

Cristina Benitez Vendrame Coloni

Alterações Cromossômicas e Frequência do Rearranjo
Gênico BCR/ABL ao Diagnóstico, Tratamento com Mesilato
de Imatinibe e Após Transplante de Medula Óssea em
Leucemia Mielóide Crônica



1910001417



Cristina Benitez Vendrame Goloni

**Alterações Cromossômicas e Frequência do Rearranjo
Gênico *BCR/ABL* ao Diagnóstico, Tratamento com Mesilato
de Imatinibe e Após Transplante de Medula Óssea em
Leucemia Mielóide Crônica**



T. 1417/05

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, SP, para a obtenção do título de Doutor em Genética.

São José do Rio Preto

2005



575:616.155.392

V453a

07/10/2005

Doação

R\$ 30,00

Autor(a)

Vendrame-Goloni, Cristina Benitez

Alterações cromossômicas e frequência do rearranjo gênico *BCR/ABL* ao diagnóstico, tratamento com mesilato de imatinibe e após transplante de medula óssea em leucemia mielóide crônica / Cristina Benitez
Vendrame Goloni. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

146 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Agnes Cristina Fett Conte

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Leucemia mielóide crônica. 2. Citogenética. 3. FISH - Técnica 4. Imatinibe. 5. TMO. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU : 575:616.155.392

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/UNFAMERP), com auxílio financeiro do CNPq (Bolsa de Doctorado) e da BAP-FAMERP (Bolsa de auxílio à pesquisa).

É foi descrito na forma de Artigo Científico, de acordo com as recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, SP.

Orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte

Departamento de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina de São José do Rio

Preto - FAMERP



Cristina Genes Verdame Colantoni

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), com auxílio financeiro do CNPq (bolsa de Doutorado) e da BAP-FAMERP (bolsa de auxílio à pesquisa).

COMISSÃO JULGADORA

E foi descrito na forma de Artigos Científicos, de acordo com as recomendações do Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, SP.

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São José do Rio Preto, ____ de ____ de ____

Cristina Benitez Vendrame Goloni

**Alterações Cromossômicas e Frequência do Rearranjo Gênico *BCR/ABL*
ao Diagnóstico, Tratamento com Mesilato de Imatinibe e Após
Transplante de Medula Óssea em Leucemia Mielóide Crônica**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

5° Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.

*“Os momentos mais esplêndidos da vida não são os chamados dias de êxito,
mas aqueles em que, saindo do desânimo e do desespero,
sentimos erguer-se dentro de nós um desafio:
a vida e a promessa de futuras realizações.”*

Agradecimentos...

A Profa. Dra. Agnes Cristina Fari Costa, minha orientadora, por sua dedicada transmissão de conhecimentos, pelas críticas pontualmente dirigidas, pelo incentivo e suporte, pela credibilidade no meu trabalho e tempo compartilhado na construção deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Dra. Andréia Bordinchi Catraldo Sollen, pela colaboração, amizade e ajuda no decorrer deste período.

Dedico...

Esses médicos do Serviço de Hematologia do Hospital de Deus, Dr. Osvaldo Rassi Jr., Dr. Carlos Eduardo Magalhães e Dr. Paulo Zales; da Unidade de Transplante de Medula Óssea, Dr. Milton Rube e Dra. Eliana Frazon Rassi e do Serviço de Hematologia da Fundação de Hematologia do Rio de Janeiro, Dr. Eduardo Petron, Dr. Gilberto Colla e enfermeira Karen Patrícia Jobani, pela colaboração no ensino dos assuntos.

Aos pacientes que na esperança de vida, fizeram parte da minha vida, e que me deram parte do material e permitiram participar da pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho.

A Louise, meu maior presente, que será sempre o incentivo de minha vida...

As Biólogas Paula Maria Antônia Duarte Scarpone, Valéria Cristina Ferraz de Silva e Adriana Barbara de Oliveira, a técnica Brasileira de Eutecnia Muler, pela amizade, apoio e por me permitirem fazer um trabalho agradável e profissional.

Aos meus pais, exemplo de vida a ser seguido...

A Coordenadora do Curso de Pós Graduação Profa. Dra. Maria Tereza Vilela de Almeida Oliveira, pela amizade e atenção.

Aos meus irmãos, por me compreenderem e estarem sempre ao meu lado...

Aos funcionários do Pós Graduação, e à secretária do Departamento de Pós-graduação, pela atenção que sempre me prestaram.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cardozo, pelo incentivo.

Ao inglês David Andrew Horvitz, pela tradução dos artigos.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A meus familiares e todos que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho.

A Deus, pela sua presença em minha vida e por me ensinar que "para quem nele está, tudo é possível".

Agradecimentos...

A Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, minha orientadora, por sua dedicada transmissão de conhecimentos, pelas críticas positivamente dirigidas, pela amizade e sobretudo pela credibilidade em mim depositada e tempo compartilhado na correção deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Dra. Andréa Borduchi Carvalho Salles, pela colaboração, amizade e ajuda no decorrer deste período.

Aos médicos do Serviço de Hematologia do Hospital de Base, Dr. Octávio Ricci Jr., Dr. Carlos Eduardo Miguel e Dr. Paulo Zola; da Unidade de Transplante de Medula Óssea, Dr. Milton Ruiz e Dra. Lillian Piron Ruiz e do Serviço de Hematologia da Fundação Pio XII de Barretos, Dr. Eduardo Paton, Dr. Gilberto Colli e enfermeira Karen Bárbara Juliani, pela colaboração no envio das amostras.

Aos pacientes, que na esperança de vida, foram submetidos a este árduo exame, me cederam parte do material e consentiram participar da pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho.

As Biólogas Paula Maria Abdala Buassi Scarpassa, Valéria Cristina Ferrarese da Silva e Adriana Barbosa de Oliveira, à técnica Brasilina de Fátima Mafei, pela amizade, ajuda e por eu poder desfrutar de um ambiente agradável e profissional.

A Coordenadora do Curso de Pós Graduação Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pela seriedade e atenção.

Aos funcionários da Pós Graduação, e à secretária do Departamento de Biologia, pela atenção que sempre me prestaram.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, pela análise estatística.

Ao inglês David Andrew Hewitt, pela tradução dos artigos.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A meus familiares e todos que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho.

A Deus, pela forte presença em minha vida e por me mostrar que "para quem nele crê, tudo é possível".

SUMÁRIO

Capítulo I

<i>Leucemia Mielóide Crônica: da Biologia à Terapêutica</i>	<i>12</i>
---	-----------

Capítulo II

<i>Objetivos</i>	<i>49.</i>
<i>Material.....</i>	<i>50</i>
<i>Métodos</i>	<i>54</i>
<i>Considerações Éticas</i>	<i>60</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>61</i>

Capítulo III

<i>Análise do Rearranjo BCR/ABL por Bandamento GTG e FISH: Comparação das Frequências ao Diagnóstico da LMC</i>	<i>65</i>
---	-----------

Capítulo IV

<i>Frequency of Genic Rearrangement BCR/ABL Detected by FISH, Long Term Survival and Mortality Rate in CML After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>	<i>81</i>
---	-----------

Capítulo V

<i>Frequency of the BCR/ABL Rearrangements and Associated Alterations Detected by FISH During Monitoring of Patients Taking Imatinib Mesylate in Isolation</i>	<i>96</i>
--	-----------

Capítulo VI

<i>Exposição Ocupacional a Agentes Carcinogênicos de Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica</i>	<i>111</i>
--	------------

Capítulo VII

<i>Discussão</i>	<i>117</i>
------------------------	------------

Capítulo VIII

Conclusões.....128

Capítulo IX

Resumo.....131

Abstract.....133

Anexos

Anexo I.....136

Anexo II.....138

Anexo III.....142

Anexo IV.....143.

Artigo de revisão

Leucemia Mielóide Crônica: da Biologia à Terapêutica

Cristina Borges Gonçalves-Cabral¹, Cristina Bordini-Lacerda², Jussara Oliveira³ - *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*

Capítulo I

1. Dept. de Biologia, IBILCE/UNESP

2. Hemocentro, FUNPARME

3. Dept. de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil

Desenvolver: leucemia mieloide crônica, crônicas, PL, revisão BORDINI

Apoio Financeiro: BAP/FAMERP e CNPq

Revisão bibliográfica para submissão a Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Endereço para correspondência: Cristina Bordini-Lacerda, Hemocentro, Rua da Liberdade, 100, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Ce Genética, Av. Brigadeiro Faria Lima, 3544 - Paulo University - CEP 13090-000

Fone: (017) 3201-5000 R. 1431 - E-mail: cristina.bordini@ig.com.br

Artigo de revisão

Leucemia Mielóide Crônica: da Biologia à Terapêutica

Cristina Benitez Vendrame-Goloni¹, Octávio Ricci-Júnior², Agnes Cristina Fett-Conte³

1. Dept. de Biologia, IBILCE-UNESP
2. Hemocentro, FUNFARME
3. Dept. de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

Descritores: leucemia mielóide crônica, cromossomo Ph, rearranjo *BCR/ABL*

Apoio Financeiro: BAP/FAMERP e CNPq

Endereço para correspondência: Cristina B. Vendrame-Goloni, Hemocentro-Laboratório de Genética. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 – Bairro Universitário – CEP 15090-000 – Fone (017) 3201-5000 R. 1931 - E-mail: cristina.benitez@ig.com.br

Introdução

A medula óssea contém células progenitoras (células tronco ou "stem cells") que são pluripotentes e possuem duas propriedades funcionais: de gerar novas células progenitoras (auto-renovação) e de diferenciar-se em qualquer uma das linhagens celulares do sangue (diferenciação - hematopoese) (ATTAR & SCADDEN, 2004).

Com o início da diferenciação, a "stem cells" perde seu potencial pluripotente e direciona-se para a produção de uma ou mais linhagens celulares específicas, perde também sua capacidade de auto-renovação e torna-se uma célula diferenciada (Figura 1) (HEIKE & NAKAHATA, 2004).

As células estromais da medula óssea fornecem um micro-ambiente para as células progenitoras hematopoéticas as quais, mesmo em adultos, parecem poder se diferenciar em vários outros tecidos, incluindo fígado, pâncreas, rim, pulmão, pele, trato gastrointestinal, cardíaco, muscular esquelético e neural, o que tem estimulado vários estudos sobre seu uso em terapia celular (HEIKE & NAKAHATA, 2004).

Como em qualquer outro tecido do organismo, as células da medula óssea, por fatores etiológicos diversos, podem sofrer uma transformação maligna e originar uma leucemia. As leucemias são neoplasias malignas das células primordiais hematopoéticas, que se originam na medula óssea e se espalham no sangue periférico, podendo atingir diferentes tecidos e órgãos (ROBBINS *et al.*, 1996).

Basicamente, estas malignidades são classificadas de acordo com o tipo de célula envolvida e com o estado de maturidade das células leucêmicas, respectivamente em mielóides (mielocíticas; granulocíticas; não-linfocíticas) e linfóides (linfocíticas), e em agudas e crônicas (GOASGUEN *et al.*, 1997).

As leucemias agudas se caracterizam pela presença de células imaturas (blastos) e por uma evolução rápida e fatal nos pacientes não tratados. As crônicas estão associadas, no início, a leucócitos bem diferenciados (maduros) e a uma evolução relativamente mais lenta (ROBBINS *et al.*, 1996).

Considerações Gerais sobre a Leucemia Mielóide Crônica (LMC)

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal que surge da transformação neoplásica das células progenitoras pluripotentes, resultando em uma granulocitose (elevado número de células da série granulocítica no sangue periférico) progressiva (MOREL *et al.*, 2003; PETZER & GUNSILIUS, 2003). Corresponde a 15-20% das leucemias nos adultos e é diagnosticada em um ou dois indivíduos por 100.000/ano. No Brasil, estima-se cerca de 2.700 a 3.500 casos novos por ano. Há um ligeiro predomínio do sexo masculino (1,3-1,4:1) e a maior incidência ocorre na quarta década de vida, entretanto, pode ocorrer também em crianças e idosos (FADERL *et al.*, 1999).

Em alguns pacientes a LMC se inicia com uma fase crônica agressiva, enquanto em outros se comporta como uma doença indolente, com cerca de 50% dos pacientes assintomáticos. Alguns, ainda, apresentam sintomas e sinais não específicos da doença. Geralmente, o diagnóstico é sugerido em função dos resultados de um hemograma solicitado de rotina, ou durante uma avaliação médica para uma doença não relacionada. A fadiga é a manifestação mais comum, seguida de cefaléia, perda de peso, desconforto abdominal, mal estar, esplenomegalia e leucocitose (ANTIN, 2003).

O curso natural da doença é caracterizado por três fases sequenciais: crônica, acelerada e blástica. Na maioria das vezes o diagnóstico é feito durante a fase

inicial ou crônica, em que a população granulocítica se expande, mas permanece capaz de se diferenciar. Esta fase é relativamente estável e responde à terapia convencional mas, eventualmente, evolui para uma fase intermediária, a fase acelerada, que necessita de uma intervenção terapêutica mais agressiva para o controle da doença. A fase blástica é grave e se assemelha a uma leucemia aguda, onde quase a totalidade das células encontradas são blastos. Este fenótipo é mieloblástico em 70-80% dos pacientes e linfoblástico em 20-30%. Com o tratamento convencional a média de sobrevida global entre os pacientes é cerca de cinco anos, mas a variação é muito ampla (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

A LMC é uma doença muito estudada, um protótipo de câncer desencadeado por uma alteração cromossômica específica, a t(9:22) que origina o cromossomo Philadelphia (Ph). Contudo, inúmeros fenômenos biológicos envolvidos na sua etiopatogênese ainda permanecem desconhecidos (HOCHHAUS *et al.*, 2004).

