao tratamento) e evitar a progressão da doença com desfechos indesejados.

Referências

APPERLEY, J.F.; Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncol.** V8, 1018–29, 2007.

ARANHA, F.J.P. Leucemia Mielóide Crônica – Transplante de medula óssea. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v30(1), 41-46, 2008.

ALVES, R.C.; Análise de pacientes com leucemia mieloide crônica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v31,166-177, 2009.

AQUINO, S. S.; GONÇALVES, R. P.; SILVA, L.B. Acompanhamento fármaco terapêutico dos pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de mesilato de imatinibe na Universidade Federal do Ceará. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v31(3),137-142, 2009.

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

BACCARANI, M.; PANE, F.; SAGLIO, G.; Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. **Haematologica.** v93(2), 161-9, 2008.

BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood.** v122, 872-884, 2013.

BRANFORD, S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in

the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**. v.1;102(1), 276-83, 2003.

BRANFORD, S. et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia**. v20, 1925-30, 2006.

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

BURIN, M.M. et al. Impacto econômico da descontinuação do imatinibe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR – HEMO, 2015, São Paulo - SP. **Anais do evento**. Disponível em <https://www.abhheventos.com.br/hemo2015/wp-content/uploads/2015/11/suplemento-2015.pdf>. Acesso em 24/01/2019

CALZADA, A. A. et al. Frecuencia de transcritos bcr/abl p210 em 272 pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) em Bolívia. **Rev Med La Paz**. v22(1), 13-19, 2016.

CAMPOS, M. G. V. et al. Chronic myeloid leucemia: a disease of youth in Brazil. **Leuk Res**. v4(34), 542-544, 2010.

CLIQUE, M. G. et al. Perfil de pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com o nilotinibe - inibidor de tirosina-quinase de 2ª geração. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. v18, 2016.

CORTES J. et al. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. **Blood**. v110(12), 4005–11, 2007.

CORTES, J. et al. Efficacy and safety os bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leucemia patients with resistance or intolerance to imatinib. **Blood**. v112, 2008.

COSTA, H.Z. et al. Mutations in the breakpoint cluster region-Abelson murine leucemia 1 gene in Brazilian patients with chronic myeloid leucemia. **Hematol Transfus Cell Ther**. v40(4), 363-367, 2018

DEININGER, M.W., DRUKER B.J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. **Pharmacol Rev**. v55(3), 401-23, 2003.

DRUKER, B.J. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med.**v355, 2408-17, 2006

EDWARDS, K.L.J.; SAUNDERS, N. **Real-time PCR: an Essential Guide.** United Kingdom: Horizon Bioscience, 2004.

ETIENNE et al. Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. **J Clin Oncol.** v35(3), 298–305, 2017.

FADERL, S.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology/oncology Clinics of North America** v18(3), 657-70, 2004.

FUNKE, V. A. M. et al. Tratamento da leucemia mielóide crônica com imatinib mesilato no Brasil: estudo de 98 casos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.27(3),159-165, 2005.

FUNKE, V. A. M. Tratamento da leucemia mielóide crônica: visão prática com algoritmos. São Paulo: **Segmento Farma editores**, 2008.

HANFSTEIN, B.; MULLER, M.C.; HOCHHAUS, A. Response-related predictors of survival in CML. **Annals of Hematology.** v.94 (2), 227- 239, 2015.

Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM – EBSEH, 2018 – Disponível em <http://www.ebserh.gov.br/web/husm-ufsm>. Acesso em 28/12/2018

HUGHES, T. et al. Higher-dose imatinib (600 mg/day) with selective intensification in newly diagnosed CML patients in chronic phase; cytogenetic response rates at 12 months are superior to IRIS. **Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts). v104 (11), 1001, 2004.

HUGHES, T.P. et al. Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. **N Engl J Med.** v349, 1423-1432, 2003.

HUGHES, T.P. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. **Blood.** v108 (1), 28-37, 2006.

HUGHES T, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **J Clin Oncol.** v27(25), 4204–10, 2009.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring and management. **Am J Hematol.** v89(5), 547–56, 2014.

JORGENSEN, H.G.; HOLYOAKE, T.L. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. **Biochem Soc Trans.** v35 (5), 1347-51, 2007.

MACHADO, M.P.; PAGNANO, K.B.B. Monitoramento molecular de pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de imatinib através da técnica de PCR quantitativo em tempo real . **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** V32 (2), 2010.