Alterações Cromossômicas e Gênicas na LMC

A LMC foi descrita em 1845, independentemente, pelos patologistas BENNET, CRAIGIE e VIRCHOW. Somente em 1960 ela foi associada ao cromossomo Philadelphia (Ph), considerado um marcador da doença e a primeira alteração genética especificamente relacionada a um tipo de câncer (WONG & WITTE, 2004).

No início, na Philadelphia, o cromossomo Ph foi descrito como um pequeno cromossomo presente nas células da medula óssea de pacientes com leucemia granulocítica resultado de uma deleção parcial do braço longo de um autossomo do grupo G (NOWELL & HUNGERFORD, 1960). Posteriormente, em 1973, com o desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico, ROWLEY o descreveu

como resultante de uma translocação recíproca envolvendo os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)], cujos pontos de quebra estão agora definidos em 9q34.1 e 22q11.21 (KEUNGGM *et al.*, 2004).

O Ph é detectado em 90 - 95% dos pacientes com LMC, em 17-25% dos adultos e em 5% das crianças com Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e também em casos raros (0,9-3%) de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (TBAKHI, 2002; KEUNGGM, 2004).

Cinco a 10% dos casos de LMC apresentam translocações variantes, com três ou eventualmente, mais de três cromossomos envolvidos (MARKOVIC *et al.*, 2000; DE BRAEKELEER, 1987; ACAR *et al.*, 1997; HARRISON *et al.*, 2000; REID *et al.*, 2001). Em alguns casos um rearranjo críptico, denominado cromossomo Ph mascarado, está presente em um cariótipo interpretado como normal por citogenética convencional (VAN DER PLAS *et al.*, 1991).

Alterações cromossômicas secundárias também são encontradas e estas são consideradas como marco da evolução da doença. As mais freqüentes incluem a trissomia do cromossomo 8, o isocromossomo i(17q), a trissomia do 19 e um cromossomo Ph extra. Porém, alguns pacientes apresentam anomalias cromossômicas secundárias diferentes (ESPINOZA *et al.*, 2004).

Variações regionais na freqüência de anomalias específicas em neoplasias têm sido descritas (JOHANSSON *et al.*, 1991; MITELMAN & LEVAN, 1981; BERNSTEIN *et al.*, 1982; MITELMAN 1986). Possíveis causas para explicar tais variações incluem artefatos técnicos, diferenças nas classificações clínico-patológicas e fatores genético-ambientais, incluindo a terapia, o tipo de anomalia primária e o estágio de diferenciação (ESPINOZA *et al.*, 2004).

Enquanto os aspectos citogenéticos e moleculares são bem caracterizados, a origem parental dos cromossomos rearranjados é controversa. Alguns autores demonstraram que o cromossomo 9 envolvido na translocação é preferencialmente de origem paterna e o cromossomo 22 de origem materna (HAAS *et al.*, 1992; OLÍCIO *et al.*, 2004), o que levou a hipótese de *imprinting* dos genes *BCR* e *ABL*. Estes resultados já haviam sido contestados por outros autores em função de achados contrários obtidos (RANDHAWA *et al.*, 1998; MASERATI *et al.*, 1998).

Os fatores que predisõem à doença, ou à translocação, são pouco conhecidos e entre agentes ambientais já relacionados ao seu aparecimento estão a radiação e o benzeno. A estratégia preventiva, portanto, consiste em evitar a exposição a estes agentes (GOLDMAN & MELO, 2001; HIRABAYASHI *et al.*, 2004).

A t(9;22) envolve o proto-oncogene *ABL* (Abelson), mapeado em 9q34, e uma pequena região do cromossomo 22, designada região de ponto de quebra ou gene *BCR*. Esta alteração resulta na formação de novos genes quiméricos: o gene 5'*ABL*-3'*BCR* no derivado do cromossomo 9 e o 5'*BCR*-3'*ABL* (*BCR-ABL*) no derivado do 22 (MOREL *et al.*, 2003).

As funções das proteínas expressas pelos genes quiméricos em condições normais não são bem conhecidas, no entanto, uma função atribuída àquela codificada pelo *BCR* é a de atuar como tirosina quinase em neutrófilos. As quinases transferem fosfatos da adenosina trifosfato (ATP) para os aminoácidos de proteínas. A fosforilação dessas proteínas leva à ativação de vias de transdução de sinais, levando ao crescimento celular e, portanto, ao potencial maligno (WADLEIGH *et al.*, 2005).

A proteína expressa pelo gene *ABL* normal age no núcleo e no citoplasma e parece ter várias funções importantes, como atuar no reparo do DNA, como supressora

de tumor e na inibição do ciclo celular entre G1 e S (BRAIN *et al.*, 2002; GOLDMAN & MELO, 2003).

A oncoproteína BCR/ABL constantemente está ativa e fosforila substratos de proteínas em várias vias de sinalização, como por exemplo, a do gene *RAS*, que atua como controle crítico para a resposta da transdução de sinal da membrana celular para o núcleo. A superexpressão de *BCR/ABL* parece alterar a transdução de sinal na célula progenitora (stem cell) alvo, levando a mitoses anormais e à expansão neoplásica. Também, a proteína BCR/ABL diminui a adesão celular na matriz estromal, que pode romper a interação entre células hematopoéticas, células estromais e sinais de membrana, que são mediados pela citoadesão de moléculas, permitindo que células progenitoras mielóides permaneçam mais tempo na fase proliferativa antes da diferenciação. Além disso, BCR/ABL também diminui a sensibilidade celular para o estímulo apoptótico, fornecendo uma vantagem proliferativa para o clone leucêmico (SAVAGE & ANTMAN, 2002; SATTLER & GRIFFIN, 2003).

Várias vias são ativadas pelas proteínas BCR/ABL, RAS, MAPK, JNK/SAPK, phosphatidylinositol-3 kinase, NF-KB e STAT. Estudos *in vitro* com inibidores e mutantes dominantes negativos têm sugerido que várias destas vias contribuem para transformação maligna de fibroblastos ou de células hematopoéticas (VAN ETEN, 2002).

Cerca de 5% dos casos de pacientes com LMC têm evidência apenas molecular do rearranjo gênico *BCR/ABL* quando o cromossomo Ph não é detectado por citogenética convencional (KEUNGGM *et al.*, 2004). Segundo alguns autores, casos de LMC negativos para o cromossomo Ph e para o rearranjo gênico *BCR/ABL* são raros, parecem ter mau prognóstico e evoluem rapidamente para crise blástica (KURZROCK *et al.*, 2001).

Porém, outros consideram que estes pacientes sem o rearranjo teriam outra doença, mesmo com características hematológicas da LMC (KARTARJIAN *et al.*, 1998).

O gene *ABL* também pode ser ativado por outras translocações, sem envolvimento do gene *BCR*. Por exemplo, a t(9;12) origina a proteína quimérica tirosina quinase TEL/*ABL*. Tal proteína, já descrita em LMA e LMC atípica, ativa várias vias de sinalização para transformar células hematopoéticas e, assim como *BCR/ABL*, conferir resistência a drogas antineoplásicas que atuam danificando o DNA. Este fenômeno pode ser explicado pela indução do retardo do ciclo celular na fase G2/M, elevação da proteína anti-apoptótica Bcl-xL e alterações do reparo do DNA. O aumento da eficiência do reparo do DNA pode reduzir significativamente a sensibilidade das células ao tratamento, o que é considerado um dos maiores obstáculos da terapia anti-câncer (MAJSTEREK *et al.*, 2004).

Também têm sido descritas alterações sem o envolvimento do gene *ABL*, como por exemplo a t(5;12)(q33;p13) e a t(8;13)(p11;q12), ambas gerando genes de fusão (quiméricos) que parecem causar LMC por vias de sinalização correspondentes às vias ativadas pela oncoproteína *BCR/ABL* (GOLDMAN & MELO, 2003).

A progressão da doença, provavelmente, também envolve a ocorrência de mudanças moleculares adicionais ao clone *BCR/ABL* (GOLDMAN & MELO, 2001).

Os mecanismos de progressão da fase crônica para a fase final aguda (fase fatal ou crise blástica) são pouco conhecidos. O fenótipo pleiotrópico e agressivo da crise blástica sugere que diferentes anomalias oncogênicas podem estar envolvidas. Vários eventos têm sido associados com a crise blástica: perda de função do *P53*, amplificação do *MYC*, rearranjo/deleção do supressor *Rb* e, ainda, rearranjo/deleção de *p16INK4A*

(*CDKN2*). A perda de função do *P53* tem sido exclusivamente associada com a crise blástica mielóide e não linfóide, o que sugere que a sinalização *P53* é crítica para regulação da mielopoese normal (WONG & WITTE, 2004).

Embora os mecanismos para a transformação blástica não sejam conhecidos, algumas possibilidades têm sido consideradas. Por exemplo, BCR/ABL promoveria instabilidade genômica no clone leucêmico, que poderia levar a mutações secundárias, como por exemplo, a trissomia do cromossomo 8. Pode ser que as células na fase blástica sejam mais dependentes destas aberrações oncogênicas secundárias do que da atividade tirosina quinase de BCR/ABL. Como o clone leucêmico torna-se incapaz de se diferenciar, as células blásticas se acumulariam levando, inexoravelmente, à crise blástica (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

Células poliplóides podem se desenvolver à partir de progenitores diplóides via sucessivos ciclos de síntese de DNA sem divisão celular, um processo denominado endomitose. Algumas proteínas quinases como MAPK, CDK2 e CDC6, ou inibidores universais CDJ estão envolvidos na origem de endomitoses. Não existem evidências diretas de que a proteína BCR/ABL afeta tal processo, contudo, tem sido sugerido que ela pode ativar RAS e MAPK e assim promover endomitoses pela via MAPK. A poliploidização também poderia ser determinada por fatores étnicos, ambientais e relacionados à terapia. Células poliplóides são extremamente resistentes a condições que induzem danos no DNA, uma peculiaridade que poderia ser relacionada a muitas cópias de cada gene, com um conseqüente aumento do metabolismo celular. Assim, a poliploidização pode conferir um fenótipo mais agressivo às células tumorais, facilitando a resistência a drogas e promovendo a evolução do tumor (ESPINOZA *et al.*, 2004).

A heterogeneidade clínica da LMC não está esclarecida. Com a terapia padrão a média de sobrevida é de cerca de cinco anos, mas alguns pacientes vivem apenas por cerca de dois anos ou um pouco mais. Como já citado, em alguns a doença se inicia com uma fase crônica agressiva, enquanto em outros ela é indolente. Que fatores conferem esta heterogeneidade? Aparentemente a resposta não envolve a oncoproteína BCR/ABL, que parece consistente em quase todos os pacientes. BCR/ABL deve ativar uma ou mais vias da transdução de sinal que leva ao fenótipo maligno, mas nenhuma via tem sido especificamente identificada (GOLDMAN & MELO, 2001).

A maioria dos estudos em LMC enfoca a t(9;22) com relação aos genes *BCR/ABL* no cromossomo 22 e seus produtos. Contudo, como consequência da recombinação recíproca, um outro gene *ABL/BCR* também é formado em 9q (ALMEIDA *et al.*, 1999; THIJSSEN *et al.*, 1999). A coexpressão deste gene poderia levar a uma função biológica e/ou clínica heterogênea na LMC. Inclusive, observações mais recentes têm mostrado que cerca de 20% dos pacientes com LMC têm deleções de tamanho variável no derivado do cromossomo 9, onde se localiza a fusão gênica *ABL/BCR*, cuja proteína é expressa em cerca de 70% dos casos. Tal proteína, não tem função esclarecida. Os pacientes que apresentam tais deleções têm sobrevida mais curta em relação àqueles que não apresentam. Estas deleções possivelmente ocorrem ao mesmo tempo que a formação do cromossomo Ph. A identificação destas alterações seria um importante fator preditivo da sobrevida de cada paciente (GOLDMAN & MELO, 2003).

Portanto, embora no nível citogenético todos os cromossomos Ph pareçam iguais, eles podem estar associados a diferentes fenótipos da leucemia, fato que pode ser atribuído à variabilidade do rearranjo molecular entre os genes *BCR* e *ABL* (COLLEONI *et al.*, 1998).

A Figura 2 apresenta o gene *ABL*, localizado no cromossomo 9 e o gene *BCR* localizado no cromossomo 22, envolvidos na formação do cromossomo Ph.

O gene *ABL*, localizado no cromossomo 9, é composto de 11 exons. É expresso em níveis altos no baço, timo e testículo. O ponto de quebra na translocação com o 22 ocorre freqüentemente no sentido 5' do exon 2 (no 1º ou 2º íntron) e esporadicamente no exon 3 (THIJSEN *et al.*, 1999; LICHTY & KAMEL-REID, 2000).

O gene *BCR*, localizado no cromossomo 22, compreende 23 exons. A expressão do gene dá origem a dois tipos de RNAm, de 4,5 e de 6,7 Kb, que são traduzidos em uma fosfoproteína, com atividade serina treonina quinase (MARU & WITTE, 1991). Li *et al.* (1989), mostraram que em células humanas várias proteínas BCR diferentes podem ser identificadas, com tamanhos que variam de 83 a 190 kD. São encontradas no citoplasma de células em intérfase e detectadas ao redor dos cromossomos durante a divisão, o que sugere uma função na regulação do ciclo celular.

O ponto de quebra no gene *BCR* envolvido na translocação difere em suas posições, dando origem a transcritos híbridos com diferentes tipos de junção *BCR/ABL* (Figura 3). Na LMC, o ponto de quebra no cromossomo 22 ocorre na região central do gene *BCR* denominada M-BCR ("Major breakpoint cluster region"), que se estende do exon 12 (b1) ao 16 (b5) e dois tipos diferentes de junção *BCR/ABL* podem ocorrer. No primeiro, o exon 13 do *BCR* se justapõe ao exon 2 do *ABL* (junção e13a2 anteriormente conhecida como b2a2). No segundo, o exon 14 do *BCR* se justapõe ao exon 2 do *ABL* (junção e14a2 ou b3a2). Os dois RNAm quiméricos (e13a2 e e14a2), traduzem para uma proteína de 210 kD (p210) e muitos estudos não encontram evidências que o tipo de junção tenha algum significado prognóstico (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998; IMPARATO *et al.*, 1998; THIJSEN *et al.*, 1999; GOLDMAN & MELO, 2003).

Em casos raros de LMC ou LMA, em quase 50% dos casos de LLA com Ph em adultos e em 80% das crianças com LLA e Ph, o ponto de quebra ocorre dentro do primeiro grande intron do exon 2 do *BCR*, denominado m-BCR (“minor breakpoint cluster region”), dando origem a uma junção (e1a2), que resulta na produção de uma proteína de 190 kD (p190). Ambas proteínas, p210 e p190, têm atividade tirosina fosfoquinase aumentada comparadas à proteína ABL normal (p145). Estudos *in vitro* mostraram que p190 é mais ativa que p210 e está associada a uma leucemia mais agressiva (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC, *et al.*, 1998; MEISSNER *et al.*, 1999; THIJSSEN *et al.*, 1999; GOLDMAN & MELO, 2003; WONG & WITTE, 2004). Suas funções na transformação leucêmica ainda não são bem entendidas, mas parecem envolver em múltiplas vias de sinalização, incluindo ativação do mediador *RAS* do *JUN*, ativação do *STAT5*, alterações do oncogene *MYC* e expressão de ciclina D1 (RUBNITZ & LOOK, 1998).

De acordo com IMPARATO *et al.* (1998), a atividade de tirosina quinase da proteína híbrida BCR/ABL, é similar a da proteína codificada pelo gene *ABL*, porém mais ativa e com localização citoplasmática, predominantemente no citoesqueleto (GRIFFIN, 2001; GOLDMAN & MELO, 2003). Por causa dessa atividade específica e nova localização na célula, BCR/ABL tem acesso a substratos citoplasmáticos que ABL não tem e os fosforilam de maneira desordenada (IMPARATO *et al.* 1998).

No nível transcricional, o RNAm híbrido *BCR/ABL* de 8,5 Kb apresenta seqüência 5' para o *BCR* e 3' para *ABL*. Na forma e13a2, a proteína contém 902 aminoácidos, codificados pelo gene *BCR* e em e14a2, 927 aminoácidos, que estão fusionados com os 1096 aminoácidos codificados pelo gene *ABL*. Ocasionalmente,

ambos os transcritos são detectáveis no mesmo paciente por causa do *splicing* alternativo (THIJSEN *et al.*, 1999; WONG & WITTE, 2004).

Também já foi identificada uma região mais rara de ponto de quebra, denominada μ -bcr (Figura 2), localizada distalmente no sentido 3' da região M-BCR, entre os exons e19 e e20 (c3 e c4), que dá origem a uma junção e19a2 e a uma proteína de fusão p230 (230kD). Essa proteína foi identificada em pacientes com uma forma branda de LMC, designada leucemia neutrofílica crônica Ph positiva (LNC) (WONG & WITTE, 2004).

A presença ou ausência do exon e14 do *BCR* e suas implicações na heterogeneidade clínica da LMC, tem sido motivo de muitos estudos. A relação, por exemplo, entre e14a2 com trombocitose é controversa. Contudo, outros autores não confirmaram esta hipótese (OPALKA *et al.*, 1992; INOKUCHI *et al.*, 1994). Resultados conflitantes também foram relatados com relação a resposta ao interferon (THIJSEN *et al.*, 1999; INOUE *et al.*, 1992).

Alguns autores relacionaram que a localização do ponto de quebra no gene *BCR* e/ou possivelmente no gene *ABL*, determina o fenótipo da doença. Segundo os mesmos, a proteína p190 pode funcionar preferencialmente durante a diferenciação linfóide ou monocítica, enquanto a p210 contém a sequência *BCR* adicional que parece afetar a via comum de ambos precursores de LLA e LMC. A variabilidade da localização do ponto de quebra dentro do gene *BCR* e o fato de que p190 está predominantemente associada com LLA, enquanto p210 é mais consistente em LMC (90% dos pacientes), mostra uma distinção entre a verdadeira LLA *de novo* (m-BCR, p190) e a LMC na fase blástica linfóide (M-BCR, p210) (FADERL *et al.*, 1998; HASKOVEC *et al.*, 1998; HUETTNER *et al.*, 2000). Na LMA, o ponto de quebra pode ocorrer em qualquer uma das regiões. Os rearranjos que codificam a p210 tornam a LMA indistinguível da LMC em crise

blástica mielóide, enquanto a expressão da p190 identifica a verdadeira LMA, também chamada LMA *de novo* (COLLEONI, *et al.*, 1998).

MEISSNER *et al.* (1999), analisaram o tipo de junção no RNAm híbrido *BCR/ABL*, em sangue periférico de 33 pacientes com LMC. Em 42,4% dos casos, foi observado RNAm com junção do tipo e14a2, em 39,4% o RNAm e13a2 e em 18,2% ambos os tipos, mas com predomínio de e14a2. Contudo, não foram observadas correlações significativas entre tipos de RNAm e idade, teor de hemoglobina, contagem de leucócitos e plaquetas, porcentagem de blastos ou basófilos e esplenomegalia ao diagnóstico, sexo, ou duração da fase crônica.

A correlação entre formas p210 da *BCR/ABL* com LMC e p190 com LLA-B sugere que formas específicas de *BCR/ABL* podem levar a funções específicas na etiologia da leucemia (WONG & WITTE, 2004). Cada uma destas oncoproteínas contém o mesmo seguimento do ABL, diferindo na quantidade do BCR (SATTLER & GRIFFIN, 2003). Não se sabe, contudo, como as proteínas p190, p210 e p230 diferem uma da outra em termos de sinalização (MELO *et al.*, 2003; SATTLER & GRIFFIN, 2003; TIPPING & MELO, 2004).

Ainda não está esclarecido se as leucemias agudas com Ph são doenças distintas ou se representam a fase blástica de LMC não diagnosticada. Entre os casos de LLA com Ph, aproximadamente 50% têm o rearranjo gênico M-BCR e a proteína híbrida p210 kD idêntica àquela da LMC. Outros cerca de 50% têm o rearranjo gênico m-BCR e a proteína híbrida p190 kD. Muitos especialistas afirmam que LLA com Ph é uma entidade distinta da fase blástica de LMC. Já a LMA com Ph é uma doença rara e tem sido muito discutido se representa a fase blástica de LMC não diagnosticada ou se é uma entidade distinta. Estudos moleculares de LMA com Ph também têm mostrado ambos rearranjos

gênicos M-BCR e m-BCR, similares àqueles encontrados em LLA com Ph, reforçando que LMA com Ph é realmente uma entidade distinta. A hipótese de que sejam entidades distintas também é reforçada pelas seguintes observações: leucemias agudas com Ph têm uma quantidade de leucócitos muito alta, doença extramedular é mais freqüente e têm resposta pobre à terapia, quando comparadas com pacientes com leucemia aguda sem Ph. Além disso, o retorno a um cariótipo normal após a indução quimioterápica é também muito mais fácil em pacientes com leucemia aguda, do que naqueles em fase blástica de LMC. Ainda, LMA com Ph geralmente é precedida por síndrome mielodisplásica com ou sem Ph (KEUNGGM, 2004).

Metilação em LMC

A maioria das pesquisas genéticas realizadas em leucemias destaca as alterações citogenéticas, porém, as células malignas também têm um epigenótipo diferente. A principal modificação epigenética é a metilação dos resíduos do nucleotídeo citosina (ESTELLER, 2000).

A metilação de citosinas afeta a expressão de vários genes. Nas células normais, a metilação ocorre predominantemente em regiões pobres em citosina e guanina (CG), enquanto as áreas ricas em CG, chamadas ilhas CpG, que contêm promotores e exons, freqüentemente não estão metiladas. A metilação das ilhas CpG já foi associada com replicação tardia, condensação de cromatina e inibição da transcrição (COSTELLO *et al*, 2000; NGUYEN, *et al.*, 2001). Nas células normais, parece atuar como uma defesa contra parasitas moleculares por inibição da atividade de vírus e transposons (segmentos de DNA que têm a capacidade de mover-se e replicar-se dentro do genoma) (OAKELEY, 1999; STRACHAN & READ, 2002).

A metilação do DNA é o resultado da atividade da enzima DNA metiltransferase (DNA-Mtase) que, ao transferir um grupo metil para as citosinas do dinucleotídeo 5' - CG - 3', altera a expressão de genes regulados por promotores contendo ilhas CpG. Assim, a diminuição da metilação nestas regiões está associada com atividade gênica e, ao contrário, a manutenção ou o ganho de metilação, com a diminuição da transcrição. O padrão de metilação específico de cada tecido e sua alteração são, portanto, importantes na tumorigênese (OAKELEY, 1999; SINGAL & GINDER, 1999; ESTELLER, 2000).

A metilação do promotor do oncogene *ABL* (Pa) é uma alteração epigenética comum associada com a progressão clínica da LMC (ASIMAKOPOULOS *et al.*, 1999b; SHTEPER *et al.*, 2001). Geralmente indica uma doença de evolução longa, associada com probabilidade alta de transformação blástica e parece permitir a avaliação do resultado da terapia com interferon alfa (IFN- α) (BEN-YEHUDA *et al.*, 1997). A falta de metilação nessa região parece estar restrita à fase crônica, enquanto a hipermetilação é observada quando ocorre a crise blástica. A longa permanência na fase crônica e a fase acelerada estão associadas com um padrão intermediário de metilação, que pode ser revertido após o tratamento com IFN- α (ASIMAKOPOULOS, *et al.*, 1999b).

BEN-YEHUDA *et al.* (1997) descreveram que em função desta característica progressiva, a metilação do DNA pode servir como um marcador para a progressão neoplásica em LMC, principalmente após o transplante de medula óssea. De acordo com SUN *et al.* (2001), não se sabe se a metilação é uma mudança freqüente na medula óssea no início da fase crônica ou somente após este estágio, mas sim que a metilação do Pa do *ABL* freqüentemente é um marcador precoce da LMC nos precursores hematopoéticos e nas células mononucleares da medula óssea.

Os estudos de ASIMAKOPOULOS *et al.* (1999a) sugeriram que a metilação do Pa do *ABL* é um evento necessário, mas não suficiente, para a evolução clonal da LMC. É provável que a fase crônica seja mantida pelo equilíbrio na quantidade de proteínas BCR/*ABL* e *ABL* citoplasmática, que exercem funções antagônicas no controle da apoptose, progressão do ciclo celular e instabilidade genética. A doença pode se desenvolver quando este equilíbrio é perdido, como resultado da transcrição reduzida do promotor *ABL* interno. O tratamento com IFN- α parece atuar no padrão de metilação e ser capaz de restabelecer este equilíbrio, levando ao prolongamento da fase crônica. Portanto, a metilação do *ABL* é dinâmica e pode ser modulada pelo tratamento. A reversão da hipermetilação do gene e de outros genes envolvidos na patogênese da LMC pode oferecer novos caminhos para a intervenção terapêutica nessa leucemia muito comum na população (ASIMAKOPOULOS, *et al.*, 1999a).

Terapêutica da LMC

Após o diagnóstico de LMC o paciente é tratado com agentes terapêuticos, de acordo com protocolos específicos, e submetido ou não ao transplante de células tronco (*stem cell*) hematopoéticas (Transplante de Medula Óssea – TMO) (McBRIDE *et al.*, 2000; TEFFERI, 2001).

Da transição de uma doença predominantemente mielóide na fase crônica para linhagens alternativas na crise blástica, surgiu à questão de quais tipos celulares poderiam conter o cromossomo Ph. FIALKOW *et al.* (1967, 1977) estudaram diferentes tipos celulares de pacientes com LMC na fase crônica para investigar a presença do cromossomo Ph. Surpreendentemente, os autores observaram que tanto as linhagens granulocíticas como as eritróides continham o cromossomo Ph, apesar do fato de que

somente células mielóides estão expandidas durante a fase crônica. A presença deste cromossomo nas duas linhagens sugere que o cromossomo Ph é originado em vários tipos celulares ou se origina em uma *stem cell* que transmite às descendentes de diferentes linhagens celulares (WONG & WITTE, 2004).

A descoberta de uma possível origem clonal da célula progenitora hematopoética sugeriu que a eliminação de células progenitoras com o Ph e a reposição destas com células progenitoras normais seria um procedimento terapêutico efetivo, o que resultou no TMO (WONG & WITTE, 2004). Mas, embora seja considerado até o momento a única opção de cura para os pacientes com LMC, a recaída, ou seja, a volta da doença de base, ainda é uma das principais causas de falha dessa opção terapêutica (OVALARRIA *et al*, 2001; PALLOTTA *et al.*, 2001; GOPCSA *et al*, 2003).

Após um TMO bem sucedido, a hematopoese e a imunidade são reconstituídas a partir das células do doador. A recaída da doença, que ocorre em cerca de 50% dos casos, pode ser explicada por mecanismos nos quais clones de células do paciente conseguem superar as altas doses de quimioterapia. No caso dos transplantes alogênicos (de doador compatível quanto aos antígenos de histocompatibilidade), estes clones sobrevivem ainda ao efeito anti-tumoral do novo enxerto. Mais raramente a recidiva da doença pode ocorrer em células do doador (PALLOTTA *et al.*, 2001; RAMÍREZ-ACEVES *et al.* 2001; GOPCSA *et al*, 2003).