MARTINO, C.C.; FERREIRA, E.C.P.M. Estudo do tratamento de pacientes com leucemia mielóide crônica que fazem uso de inibidor de tirosina quinase registrados no núcleo de hematologia e hemoterapia de santos. **UNILUS Ensino e Pesquisa.** v12 (26), 2015.

MILOJKOVIC D et al. Responses to second-line tyrosine kinase inhibitors are durable: na intention-to-treat analysis in chronic myeloid leukemia patients. **Blood.** v119(8), 1838–43, 2012.

MILLER, G. D.; BRUNO, B. J.; LIM, C. S. Resistant mutations in CML and Ph+ALL—role of ponatinib. **Biologics: Targets and Therapy.** v8, 243–254, 2014.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S.; Tecnologia de PCR e RTPCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM Revista Brasileira de Medicina.** v67, 7-19, 2015.

NICOLINI, F. E. et al. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML. **Leukemia.** v20,1061–1066, 2006.

RÊGO, M. F. N. **Leucemia mieloide crônica – aspectos clínicos e fatores que influenciaram a resposta citogenética em pacientes tratados com Imatinibe no estado do Piauí.** Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas. Campinas, BR-SP, 2014.

ROUSSELOT, P. et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. **Blood.** v109(1), 58–60, 2007.

OSÓRIO, M. J. M., et al. Leucemia mieloide crônica. Monitoreo y factores predictivos de una respuesta favorable em el tratamiento com imatinib. **Medicina (Buenos Aires).** v77, 161-166, 2017.

PAGNANO, K.B.B. BCR-ABL1 level monitoring in chronic myeloid leucemia by real time polymerase chain reaction in Brazil – not so real. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v39(3), 197-198, 2017.

RADICH, J.P. et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Chronic Myelogenous Leukemia, version 1.2016. **Natl. Compr. Cancer Netw. (NCCN).** 2016.

SANTOS, C.C. **Tratamento da leucemia mieloide crônica com mesilato de imatinibe no Hospital das Clínicas de Porto Alegre.** Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2007.

SHAH, N.P. Loss of response to imatinib: mechanisms and management. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**183-7, 2005.

SILVEIRA, P. A. C. **Resposta ao tratamento com mesilato de imatinibe nos portadores de leucemia mieloide crônica do Hospital de Base do Distrito Federal.** Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 111 p, 2011.

SOVERINI, S. et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leucemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. **Haematological.** v92(3), 401-4, 2007.

VARELA-BRICEÑO, C. et al. Situación actual de la leucemia mieloide crônica em Costa Rica. **Acta méd costarric.** v60(1) 21-26, 2018.

VIEIRA-MION, A.L. et al. Molecular response to imatinib mesylate of Brazilian patients with chronic myeloid leukemia. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 39(3), 210-215, 2017.

VIGIL, C.E. et al. Interpretation of cytogenetic and molecular results in patients treated for CML. **Blood.**; v25(3), 139-46, 2011.

VISANI, G. et al. Dasatinib, even at low doses, is an effective second-line therapy for chronic myeloid leukemia patients resistant or intolerant to imatinib. Results from a real life-based Italian multicenter retrospective study on 114 patients. **Am J Hematol.** v85(12), 960-3, 2010.

WANG, A.H.; WANG, Y,Y.; YAO, Y. Summary of 615 patients of chronic myeloid leucemia in Shangai from 2001 to 2006. **J Exp Clin Cancer Res.** v29, 20-26, 2010.

WIECZOREK, A.; UHAREK, L. Management of chronic myeloid leucemia patients resistant to tyrosine kinase inhibitors treatment. **Biomark insights.** V10(3), 49-54, 2015.

4 CONCLUSÃO

A idade média ao diagnóstico dos pacientes foi de 48,1 anos e a porcentagem de pacientes do sexo masculino foi de 58,11%, portanto, ambos os dados se assemelham aos encontrados pela literatura nacional. Ao levarmos em consideração as taxas de SLE e SG encontrados em 2, 5 e 10 anos observamos que a SLE em 10 anos foi de 46,2% e a SG para estes pacientes foi 88,9% consequente ao resgate obtido pela substituição das ITQs.

A RMM alcançada aos 12 meses com MI de 42,3% teve correspondência a alguns estudos. Dos pacientes que usaram ITQs de segunda linha de terapia, 56,6%, alcançaram a RMM desde o início da troca e a mantiveram, resultado este bem próximo ao observado nos pacientes que usaram MI (55%).

Em pacientes que desenvolveram resistência aos ITQs 40% de pacientes avaliados possuíam a presença de mutação no gene *ABL*, valor próximo ao observado por outros estudos.