No TMO alogênico e no autólogo (do próprio paciente) o monitoramento é importante para detectar o sucesso do procedimento e para o estudo do quimerismo (CRESCENZI *et al.*, 2000).

A coexistência de células do doador e receptor na medula óssea e/ou sangue periférico é conhecida como quimerismo misto, que pode ser estável, quando detectado

durante um período mínimo de um ano, ou transitório, quando detectado por um período de tempo curto (HOKAMA *et al.*, 1999). O quimerismo completo é considerado quando somente células do doador são encontradas na medula óssea (VINOGRADOVA, *et al.*, 2001).

O objetivo do tratamento consiste, portanto, na supressão ou eliminação do clone Ph positivo e na restauração da hematopoese Ph negativa. A obtenção de resposta hematológica é importante para o alívio dos sintomas a curto-prazo, mas é a resposta citogenética que é crítica para o controle da progressão da doença a longo prazo. Tal resposta ocorre quando o cromossomo Ph é eliminado. Já foi demonstrada uma forte correlação entre resposta citogenética e aumento da sobrevida com diferentes modalidades terapêuticas. Assim, quanto maior a resposta citogenética, maior a sobrevida, que resulta do retardo da progressão da doença para a fase blástica. A resposta citogenética, portanto, é um marcador prognóstico importante para sobrevida (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

A decisão do tipo de tratamento, entretanto, depende de vários fatores, entre os quais a idade (abaixo ou acima de 55 anos), a disponibilidade de doador HLA compatível, estágio da doença e a preferência do paciente ou da família, são os mais referidos (McBRIDE *et al.*, 2000; TEFFERI, 2001).

Os agentes terapêuticos freqüentemente utilizados incluem o IFN- α , a hidroxiuréia e o bussulfan. O tratamento com IFN- α tem permitido uma vantagem sobre a hidroxiuréia e o bussulfan, porém, todos são considerados paliativos por alterarem muito pouco o curso natural da doença (IMPARATO *et al.*, 1998; TEFFERI, 2001).

A terapia com IFN- α aumenta a sobrevida por um ou dois anos, quando comparada com a hidroxiuréia, e pode reduzir o número de células com cromossomo Ph. A resposta citogenética ao IFN- α prediz o resultado, sugerindo que esta resposta pode ser

usada como um suporte clínico (PEGGS & MACKINNON, 2003). Mas, a toxicidade é muito comum com o uso do IFN- α , que resulta em efeitos colaterais como perda de peso, depressão, insônia, disfunção cognitiva, desconforto abdominal, doenças psiquiátricas e neurológicas, disfunção renal e pancitopenia, o que leva à interrupção do tratamento em cerca de 25% dos casos (STEEGMANN *et al.*, 2003).

Aproximadamente 20% dos pacientes com LMC apresentam sobrevida prolongada como resultado de remissão cariotípica maior. A adição de aracetina (Ara-C) ao tratamento com o IFN- α pode aumentar a sobrevida (TEFFERI, 2001; PEGGS & MACKINNON, 2003).

Por outro lado, a introdução relativamente recente do mesilato de imatinibe (Glivec®, Novartis, Basel, Switzerland), também conhecido como STI-571 {4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phenyl]benzamide methanesulfonate}, um agente oral bem tolerado, tem sido fortemente relatada como a melhor terapia para LMC (DRUKER *et al.*, 2001; TEFFERI, 2001).

O imatinibe foi aprovado pelo Food and Drug Administration em maio de 2001 para o tratamento de pacientes com LMC resistentes a terapia com IFN- α e, em fevereiro de 2002, para tratamento de tumores gastro-intestinais (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

A terapia com imatinibe é bem tolerada, os efeitos colaterais são mínimos e incluem náusea, vômito, câimbra e retenção de líquidos. Mas, alguns pacientes podem desenvolver efeitos adversos mais graves como mielossupressão (citopenias, particularmente neutropenia e trombocitopenia) e edema cerebral (EBNÖETHER *et al.*, 2002; AULT *et al.*, 2004).

O imatinibe estabiliza uma conformação inativa de BCR/ABL e quinases relacionadas (ELLIOTT *et al.*, 2002), pois ocupa o sítio de ligação do ATP de várias



moléculas tirosina quinase e evita a fosforilação dos substratos que estão envolvidos na regulação do ciclo celular (PEGGS & MACKINNON, 2003), causando a parada de crescimento ou a apoptose nas células hematopoéticas que expressam a proteína quimérica maligna, sem afetar as células normais (DRUKER *et al.*, 2001; TEFFERI, 2001). O imatinibe, portanto, inibe a tirosina quinase BCR/ABL, bloqueia o crescimento das células leucêmicas e induz a apoptose (VLAHOVIC & CRAWFORD, 2003).

O imatinibe inibe a ação de diferentes quinases BCR/ABL (p210 e p190), v-ABL, c-ABL, o c-KIT, que é expresso em tumor estromal gastrointestinal (GIST), e o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Assim, a retenção de líquidos tem sido associada com a inibição do receptor PDGF, que regula a pressão de fluido intersticial via interação entre células e moléculas na matriz extracelular através de efeito tênsil no sistema de filamento intracelular de actina (EBNÖETHER *et al.*, 2002).

O imatinibe tem mostrado atividade em todas as fases de LMC, embora as respostas sejam mais consideráveis e duradouras em pacientes que estão na fase crônica (HUGHES *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais as células malignas se tornam resistentes a drogas citotóxicas convencionais, como a hidroxiuréia, não são conhecidos. A progressão da doença envolve a ocorrência de mudanças moleculares adicionais no clone Ph que bloqueiam a maturação celular. O surpreendente é que o imatinibe tem eficácia também na crise blástica da LMC e existem duas possíveis explicações para este fato: ou a tirosina quinase BCR/ABL é necessária para ocorrer a transformação blástica, ou outras vias de sinal de transdução, que são ativadas durante a transformação blástica, também podem ser inibidas pelo imatinibe. Esta última possibilidade é suportada pela observação de que, pelo menos em laboratório, linhagens celulares resistentes ao imatinibe

apresentam uma super expressão de BCR/ABL e podem apresentar amplificação da fusão gênica (GOLDMAN & MELO, 2001).

Os resultados da terapia com imatinibe têm ultrapassado quase todas as expectativas. Entre os pacientes com a doença na fase acelerada que falharam na terapia com interferon, a taxa de resposta citogenética completa atingiu 41% e, dos pacientes diagnosticados na fase crônica, 68% atingiram resposta citogenética completa (DRUKER, 2003).

Em um estudo da fase I de pacientes em crise blástica, 55% dos pacientes com LMC e 70% dos pacientes com LLA responderam inicialmente ao imatinibe, mas 70% do primeiro grupo e 100% do segundo recaíram dentro de seis meses (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

O monitoramento qualitativo e quantitativo dos pacientes com LMC em terapia é fundamental (DEININGER, 2003). A resposta à terapia pode ser avaliada em três níveis: (1) resposta hematológica, definida como normalização dos valores do sangue periférico e do tamanho do baço; (2) resposta citogenética, definida como proporção de metáfases com Ph e (3) resposta molecular, definida de acordo com o método utilizado, como a proporção residual do gene *BCR/ABL* transcrito ou da proteína. A resposta citogenética é ainda classificada em quatro categorias: (1) resposta completa, definida como ausência de células com Ph ou *BCR-ABL*; (2) resposta parcial, em que há presença de 1-34% de células com Ph ou *BCR-ABL*; (3) resposta menor ou menor, em que há 35-94% de células com Ph ou *BCR/ABL* e (4) sem resposta, em que pelo menos 95% das células da medula óssea têm ou o cromossomo Ph ou o rearranjo *BCR-ABL*. A resposta citogenética maior é considerada quando ocorre resposta citogenética completa ou parcial (TBAKHI, 2002).



Pacientes que não apresentam resposta citogenética após seis meses de terapia geralmente são definidos como tendo resistência primária ao imatinibe e, possivelmente, apresentam mutações no *ABL*. Alguns estudos suportam a hipótese de que mutações dentro do gene *ABL* são induzidas pelo curso da doença e que o tratamento com imatinibe selecionaria esses clones (AGIRRE *et al.*, 2003).

Não está esclarecido se as remissões resultantes da terapêutica com imatinibe são duráveis. A inibição da atividade tirosina quinase de BCR/ABL pelo imatinibe não elimina progenitores malignos primitivos em pacientes com LMC. Portanto, pacientes em resposta citogenética completa tratados com este medicamento precisam ser monitorados para avaliação do risco de recaída (BHATIA *et al.*, 2003).

Apesar das altas taxas de resposta hematológica e citogenética, doença refratária e resistência secundária têm sido observadas em pacientes em monoterapia com imatinibe. Esta resistência pode ser causada por mecanismos dependentes ou independentes de *BCR/ABL*. Frequentemente tem sido observada amplificação genômica do *BCR/ABL*, aberrações cromossômicas adicionais e mutação em ponto no domínio quinase *BCR/ABL*, resultando na reativação da atividade tirosina quinase (HOCHHAUS, 2003). Em alguns pacientes a resistência tem sido associada com a substituição de um único aminoácido no resíduo treonina do domínio *BCR/ABL* quinase (GUILHOT *et al.*, 2003). Outras mutações, inclusive afetando o aminoácido Glu255, têm sido descritas (HOCHHAUS *et al.*, 2002; AGIRRE *et al.*, 2003).

Como já salientado, a resistência ao imatinibe pode ocorrer em todas as fases da doença, alguns meses ou anos após, como resultado da seleção de subclones abrigando mutações no domínio tirosina quinase do *BCR/ABL*, conhecido como o mecanismo principal de reativação gênica. Estas mutações em ponto têm sido detectadas em 35 a



90% dos pacientes resistentes e os 31 tipos diferentes já descritos (BRANFORD *et al.*, 2004) envolvem substituições de 25 aminoácidos em 21 posições diferentes no gene. Sete das 25 mutações mapeadas nos resíduos de contato com a droga impedem a mesma de se ligar ao *ABL*, no entanto, a maioria não (BURGESS *et al.*, 2005).

A avaliação de casos resistentes é necessária para sugerir a mudança terapêutica. A seleção clonal de células resistentes que têm a mutação *BCR/ABL* pode ser revertida pela interrupção da terapia com imatinibe e uso de quimioterapia convencional (HOCHHAUS, 2003).

Novas perspectivas para pacientes resistentes têm sido abordadas. Os estudos mais recentes referido a redução da massa leucêmica de células com Ph com a intensificação (altas doses) de imatinibe e o resgate com célula hematopoética periférica, mobilizada por quimioterapia e fator de crescimento (*purging in vivo*). Outros métodos de *purging* poderão ser aplicáveis, como o dos oligodeoxinucleotídeos *antisense* dirigidos contra o *BCR/ABL* (*short-interfering RNA*), um método potente de alterar a expressão gênica do *BCR/ABL*. Outra abordagem possível seria a utilização do imatinibe com outros inibidores potentes como o *purging in vitro*. O TMO autólogo em LMC ainda é uma interrogação e está restrito a pacientes que não responderam ao tratamento com imatinibe (SOUZA & PAGNANO, 2004).

Algumas Questões sem Respostas

Embora muito tenha sido descoberto, questões importantes referentes à biologia e ao tratamento da LMC, ainda não estão completamente esclarecidas:

1. Quais os mecanismos biológicos envolvidos na origem do rearranjo *BCR/ABL*?

2. Como a desregulação da transdução de sinal pela oncoproteína BCR/ABL confere a vantagem proliferativa do clone maligno?
3. Quais as bases moleculares da progressão da doença?
4. Quais os antígenos alvos no efeito do enxerto contra a leucemia?
5. Qual o potencial clínico real do imatinibe isolado ou combinado com outros inibidores da transdução de sinal e outras drogas citotóxicas e que agentes podem melhorar ou comprometer sua eficácia?
6. O que desencadeia as mais de 30 mutações pontuais no *BCR/ABL* seria o mesmo mecanismo que leva às aberrações cromossômicas adicionais? Por que embora secundárias, tais aberrações são sempre as mesmas?
7. Aberrações cromossômicas adicionais inespecíficas em pacientes em uso de imatinibe podem significar escape tumoral ou foram desencadeadas pela droga?
8. Qual o tempo de duração do tratamento com imatinibe e quais as condições determinantes deste tempo?
9. O tratamento com TMO autólogo e imatinibe poderia ter algum efeito benéfico? Este procedimento de baixa mortalidade no contexto dos TMO poderia potencializar ainda mais a capacidade de redução dos transcritos quando a doença residual for detectada por métodos moleculares em pacientes que utilizam o imatinibe?