Ao aplicarmos os critérios do estudo EURO-SKI, encontramos 5 (4,5%) pacientes que poderiam ser elegíveis para entrar num protocolo de estudo de Remissão Livre de Tratamento. Estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 2015 considerou 15% dos seus pacientes como candidatos para suspensão do MI. Neste estudo, o tempo de tratamento deveria ser igual ou superior a 36 meses e os pacientes deveriam atingir resposta molecular profunda sustentada por no mínimo dois anos comprovada por monitoramento regular (RT-PCR) (BURIN et al., 2015). Mesmo com critérios mais rigorosos do que os do EURO-SKI, nosso achado é inferior. Talvez um monitoramento mais sequencial acarretaria em um maior número de candidatos para o nosso estudo. Em nossa análise de prontuários tivemos um paciente que teve o MI suspenso aos 88 meses de tratamento por cardiotoxicidade e não recebeu mais nenhum tipo de tratamento. Ele se encontra atualmente em RHC e em RMM, com sobrevida global de 179 meses.

Atualmente o alto custo dos ITQs é financiado pelo SUS, enquanto que os exames de RQ-PCR ainda não o são. Apesar deste panorama, o monitoramento molecular dos pacientes tratados no HUSM através desta técnica se destaca entre as instituições públicas e privadas do cenário brasileiro pela proporção de pacientes que conseguem ser monitorados de forma mais próxima da estabelecida pelas diretrizes internacionais. Esta realidade pode ser constatada através das poucas publicações brasileiras existentes que retratam sobre este monitoramento.

Infelizmente os exames por RQ-PCR não são amplamente disponíveis para os pacientes com LMC no Brasil, onde a maioria é tratada pelo SUS. Apesar disso, o HUSM vem se destacando no cenário brasileiro com o monitoramento molecular que tem com seus pacientes para avaliar as respostas do uso de ITQs.

REFERÊNCIAS DISSERTAÇÃO

AGARWAL, M.B. Importance of early and deeper responses to long-term survival in CML patients: implications of BCR-ABL testing in management of CML in Indian setting. **Indian J Med Paediatr Oncol.** v.35(1), 10-6, 2014.

ALVES, R.C.; Análise de pacientes com leucemia mieloide crônica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v31, 166-177, 2009.

APPERLEY, J.F.; Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncol.** v8, 1018–29, 2007.

BACCARANI, M. et al. European Leukemianet: Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood.** v108, 1809-1820, 2006.

BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood.** v122, 872-884, 2013.

BARNETT M.J; EAVES C.J: Chronic Myelogenous Leukemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF: **Leukemia.** 7 ed. Cap 25 p 583-600. Saunders, Philadelphia, 2002.

BORTOLHEIRO, T.C.; CHIATTONE, C.S. Chronic myeloid leukemia: natural history and classification. **Rev Bras Hematol Hemoter.** V30(1), 3-7, 2008.

BRANFORD, S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood.** v.1;102(1), 276-83, 2003.

CAPRA, M.Z. Leucemia mieloide crônica. In:GUIMARÃES, J.L.; ROSA, D.D. Rotinas em oncologia. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 697-700.

CARVALHO, P.V.B. O transplante autólogo de medula óssea como terapêutica para pacientes com leucemia mieloide crônica. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v 25(2), 121-124, 2003.

CHUNG, C. Omacetaxine for treatment-resistant or treatment-intolerant adult chronic myeloid leukemia. **Am J Health Syst Pharm.** v71(4), 279-88, 2014.

CILLONI, D.; SAGLIO, G Molecular pathways: BCR-ABL. **Clin Cancer Res.** 18(4), 930-7, 2012.

CORTES, J. et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome–positive CML patients with resistance or intolerance to imatinib. **Blood.** v112, 2011

DEININGER, M.V. et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood.** v90(9), 3691-8, 1997.

DEININGER, M.W. et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in philadelphia chromosome-negative cells. **Cancer.** v110(7), 1509-19, 2007.

DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. **Nature Medicine.** V2, 561–566, 1996.

ETIENNE, G. et al. Long-Term Followup of the French 1 Stop Imatinib Study (STIM1) in Chronic Myeloid Leukemia Patients. **ASH Annual Meeting Abstracts.** Abstract No. 345. 26, 2015.

FADERL, M. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine,** v341(2), 164-172, 1999.

FUNKE, V. A. M. Tratamento da leucemia mieloide crônica: visão prática com

algoritmos. São Paulo: **Segmento Farma editores**, 2008.

FUNKE, V. A. M.; PASQUINI, R. Leucemia Mieloide Crônica. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.