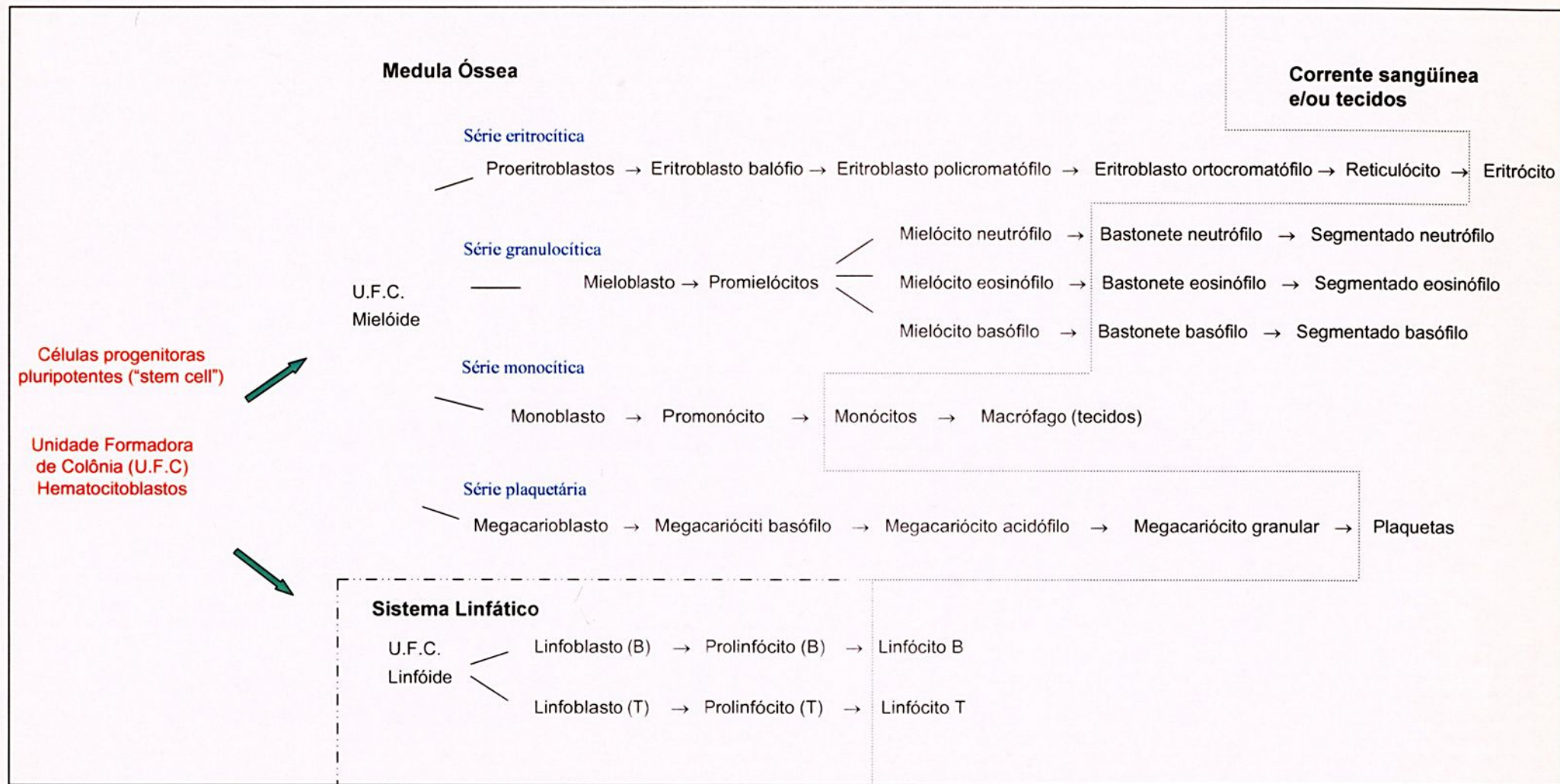


Figura 1. Esquema da hematopoiese. Todas as células do sangue originam-se de células pluripotentes. A quantidade de proliferação e a direção da diferenciação é determinada pelo contato célula a célula no microdesenvolvimento da medula óssea e por proteínas reguladoras (citocinas).

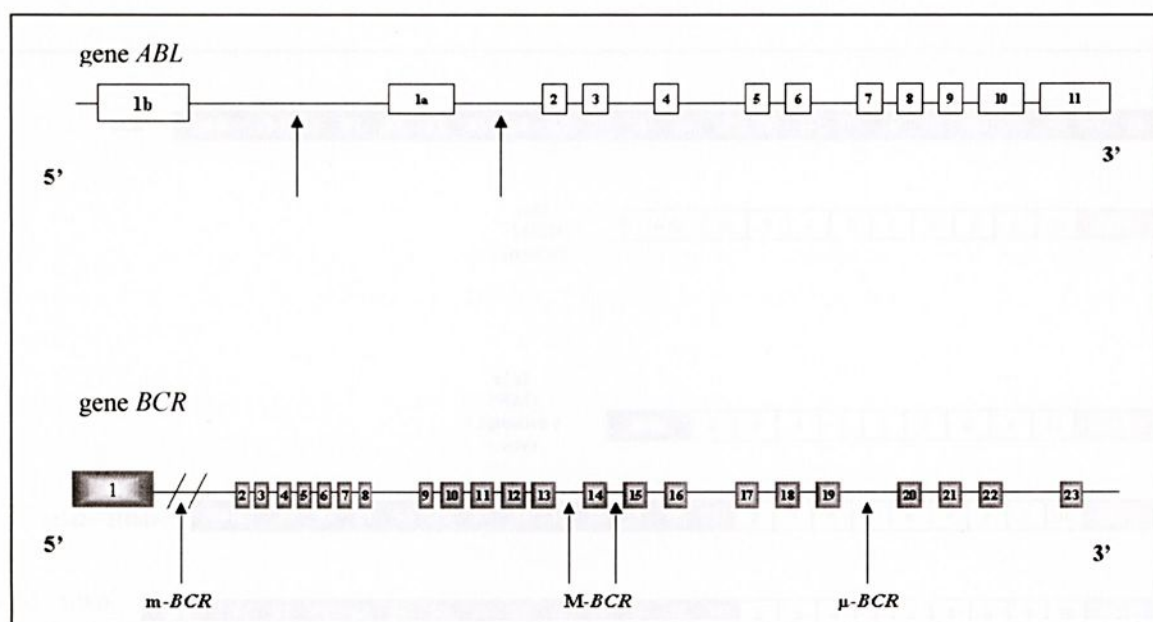


Figura 2: O gene *ABL*, localizado no cromossomo 9, e o gene *BCR* localizado no cromossomo 22, estão envolvidos na formação do cromossomo Ph. As linhas horizontais representam as seqüências do DNA genômico dos genes *BCR* e *ABL*. Os quadros representam a posição dos exons. Os espaços entre os quadros representam as seqüências de introns desses genes. As regiões de ponto de quebra estão representadas com setas (modificado de THIJSSEN *et al.*, 1999).

Referências Bibliográficas

ACAR, M. et al. Identification of variant translocations in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* v. 93, p. 115-118, 1997.

AGGAR, N. et al. Lack of BCR/ABL point mutations in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase before imatinib treatment is not predictive of response. *Hematologica*, v. 88, n. 12, p. 1423-1426, 2003.

ALMEIDA, T.A. et al. B2 exon of the BCR gene is also duplicated in some patients with CML. *Leukemia*, v. 13, p. 645-651, 1999.

ANTIN, J.K. A 41-year-old woman with chronic myelogenous leukemia. *JAMA*, v. 290, p. 1063-1064, 2003.

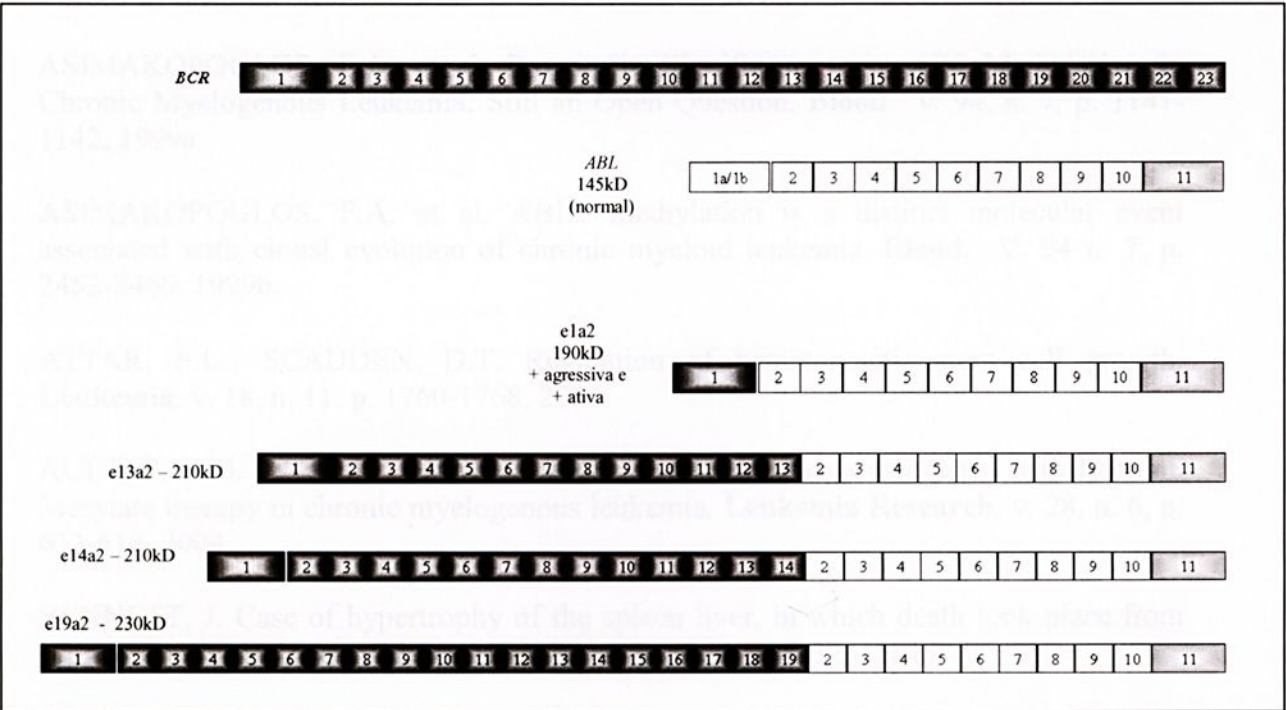


Figura 3: Proteínas de fusão BCR/ABL. Os exons da proteína BCR estão indicados com caixa escura e estão enumerados de 1 a 23. Os exons da proteína ABL estão em caixas claras e enumerados de 1 a 11 (modificado de THIJSSEN *et al.*, 1999).

Referências Bibliográficas

ACAR, H. et al. Identification of variant translocations in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 93, p. 115-118, 1997.

AGIRRE, X. et al. Lack of *BCR/ABL* point mutations in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase before imatinib treatment is not predictive of response. **Haematologica**, v. 88, n. 12, p. 1425-1426, 2003.

ALMEIDA, T.A. et al. B2 exon of the *BCR* gene is also duplicated in some patients with CML. **Leukemia**, v. 13, p. 645-651, 1999.

ANTIN, J.K. A 41-year-old woman with chronic myelogenous leukemia. **JAMA**, v. 290, n. 8, p. 1083-1090, 2003.

ASIMAKOPOULOS, F.A. et al. Prognostic Significance of *c-ABL* Methylation in Chronic Myelogenous Leukemia: Still an Open Question. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 1141-1142, 1999a.

ASIMAKOPOULOS, F.A. et al. *ABL1* methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. **Blood**, V. 94 n. 7, p. 2452-2460, 1999b.

ATTAR, E.C.; SCADDEN, D.T. Regulation of hematopoietic stem cell growth. **Leukemia**, v. 18, n. 11, p. 1760-1768, 2004.

AULT, P. et al. Interleukin 11 may improve trombocytopenia associated with Imatinib Mesylate therapy in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia Research**, v. 28, n. 6, p. 613-618, 2004

BENNETT, J. Case of hypertrophy of the spleen liver, in which death took place from suppuration of the blood. **Edinb. Med. Surg. J.**, v. 64, p. 41323, 1845.

BEN-YEHUDA, D. et al. Molecular follow-up of disease progression and interferon therapy in chronic myelocytic leukemia. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4918-4923, 1997.

BERNSTEIN, R. et al. Karyotype analysis in acute nonlymphocytic leukemia (ANLL): comparison with ethnic group, age, morphology, and survival. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 6, p. 187-199, 1982.

BHATIA, R. et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4701-4707, 2003.

BRAIN, J. M.; SAKSENA, A.; LANEUVILLE, P. The kinase inhibitor STI571 reverses the *BCR-ABL* induced point mutation frequencies observed in pre-leukemic P190^{Bcr-Abl} transgenic mice. **Leukemia Research**, v. 26, n.11, p. 1011-1016, 2002.

BRANFORD, S. et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. **Blood.**, v. 104, n. 9, p. 2926-2932, 2004.

BURGESS, M.R. et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. **PNAS – Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n. 9, p. 3395-400, 2005.

COLLEONI, G.W.B. et al. Leucemia mielóide aguda Ph1-positivo *de novo* ou crise blástica de leucemia mielóide crônica? Análise molecular e evolução clínica de um caso. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 44, n. 3, p. 253-255, 1998.

COSTELLO, J.F. et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. **Nature Genetics.** v. 25, 2000.

CRAIGIE D. Case of disease of the spleen, in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. **Edinb. Med. Surg. J.** v. 64, p. 40013, 1845.

CRESCENZI, B. et al. Interphase FISH for Y chromosome, VNTR polymorphisms, and RT-PCR for *BCR-ABL* in the monitoring of HLA-matched and mismatched transplants. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 120, p. 25-29, 2000.

DE BRAEKELEER, M. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 44, p. 215-222, 1987.

DEININGER, M.W.N. Cytogenetic studies in patients on Imatinib. **Semin. Hematol.**, v. 40, n. 2, p. 50-55, 2003.

DRUKER, B.J. Chronic myeloid leukemia in the Imatinib Era. **Semin. Hematol.**, v. 40, n. 2, p.1-3, 2003.

DRUKER, B.J. et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

EBNÖETHER, M. et al. Cerebral oedema as a possible complication of treatment with imatinib. **Lancet.**, v. 359, p. 1751-1752, 2002.

ELLIOTT, M. A.; MESA, R.A.; TEFFERI, A. Adverse events after Imatinib Mesylate therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, n.9, p. 712-713, 2002.