GADZICKI, D. et al. BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. **Cancer Genet Cytogenet**. v159,164-7, 2005.

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. **The New England Journal of Medicine**, v349(15), 1451-1464, 2003.

HEYSSEL, R. et al. Leukemia in Hiroshima Atomic Bomb Survivors. **Blood**. v15, 313-331, 1960.

HOCHHAUS, A.; LA ROSÉE, P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. **Leukemia**. v18(8), 1321-31, 2004.

HUGHES, T. et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **J Clin Oncol**. v27(25), 4204–4210, 2009.

INCA, Estimativa 2018 – Incidência de cancer no Brasil, 2018 – Disponível em <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>
Acesso em 27/11/2018

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring and management. **Am J Hematol**. v89(5), 547–56, 2014.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Am J Hematol**. v91(2), 252-65, 2016.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H.; Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Am J Hematol**. 93, 442–459, 2017.

JORGENSEN, H.G.; HOLYOAKE, T.L. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. **Biochem Soc Trans**. v35(5), 1347-51, 2007.

KANTARJIAN, H.M. et al. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**. 82(3), 691-703, 1993.

KANTARJIAN, H.M. et al. Five-year results of the ponatinib phase II PACE trial in heavily pretreated CP-CML patients. **Am Soc Clin Oncol.** 2017

KANTARJIAN, H.M. et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. **Blood.** v123(9), 1309–1318, 2014.

LANEUVILLE, P. When to Stop Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. **Current Treatment Options in Oncology.** v19, 2018

LUCAS, C.M. et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica.** v. 94(10), 1362-7, 2009.

MALAGOLA, M. et al. Long-term outcome of Ph+ CML patients achieving complete cytogenetic remission with interferon based therapy moving from interferon to imatinib era. **Am J Hematol.** 89(2), 119-24, 2014.

MELO, J.V. et al. The abl-bcr fusion gene is expressed in chronic myelocytic leukaemia. **Blood.**; v81(1),158-65, 1993.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. **Circulation.** v125 (17), 2128-2137, 2012.

MOREIRA, R.B.; BOECHAT, L. Proposta de Acompanhamento Farmacoterapeutico em Leucemia Mieloide Crônica:Modelo de Abordagem Metodológica. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v55(4), 375-378, 2009.

MULLER, M.C. et al. Dasatinib treatment of chronic- € phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. **Blood.** v114(24), 4944–4953, 2009.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science,** v142, 1497, 1960.

O'HARE, T. et al. AP24534, a pan-BCRABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. **Cancer Cell.** v16, 401–412, 2009.

PAGNANO, K.B.B.; Leucemia Mielóide Crônica – Causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v30(1), 22-26, 2008.

RABINOWITZ, I.; LARSON, R.S.: Chronic Myeloid Leukemia. In: Greer JP, Foester J, Lukens JN et al: Wintrobe's Clinical Hematology. 11 ed. Lippincot Williams E Wilkins. Philadelphia, 2004. P2235-58.

RANDOLPH, T.R. Chronic myelocytic leukemia--Part II: Approaches to and molecular monitoring of therapy. **Clin Lab Sci. Winter.** v18(1), 49-56, 2005.

REDDY, E.P.; AGGARWAL, A.K.; The ins and outs of BCR-ABL inhibition. **Genes Cancer.** v3(5-6), 447-54, 2012.

ROSS, D.M. et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. **Leukemia** v24,1719–1724, 2010.

ROSS, D.M. et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. **Blood.** v122, 515–522, 2013.

ROWLEY, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v.243(5405), 290-3, 1973.

SAUSSELE, S. et al. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. **Leukemia.** v30, 1638–1647, 2016.

SAWYERS, C. L. Chronic Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine.** v340,1330-1340, 1999.

SHAH, N.P. Loss of response to imatinib: mechanisms and management. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** 183-7, 2005.

TEFFER, A. The Philadelphia Chromosome Negative Chronic Myeloproliferative Disorders: A Practical Overview. **Mayo Clin Proc.** v73, 1177-84, 1998.

VARDIMAN, J.W. et al: Chonic Myelogenous Leukemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC press.** Lion, pg 20-26, 2001.

- VIGERI, P.; WANG, J.Y. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. **Nat Med.** v7(2), 228-34, 2001.
- VIGIL, C.E. et al. Interpretation of cytogenetic and molecular results in patients treated for CML. **Blood.** v25(3), 139-46, 2011.
- WEI, G.; RAFYATH, S.; LIU, D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib or imatinib. **J Hematol Oncol.** v3, 47, 2010.