ESPINOZA, J.P.M. et al. Secondary chromosomal changes in 34 Philadelphia-chromosome positive chronic myelocytic leukemia patients from the Mexican West. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 148, p. 166-169, 2004.

ESTELLER, E. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promotor hypermethylation of DNA repair genes. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 2294-2300, 2000.

FADERL, S. et al. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 91, p. 3995-4019, 1998.

FADERL, S. et al. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. **Ann Intern. Med.**, v. 131, p. 207-219, 1999.

FIALKOW, P. J.; GARTLER, S.M.; YOSHIDA, A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. **Proc. Natl. Acad. Arts Sci.**, v. 58, p.146871, 1967.

FIALKOW, P.J.; JACOBSON, R.J.; PAPAYANNOPOULOU, T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, and platelet monocyte/macrophage. **Am. J. Med.**, v. 63, p. 12530, 1977.

GOASGUEN, J.E.; BENNETT, J.M. Biological diagnosis of leukemia. In: **Temas de hematologia**. Viana, M.B., Fagundes, E.M., Belo Horizonte, 1997. p. 13-27.

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Mechanisms of disease: chronic myeloid leukemia – Advances in biology and new approaches to treatment. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, n.15, p. 1451-1464, 2003.

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n.14, p. 1084-1086, 2001.

GOPCSA, L. et al. Salvage chemotherapy wity donor lymphocyte infusión STI571 in a patient relapsing with B-lymphoblastic phase chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. **Pathology Oncology Research**, v. 9, n. 2, p. 131-133, 2003.

GRIFFIN, J.D. Phosphatidyl inositol signaling by BCR/ABL: opportunities for drug development. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 11-16, 2001.

GUILHOT, F. et al. Imatinib in combination with cytarabine for the treatment of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia chronic-phase patients: rationale and design of phase I/II trials. **Semin. Hematol.**, v. 40, n. 2, p. 92-97, 2003.

HAAS, O. A.; ARGYRLOU-TIRITA, A.; LION, T. Parental origin of chromosomes involved in the translocation t(9;22). **Nature**, v. 359, p. 414-416, 1992.

HARRISON, C.J. et al. Multiplex fluorescence in situ hybridization and cross species color banding of a case of chronic myeloid leukemia in blastic crisis with a complex Philadelphia chromosome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 116, p. 105-110, 2000.

HASKOVEC, C. et al. protein main be associated with an acute leukemia phenotype. **Br. J. Haematol.**, v. 103, p. 1104-1108, 1998.

HEIKE, T.; NAKAHATA, T. Stem cell plasticity in the hematopoietic system. **Int J Hematol.**, v. 79, n. 1, p. 7-14, 2004.

HIRABAYASHI, Y.; YOON, B.I.; LI, G.X.; KANNO, J.; INOUE, T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. **Toxicol Pathol.**, v. 32, p. 12-16, 2004.

HOCHHAUS, A. et al. Interim analysis fo Imatinib treatment in 300 patients with chronic myelogenous leukemia (CML). Evaluation of response and resistance. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p.1045, 2002.

HOCHHAUS, A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistência to Imatinib. **Semin. Hematol.**, v. 40, n. 2, p. 69-79, 2003.

HOCHHAUS A., BERGER U., HEHLMANN R. Therapy of chronic myelogenous leukemia in 2004. **Dtsch. Med. Wochenschr**, v. 1, n. 40, p. 2122-2127, 2004.

HOKAMA, P.O.M. et al. Análise de regiões repetitivas do genoma como parâmetro de avaliação da “pega” do TMO-Alogênico e do *status* quimérico. **Rev. Br. Hematol. Hemot.**, v. 21, n.1, p. 23-27, 1999.

HUETTNER, C.S. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR/ABL1. **Nat. Genet.**, v. 24, n.1, p. 57-60, 2000.

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.**, v. 349, n. 15, p. 1423-1432, 2003.

IMPARATO, F.P. et al. Co-evolução da terapêutica e do diagnóstico molecular da leucemia mielóide crônica. **Act. Oncol. Br.**, v. 19, n. 1, p. 259-266, 1998.

INOKUCHI, K. et al. Possible correlation of b3-a2-type bcr-abl messenger RNA defined by semiquantitative RT-PCR to platelet and megakaryocyte counts in Philadelphia-positive chronic myelogenous leudemia. **Int. Med.** v. 33, p189-192, 1994.

INOUE, T. et al. Possible correlation between fusion pattern of BCR/ABL mRNA and clinical response to alphaterferon in chronic myelogenous leukemia. **Leukemia**, v. 6, p. 948-951,1992.

JOHANSSON, B; MERTENS, F; MITELMAN, F. Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 3, p. 1–7, 1991.

KARTARJIAN, H.N. et al. Clinical Course and therpy of CML with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematol. Oncol. of N. Am.**, v. 12, n. 1, p.31-80, 1998.

KEUNGGM Y.K. et al. Philadelphia chromosome positive myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia – retrospective study and review of literature. **Leuk. Res.**, v. 28, n. 6, p. 579-586, 2004.

KURZROCK, R. et al. BCR rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited. **J. Clin. Oncol.**, v. 19, p. 2915-2926, 2001.

LI, W.J. et al. Characterization of bcr gene products in hematopoietic cells. **Oncogene**, v. 4, p.127-138, 1989.

LICHTY, B.D; KAMEL-REID,S. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2. **Biochem. J.**, v. 348, p. 63-69, 2000.

MAJSTEREK, I. et al. ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair: role in drug resistance? **Biochimie**, v. 86, n. 1, p. 53-65, 2004.

MARKOVIC, V.D. et al. Lack of *BCR/ABL* reciprocal fusion in variant Philadelphia chromosome translocations: a use of double fusion signal FISH and spectral karyotyping. **Leukemia**, v.14, p. 1157-1160, 2000.

MARU, Y.; WITTE, O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. **Cell**, v. 67, p. 459-468, 1991.

MASERATI, E. et al. Parental origin of chromosomes 9 and 22 involved in the Ph chromosome translocation in chronic myelocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 107, p. 151-152, 1998.

McBRIDE, N.C. et al. Autologous transplantation with Philadelphia-negative progenitor cells for patients with chronic myeloid leukemia (LMC) failing to attain a cytogenetic response to alpha interferon. **Bone Marrow Transplant.**, v. 26, p. 1165-1172, 2000.

MELO, J. V.; HUGHES, T. P.; APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukemia. **Hematology**, v. 132, p.52, 2003.

MEISSNER, R. et al. Analysis of mRNA transcripts in chronic myeloid leukemia patients. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 475-479, 1999.

MITELMAN, F. Geographic heterogeneity of chromosomes aberrations in hematologic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 20, p. 203-238, 1986.

MITELMAN, F.; LEVAN, G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms:: IV. A survey of 1871 cases. **Hereditas**, v. 95, p. 79-139, 1981.

MOREL, F. et al. Contribution of fluorescence in situ hybridization analyses to the characterization of masked and complex Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 147, n. 2, p.115-120, 2003.

NGUYEN, C. et al. Susceptibility of nonpromoter CpG island to de novo methylation in normal and neoplastic cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, n. 19, p. 1465-1472, 2001.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132. p. 1497, 1960.

OAKELEY, E.J. DNA methylation analysis: a review of current methodologies. **Pharmacol. Ther.**, v. 84, p. 389-400, 1999.

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

OLICIO, R.; RIVERO, M. B.; SEUÁNEZ, H.N. The paternal chromosome 9 and the maternal chromosome 22 are preferentially rearranged in chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, v. 18, n. 8, p. 1445-1448, 2004.

OPALKA, B. No correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet counts in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 80, p. 1854-1855, 1992.

PALLOTTA, R.; RAMOS, E.; RIBEIRO, M.R. Metodologia diagnóstica e tratamento da recaída após transplante de medula óssea em paciente com leucemia promielocítica aguda. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 3, p. 414-418, 2000.

PEGGS, K.; MACKINNON, S. Imatinib Mesylate – The new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 11, p. 1048-1050, 2003.

PETZER, A.L.; GUNSILIUS, E. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. **Arch. Med. Res.**, v. 34, n. 6, p. 496-506, 2003.

RAMÍREZ-ACEVES, R. et al. Transplante de medula óssea. **Gac. Méd. Méx.**, v. 137, n. 1, p. 59-63, 2001.

RANDHAWA, G.S. et al. Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 91, p. 3144-3147, 1998.

REID, A. et al. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukaemia can mimic typical blast crisis chromosome abnormalities or classic t(9;22): a report of two cases. **Br. J. Haematol.**, v. 113, p. 439-442, 2001.

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 605p.

ROWLEY, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. **Nature**, v.243, p.290-293, 1973.

RUBNITZ E.; LOOK, A.T. Molecular Genetics of childhood leukemias. **J. Hematol. Oncol.**, v. 20, n.1, p.1-11, 1998

SATTLER, M.; GRIFFIN, J.D. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. **Semin Hematol**, v. 40, n. 2, p. 4-10, 2003.

SAVAGE, D.G; ANTMAN, K.H. Drug therapy: Imatinib Mesylate- A new oral targeted therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, n. 9, p. 683-693, 2002.

SHTEPER P.J. et al. ABL1 methylation in Ph-positive ALL is exclusively associated with the P210 form of BCR-ABL. **Leukemia**, v. 15, n. 4, p. 575-582, 2001.

SINGAL R., GINDER, G.D. DNA methylation. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, 1999.

SOUZA, C.A.; PAGNANO K. Os desafios no tratamento da Leucemia mielóide crônica na era do mesilato de imatinibe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 4, p.282-284, 2004.

STEEGMANN, J. L. et al. Chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of interferon α and subsequently treated with Imatinib show reduced immunoglobulin levels and hypogammaglobulinemia. **Haematologica**, v. 88, p. 762-768, 2003.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Genética Molecular Humana 2ª edição, Artmed editora, 576 páginas, 2002. Capítulo 7: Organização do Genoma Humano, p. 139-168.

SUN B. et al. Abl1 promoter methylation can exist independently of bcr-abl transcription in chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. **Cancer. Res.**, v. 61, n. 18, p. 6931-6937, 2001.

TBAKHI, A. Qualitative and quantitative detection of residual disease in chronic myelogenous leukaemia. **Histopathology**, v.. 41, n. 2, p. 83-87, 2002.

TEFFERI, A. Chronic myeloid disorders: classification and Treatment overview. **Sem. Hematol.**, v. 38, n.1, p. 1-4, 2001.

THIJSSEN, S.F.T. et al. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. **Leukemia**, v. 13, p. 1646-1674, 1999.

TIPPING, A.; MELO, J. V. Comparative gene expression profile of p185^{Bcr-Abl} versus p210^{Bcr-Abl} expressing cells. **Leuk. Res.**, 28, p. 219-220, 2004.

VAN DER PLAS, D.C.; GROSVELD, G.; HAGEMEIJER, A. Review of clinical, cytogenetic, and molecular aspects of Ph-negative CML. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 52, p. 143-156, 1991.

VAN ETTEN, R.A. Studying the pathogenesis of BCR-ABL+ leukemia in mice. **Oncogene**, v. 21, p. 8643-8651, 2002.

VINOGRADOVA, O.A. et al. Study of the time course of mixed chimerism by fluorescent in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia after allogenic transplantation of bone marrow. **Ter Arkh**, v. 73, n. 7, p. 26-34, 2001.

VIRCHOW R. Weisses Blut. Froriep's Neue Notizen aus dem Gebiet der Natur.- und Heilkunde. **Weimer**, v. 36, p. 15155, 1845.

VLAHOVIC G, CRAWFORD J. Activation of tyrosine kinases in cancer. **Oncologist.**, v. 8, n. 6, p. 531-538, 2003.

WADLEIGH, M.; DEANGELO, D.J.; GRIFFIN, J.D.; STONE, R.M. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. **Blood.**, v. 105, n. 1, p. 22-30, 2005.

WONG S.; WITTE O.N. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p.247-306, 2004.

Capítulo II

Capítulo II

Objetivos

Material e Métodos

Resultados

Considerações Éticas

Objetivos

Considerando a importância da investigação citogenética para o diagnóstico, monitoramento do tratamento com mesilato de imatinibe e monitoramento após o transplante de medula óssea (TMO), visando a terapêutica adequada para sobrevida maior e cura da LMC, o presente trabalho teve como objetivos :

1. investigar as alterações cariotípicas ao diagnóstico da LMC, com o uso da técnica do bandamento GTG;
2. estudar a presença e a frequência do rearranjo gênico *BCR/ABL* ao diagnóstico, durante o tratamento com mesilato de imatinibe e após o transplante de medula óssea, com o uso da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH);
3. com base na frequência de *BCR/ABL*, avaliar tempo para aquisição da remissão citogenética completa, sobrevida livre de doença após o TMO e a taxa de mortalidade relacionada a este procedimento;
4. avaliar a resposta citogenética dos pacientes em uso de mesilato de imatinibe;
5. Investigar as exposições ocupacionais dos pacientes e tentar correlacionar com possíveis agentes etiológicos da LMC.

Material e Métodos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) da FAMERP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), processo nº 25000.044931/2002-11, em conformidade com as normas regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

1 - Casuística

Foram estudadas 205 amostras de medula óssea de 126 pacientes. Destas, 60 não foram aproveitadas neste projeto, ou por não ter sido confirmado posteriormente o diagnóstico de LMC (44), ou por terem sido encaminhadas como de pacientes ao diagnóstico e sem tratamento, porém os dados do prontuário médico mostraram que estavam em uso de quimioterápicos (16). Também foram excluídos pacientes com outros diagnósticos e aqueles que não aceitaram participar deste estudo.

Portanto, foram incluídas neste estudo 145 amostras de 66 portadores de leucemia mielóide crônica, 38 do sexo masculino e 28 do sexo feminino, com idades variando de 13 a 77 anos ($x = 41,3$). Vinte e cinco foram estudados ao diagnóstico e não haviam sido submetidos a tratamento quimio ou radioterápico, 28, estavam em tratamento apenas com o mesilato de imatinibe e 24 haviam sido submetidos ao transplante alogênico mieloablativo de medula óssea.

Oito pacientes estudados ao diagnóstico foram posteriormente tratados com imatinibe e outros três foram submetidos ao TMO. Portanto, 11 foram incluídos em categorias diferentes do estudo. A Tabela 1 apresenta o sexo, a idade e a condição terapêutica de cada

paciente durante a realização deste estudo. Os códigos do Laboratório foram mantidos nesta tese para identificação correta dos pacientes nos diferentes tipos de estudo, porém, foram alterados nos artigos submetidos.

As amostras foram encaminhadas de pacientes atendidos no Serviço de Hematologia, na Unidade de TMO do Hospital de Base de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME) e no Hospital de Câncer de Barretos (Fundação Pio XII).

Os hematologistas foram os responsáveis pela obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), em função do seu contato direto com os pacientes. Os resultados foram entregues para estes profissionais e sua aplicação clínica ou não seguiu os critérios da equipe médica.

A coleta de informações gerais sobre os pacientes também foi realizada pelos médicos, de acordo com um protocolo padrão (Anexo II), fornecido pelos pesquisadores responsáveis, que foi encaminhado para o laboratório juntamente com as amostras.

As amostras estudadas foram obtidas de partes daquelas utilizadas nos procedimentos hematológicos de rotina, aos quais os pacientes são necessariamente submetidos.



Tabela 1. Sexo, idade em anos e condição terapêutica no momento do estudo, de cada caso.

Caso	Sexo	Idade	Condição	Caso	Sexo	Idade	Condição
H7	F	64	MI	H180	M	34	TMO
H13	F	47	MI	H181	M	46	TMO
H23	M	16	TMO	H186	M	25	TMO
H26	M	39	MI	H190	F	26	D
H50	M	30	TMO	H192	M	30	D
H51	M	44	D	H194	M	39	TMO
H52	M	18	D	H203	M	40	D
H58	F	57	MI	H204	F	29	TMO
H64	M	40	TMO	H205	F	45	D
H78	M	29	TMO			45	MI
H79	F	22	MI	H212	M	37	TMO
H90	M	55	D	H218	F	47	MI
H112	M	22	MI	H223	F	36	MI
H118	F	52	MI	H224	F	32	MI
H126	F	38	TMO	H228	M	64	D
H134	F	13	D			64	MI
		13	TMO	H230	M	49	D
H137	M	66	MI	H231	F	36	MI
H139	F	59	MI	H237	M	40	TMO
H144	F	42	MI	H241	M	29	D
H149	F	73	MI			29	MI
H151	F	36	TMO	H246	F	36	D
H152	M	42	D	H250	F	48	D
H155	F	29	TMO			49	MI
H160	M	39	MI	H251	F	26	D
H172	F	69	D			27	MI
		70	MI	H252	M	52	D
H173	M	20	TMO			52	MI

Tabela 1 - continuação

Caso	Sexo	Idade	Condição	Caso	Sexo	Idade	Condição
H263	M	37	TMO	H291	M	50	MI
H265	M	48	D	H293	M	44	MI
		49	MI	H298	M	77	D
H267	M	16	D	H306	F	44	TMO
		16	TMO	H307	F	43	TMO
H268	M	35	MI	H335	M	54	D
H272	M	26	D	H337	M	48	MI
		27	TMO	H339	M	69	D
H275	M	34	TMO	H361	F	60	D
H282	F	42	TMO	H362	F	37	TMO
H286	M	58	D				

F = feminino; M = masculino; D = diagnóstico; MI = mesilato de imatinibe; TMO = transplante de medula óssea

2 - Métodos

A. Obtenção de Células Neoplásicas do Sangue e da Medula Óssea

A coleta do material foi realizada pela própria equipe médica, de acordo com seus critérios, em procedimento de rotina realizado para diagnóstico hematológico. Uma parte das amostras coletadas foi enviada para o Laboratório de Genética da FAMERP/FUNFARME, para o estudo citogenético.

Foram realizadas culturas de células da medula óssea (osso esterno ou ilíaco), obtidas por punção aspirativa com seringa heparinizada, de acordo com o procedimento médico.

Para cada paciente foram realizadas culturas de curta duração (24 horas) de medula óssea (MO) ou o material foi submetido a uma preparação direta, sempre sem estimulação mitogênica (fito-hemaglutinina - PHA).

Para as culturas foram montados, pelo menos, dois frascos de cada amostra, cada um contendo 5,0mL de meio RPMI 1640, 2,0mL de soro fetal bovino, 02 gotas de estreptomicina (100U/mL), 4 gotas de penicilina (100U/mL) e de 03 a 10 gotas do material, de acordo com a concentração de leucócitos.

Os frascos foram, então, mantidos em estufa a 37°C por cerca de 24 horas e aproximadamente 20 minutos antes do término deste tempo, foram adicionados 100µL de Colchicina (5µL/mL) (Cultilab).

Após o cultivo, o material foi centrifugado por 08 minutos a 1.000rpm e o sobrenadante foi retirado. Em seguida foi realizada a hipotonização com a adição lenta de 10mL de solução hipotônica de KCl (0,075M) a 37°C. Após 20 minutos, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante removido e, então, realizada a fixação com metanol:ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e de 05 minutos. Na primeira etapa

foram adicionados 10mL de fixador e nas demais 5mL, alternadas com centrifugações a 1000 rpm por 07 minutos.

Para preparação direta das células da medula óssea foram utilizados, pelo menos, dois tubos cônicos de 15mL previamente aquecidos a 37°C, contendo em cada um 9mL de KCl (0,075M) e 0,16 mL de Colchicina. Cerca de 03 a 10 gotas da camada intermediária do precipitado de MO foram adicionadas a cada tubo, que permaneceu em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos, a 1000rpm e o sobrenadante foi retirado. Logo após, foi realizada a fixação com metanol:ácido acético (3:1) em quatro etapas de 20, 10, 20 e 10 minutos, com adição de 10mL, 5mL, 10mL e 5mL de fixador, respectivamente, com centrifugações alternadas.

Após o cultivo por 24 horas ou preparação direta, parte do material obtido dos pacientes ao diagnóstico foi gotejada em lâminas úmidas e geladas, que foram envelhecidas por 20 minutos em estufa a 87°C e, posteriormente, submetidas à técnica de bandamento GTG. Outra parte das amostras dos pacientes ao diagnóstico e aquelas de pacientes em tratamento foram gotejadas em lâminas secas que foram, após um envelhecimento natural que variou entre um e dois dias, submetidas à técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

B. Bandamento GTG

Os casos ao diagnóstico foram todos estudados pela técnica de bandamento GTG segundo GROUCHY & TURLEAU (1977), com modificações. O material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60mL de PBS e, aproximadamente, 0,12g de tripsina) a 27°C por um tempo variável de 02 a 15 segundos. Em seguida, foi lavado em

PBS por 01 minuto, corado com solução tamponada de Giemsa a 2% por 05 minutos e lavado em água.

As metáfases foram analisadas em microscópio da marca Hund Wetzlar, modelo H 500, com aumento de 1.000 vezes.

A classificação dos achados e os critérios para a determinação de clone seguiram as recomendações do ISCN (1995). Assim, as perdas cromossômicas que ocorreram em pelo menos três células e os ganhos ou aberrações estruturais que ocorreram em pelo menos duas células, foram considerados clonais.

C. Hibridação *in situ* Fluorescente

Todos os casos foram estudados com a utilização da técnica de FISH que foi realizada de acordo com o protocolo de rotina utilizado no Medical Oncology Division Cancer Center, Denver, Colorado, adaptado às condições do Laboratório de Genética da FAMERP. Em Anexo IV são apresentadas, em detalhes, as soluções utilizadas neste procedimento.

As lâminas foram pré-tratadas em uma série sucessiva de banhos de etanol a 70, 85 e 100%, a temperatura ambiente, por 02 minutos cada. Em seguida, foram colocadas em ácido acético a 70% por 01 minuto. Imediatamente após este pré-tratamento, foram submetidas a três banhos consecutivos de PBS por 03 minutos cada, também a temperatura ambiente. Após nova desidratação, foram incubadas em solução de RNAase (100µg/mL em 2xSSC) por cerca de 30 a 45 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Então, receberam mais três banhos de 2xSSC (pH 7.0-7.4) de 03 minutos cada e uma nova desidratação em etanol.

A desnaturação foi realizada em solução de formamida a 72°C por 03 minutos, seguida por uma desidratação a frio com nova série de etanol (70, 85 e 100%) a -20°C.

Para hibridação foram utilizadas as sondas “LSI *BCR/ABL* Dual Color, Dual Fusion Translocation” (VYSIS), mapeadas em 9q34 e 22q11, para detecção da translocação t(9;22)(q34;q11)

As sondas para *BCR* e *ABL* foram usadas para localizar esses genes nos núcleos interfásicos. O kit é uma mistura de sonda LSI *BCR* marcada com SpectrumGreen e sonda LSI *ABL* marcada com SpectrumOrange. A sonda correspondente ao *BCR* recobre uma distância genômica de cerca de 1.5 Mb, iniciando em um segmento variável do locus da cadeia leve lambda da imunoglobulina (*IGLV*), estendendo ao longo do cromossomo 22 por todo o gene *BCR* e finalizando aproximadamente 900kb telomérico do *BCR*. A cobertura da sonda *ABL* tem um genoma alvo de aproximadamente 654 kb estendendo-se do gene argininosuccinate synthetase (*ASS*) até o último exon do *ABL*. Em células normais a utilização da sonda *BCR* resulta, portanto, em dois sinais verdes correspondentes à banda 22q11 dos dois cromossomo 22 e a sonda *ABL* em dois sinais vermelhos da banda 9q34 dos cromossomos 9 (2O2G). Células com a translocação e, portanto, com o gene híbrido *BCR/ABL* apresentam um sinal verde e um vermelho, além de dois sinais amarelados (1O1G2F), correspondentes à fusão gênica.

As sondas foram inicialmente homogeneizadas e diluídas na proporção de 1µL de sonda, 2µL de água deionizada e 7µL de LSI Hybridization Buffer, em um tubo tipo “eppendorf”. Cada tubo, após rápida homogeneização, foi mantido por 05 minutos em banho-Maria a cerca de 73°C, para desnaturação, e em seguida, mantido em gelo por cerca de 03 minutos.



Cada área da lâmina a ser hibridada recebeu 0.6 a 1 μ L de solução de sonda, foi então imediatamente coberta com lamínula, vedada com selante e incubada em câmara úmida a 37°C por, 24 a 48 horas.

Após esse período, foi realizada a lavagem pós-hibridação. Para isso, as lâminas foram colocadas em uma solução de 1X PBS a 45°C, por 02 minutos e num segundo borel também com PBS, a temperatura ambiente, por 02 minutos. Após a secagem das mesmas, foi adicionado o contracorante DAPI (10 μ L por campo) e a área de hibridação foi coberta com lamínula de vidro com 22 x 22mm.

A análise do material foi realizada por dois investigadores, que analisaram separadamente cerca de 150 núcleos dos casos ao diagnóstico e cerca de 500 núcleos daqueles em tratamento em microscópio de fluorescência Olympus BX60, equipado com filtros para DAPI, FITC, rodamina e filtro triplo, com lâmpada HBO 100W. Para documentação dos resultados foi utilizado o Filme Ektachrome 400 ASA (KODAK).

A hibridação foi considerada eficiente quando as áreas hibridadas apresentaram mais de 60% dos núcleos marcados. Diferentes quadrantes foram selecionados para análise para minimizar os problemas resultantes da variação e eficiência de hibridação. Foram analisados somente núcleos íntegros e sem sobreposições. Sinais bilobados que não estavam completamente separados foram contados como um único sinal e aqueles cujo diâmetro era o dobro do observado na maioria dos sinais, foram considerados como dois sobrepostos. Sinais muito próximos foram considerados independentes quando a distância entre eles era o dobro do tamanho de um dos sinais (EASTMOND *et al.*, 1995; HARRIS *et al.*, 1995). Núcleos sem sinais foram excluídos.

3 - Como controles, foram utilizadas lâminas provenientes de cultura de sangue periférico de indivíduos normais, atendidos no Serviço de Genética e pacientes portadores de outras doenças hematológicas, exemplo anemia.

Para a padronização dos critérios de corte para a sonda “LSI *BCR/ABL* Dual Color Dual Fusion Translocation” foram seguidos os mesmos critérios utilizados no Câncer Center of University of Colorado Health Sciences Center, que consistiu, no início do desenvolvimento do projeto, na análise de seis lâminas de controles diferentes. A média de fusão dupla *BCR/ABL* encontrada nos controles foi zero.

A coleta de medula óssea é um procedimento médico hematológico de rotina para os pacientes com leucemia e é realizada por profissional habilitado (médico). As amostras utilizadas neste estudo foram parte daquelas coletadas para testes hematológicos de modo que este projeto não traga riscos adicionais para o paciente ou prejuízos para as demais investigações laboratoriais às quais foi submetido.

As lâminas controles utilizadas para a técnica de FISH foram obtidas de linfócitos normais ou de pacientes portadores de outras doenças hematológicas como anemia atendidos no Serviço de Genética ou Serviço de Hematologia da FAMEDP.

Os riscos para os pacientes envolvidos neste projeto foram os mesmos daqueles que não participaram dele, ou seja, os dos procedimentos médicos de rotina, que neste caso, incluíam dor, ardência ou hematoma no local da punção com agulha.

Os resultados obtidos auxiliaram na elaboração de protocolos laboratoriais de rotina que foram implantados no Serviço de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Portanto, deste projeto foram obtidos apenas benefícios para os pacientes e serviços envolvidos.

3 - Considerações Éticas

Neste projeto foram estudadas, com a utilização de técnicas citogenéticas convencional e molecular, amostras de medula óssea de pacientes com LMC ao diagnóstico e durante o tratamento, para investigar alterações genéticas de importância fundamental no diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica. Os resultados obtidos, puderam ter uma aplicação clínica imediata e esta aplicação seguiu os critérios do hematologista responsável pelo paciente. Este profissional foi o responsável pela obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, recebeu todos os resultados dos testes genéticos realizados e comunicou-os aos doentes.

A coleta da medula óssea é um procedimento médico hematológico de rotina para os pacientes com leucemia e é realizado por profissional habilitado (médico). As amostras utilizadas neste estudo foram parte daquelas coletadas para testes hematológicos, de modo que este projeto não trouxe riscos adicionais para o paciente ou prejuízos para as demais investigações laboratoriais às quais foi submetido.

As lâminas controles utilizadas para a técnica de FISH foram obtidas de linfócitos normais ou de pacientes portadores de outras doenças hematológicas como anemia atendidos no Serviço de Genética ou Serviço de Hematologia da FAMERP.

Os riscos para os pacientes envolvidos neste projeto foram os mesmos daqueles que não participaram dele, ou seja, os dos procedimentos médicos de rotina, que neste caso, incluíram dor, ardência ou hematoma no local da punção com agulha.

Os resultados obtidos auxiliaram na elaboração de protocolos laboratoriais de rotina que foram implantados no Serviço de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Portanto, deste projeto foram obtidos apenas benefícios para os pacientes e serviços envolvidos.

Resultados

Foram estudadas 145 amostras de medula óssea de 66 indivíduos. A análise por citogenética convencional foi realizada somente nos casos encaminhados ao diagnóstico antes de qualquer tipo de tratamento e a análise por FISH foi realizada em todos os casos.

Os resultados estão apresentados nos capítulos III, IV e V, na forma de artigos científicos.

O capítulo III mostra as frequências do rearranjo dos genes *ABL* e *BCR* e de outras alterações, ao diagnóstico da LMC, avaliados por FISH e citogenética convencional.

No Capítulo IV está relatada a investigação do período da remissão citogenética completa, detectada por FISH, a sobrevida livre de doença e a taxa de mortalidade relacionada ao transplante em LMC após transplante alogênico mieloablativo de medula óssea.

O Capítulo V descreve as frequências do rearranjo gênico *BCR/ABL* e os padrões citogenéticos anormais envolvendo os genes *ABL* e *BCR*, em pacientes em tratamento exclusivo com mesilato de imatinibe.

Quanto às informações adicionais solicitadas, infelizmente, nem todas foram obtidas. Dos 66 pacientes estudados, de 63 foi possível conhecer a exposição profissional a agentes tóxicos e/ou a presença de outros casos de neoplasias na família.

Com relação à exposição a agentes tóxicos, dos informados, 20% dos casos eram fumantes, 12% etilistas e 24,2% lidavam com agrotóxicos ou outros agentes que sabidamente causam danos ao DNA (Anexo IV). O Capítulo VI apresenta uma Carta ao Editor, onde está referida a exposição ocupacional e sua relação com os dados da literatura.

Nenhum paciente referiu a presença de outros casos de leucemias na família, embora 28,1% tenham referido outros casos de neoplasias variadas entre seus familiares.

A Tabela 2 apresenta a frequência de casos masculinos e femininos estudados e a Tabela 3 mostra as faixas etárias destes pacientes. Não houve diferença entre o número de pacientes quanto ao gênero e a maioria estava com idades entre 41 e 60 anos ao diagnóstico.

As queixas clínicas apresentadas por cada paciente ao diagnóstico estão apresentadas no Anexo IV.

Sexo	Nº	%
Masculino	15	57,6
Feminino	13	42,4
Total	28	100%

Tabela 3. Caracterização da casuística de acordo com diferentes faixas etárias dos pacientes estudados ao diagnóstico.

Casuística	Idade			
	0-30	31-40	41-60	61->70
Nº	3	3	11	4
%	1	28	44	16

Tabela 2: Número de casos de acordo com o sexo dos pacientes.

Sexo	Nº	%
Masculino	38	57,6
Feminino	28	42,4
Total	66	100%

Tabela 3. Caracterização da casuística de acordo com diferentes faixas etárias dos pacientes estudados ao diagnóstico.

Casuística	Idade			
	0 -20	21-40	41-60	61 - > 70
Nº	3	7	11	4
%	1	28	44	16

Análise de Ressonância ZCZ/ABL por bombamento CFC e FISH: Comparação das
Frequências no Diagnóstico de LMC

Orlando Santos Vardiano-Guloni¹, Andréa Barbieri Corvalim-Salles², Cláudia Maria
Silva³, Carlos Roberto Miguel³, Agneta Cristina Fari Costa³

Capítulo III

¹Departamento de Biologia, IIII C E-1 UNESP, São José do Rio Preto, SP

²Históquímica (UNIFARME), São José do Rio Preto, SP

³Departamento de Citologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
(FAMERP), SP

Palavras-chave: ressonância nuclear por bombeamento, ZCZ/ABL, citogenética, FISH

Resumo

Apoio Financeiro: BAP/FAMERP e CNPq

Artigo original para submissão ao periódico Arquivos de Ciências da Saúde

Correspondência ao autor: Cristina A. Vardiano-Guloni, Departamento Laboratório de
Citologia, Av. Brigadeiro Faria Lima, 3541 - Bairro Universitário - CEP 13091-000,
Ribeirão Preto (SP) 13091-000, R. 1431 - E-mail: cristina.vardiano@unesp.br

Análise do Rearranjo *BCR/ABL* por bandamento GTG e FISH: Comparação das Frequências ao Diagnóstico da LMC

Cristina Benitez Vendrame-Goloni¹, Andréa Borduchi Carvalho-Salles², Octávio Ricci Júnior², Carlos Eduardo Miguel², Agnes Cristina Fett-Conte³

Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP

Hemocentro (FUNFARME), São José do Rio Preto, SP

Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - (FAMERP), SP

Palavras chave: leucemia mielóide crônica, *BCR/ABL*, cromossomo Ph, FISH

Footnotes:

Apoio Financeiro: BAP/FAMERP e CNPq

Correspondência ao autor: Cristina B. Vendrame-Goloni, Hemocentro-Laboratório de Genética. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 – Bairro Universitário – CEP 15090-000 – Fone (017) 3201-5000, R. 1931 - E-mail: cristina.benitez@ig.com.br



Resumo

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph). Este cromossomo é resultante de uma translocação $t(9;22)(q34;q11)$ que justapõe os genes *BCR* e *ABL*. A detecção do cromossomo Ph e/ou do rearranjo *BCR/ABL*, uma vez que este último é submicroscópico em alguns casos, é fundamental, pois não somente contribui para transformação leucêmica, mas também interfere no sucesso do tratamento. Sua detecção é, portanto, fundamental para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica. Este trabalho teve como objetivos estudar a frequência do cromossomo Ph ou rearranjo *BCR/ABL* nas células da medula óssea de pacientes portadores de LMC ao diagnóstico, com uso das técnicas de bandamento GTG e FISH, e comparar os resultados obtidos com as duas técnicas. O cromossomo Ph e o rearranjo foram observados em 100% dos casos analisados nas diferentes técnicas. Em alguns casos a frequência do cromossomo Ph, detectado por GTG foi maior do que a do rearranjo molecular *BCR/ABL* detectada por FISH. A técnica de FISH também identificou alterações inespecíficas envolvendo os genes *BCR* e/ou *ABL*. Ambas as técnicas foram fundamentais para os resultados obtidos e, portanto, devem ser usadas como complementares na análise de células da medula óssea de pacientes com LMC ao diagnóstico.

Analysis of the *BCR/ABL* Rearrangement by GTG Banding and FISH: A

Comparison of the Frequencies at Diagnosis of CML

Key words: chronic myeloid leukemia, *BCR/ABL*, Ph chromosome, FISH

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease characterized by the presence of the Philadelphia (Ph) chromosome. This chromosome results from a t(9;22)(q34;q11) translocation that juxtaposes the *BCR* and *ABL* genes. Detection of the Ph chromosome or of the *BCR/ABL* rearrangement, as the latter is submicroscopical in some cases, is fundamental, as they not only contribute to the leukemic transformation, but also interfere in the success of treatment. Their detection is thus, essential for diagnosis, prognosis and therapy. This work aimed at studying the frequency of the Ph chromosome or the *BCR/ABL* rearrangement in the bone marrow cells at diagnosis of CML using the GTG banding and FISH techniques, and comparing the results obtained by the two techniques. The Ph chromosome and the rearrangement were observed in 100% of the cases analyzed in the different techniques. The frequency in some cases was higher for the Ph chromosome than for the rearrangement. Using FISH, unspecific alterations involving the *BCR* and *ABL* genes were also identified. Both the techniques were essential for the results obtained and, therefore, should be used as complementary examinations in the analysis of bone marrow cells in patients suffering from CML at diagnosis.

Introdução

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) nas *stem cells* pluripotentes anormais da medula óssea dos pacientes. Este cromossomo é resultante de uma translocação $t(9;22)(q34;q11)$, que origina um derivado do cromossomo 9 ($9q^+$) e um pequeno cromossomo 22 ($22q^-$), conhecido como cromossomo Ph. Este abriga a fusão gênica *BCR/ABL* que codifica uma proteína quimérica BCR/ABL com uma atividade tirosina quinase desregulada, cuja expressão, tem se mostrado ser necessária e suficiente para o fenótipo transformado das células. A LMC se difere dos outros cânceres humanos, pois um único produto do oncogene tem sido identificado como responsável pelo aparecimento da patologia (MELO *et al.*, 2003; KOLDEHOFF *et al.*, 2004). BCR/ABL ativa várias vias de transdução de sinal, incluindo aquelas relacionadas ao STAT5 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 5), Ras/Raf/MEK (mitogen-activated protein kinase kinase)/ERK (extracellular signal regulating kinase) and P13K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt, que juntas favorecem as células afetadas com vantagem proliferativa e de sobrevivência. BCR/ABL também confere resistência a danos no DNA ativado por várias drogas quimioterápicas e radiação. BCR/ABL nas células malignas pode aumentar a expressão de proteínas antiapoptóticas como STAT5, BCL-XL e AL, ou das que promovem alterações pós-transcricionais, como PI-3K/AKT e Bad (DAI *et al.*, 2004).

A translocação clássica é detectada em 90-95% dos pacientes com LMC estudados por métodos de citogenética convencional (bandamento GTG). Nos 5-10% dos casos restantes, translocações variantes ou rearranjos críticos estão presentes e são necessárias outras técnicas para identificar a presença da fusão gênica BCR/ABL,

diferentes RNAm transcritos da fusão, ou outras proteínas quiméricas (AOUN *et al.*, 2004). Uma das técnicas muito utilizada é a de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH), que quando emprega sonda de fusão dupla, é capaz de detectar o rearranjo em cerca de 100% dos casos (DRUMMOND *et al.* 2004).

A LMC atípica (cromossomo Ph negativo) ocorre raramente e, na maioria dos casos, suas características iniciais e curso clínico são similares aos de pacientes Ph positivos. Contudo, a LMC atípica inclui um grupo heterogêneo de pacientes. Em alguns a doença evolui mais agressiva e há um mau prognóstico (KOLDEHOFF *et al.*, 2004).

A detecção de BCR/ABL é fundamental, pois este rearranjo não somente contribui para a transformação leucêmica, como interfere no sucesso do tratamento. Sua detecção é, portanto, fundamental para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

O presente trabalho teve como objetivos estudar a frequência do cromossomo Ph ou rearranjo BCR/ABL nas células da medula óssea de pacientes portadores de LMC ao diagnóstico, com uso das técnicas de bandamento GTG e FISH e comparar os resultados obtidos com as duas técnicas.

Material e Métodos

Células aspiradas de medula óssea foram obtidas de 25 pacientes com LMC ao diagnóstico, ainda não submetidos a tratamento químico ou radioterápico. As células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura RPMI1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino. Parte do material foi submetido à técnica de bandamento GTG e a outra parte submetida à técnica de FISH. A sonda utilizada foi de marcação dupla para os genes BCR e ABL (LSI/BCR labeled in SpectrumGreen and LSI/ABL labeled in SpectrumOrange, Vysis). Os protocolos para hibridação e detecção seguiram os descritos por ESTÉCIO e col. (2002) e instruções do fabricante. A análise do material

submetido à técnica de bandamento GTG foi realizada em cerca de 20 metáfases. Para a técnica de FISH pelo menos 300 núcleos foram analisados por paciente. Os resultados foram descritos de acordo com o International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). Como controles foram utilizadas células de cultura de linfócitos de indivíduos normais e nenhum apresentou os dois sinais fundidos. Foram considerados positivos os casos com freqüências do rearranjo *BCR/ABL* superiores a 0,5% (AOUN *et al.*, 2004).

Resultados

A Tabela 1 apresenta os dados relativos ao sexo, idade, fase da doença, as freqüências relativas do cromossomo Ph observado na análise citogenética por bandamento GTG, as freqüências do rearranjo *BCR/ABL* e de outras alterações detectadas pela técnica de FISH, de cada caso.

O cromossomo Ph foi observado em 100% dos casos estudados por citogenética convencional. Em oito pacientes a investigação citogenética por bandamento GTG não foi possível, em decorrência da ausência de metáfases ou por estas não apresentarem condições de análise.

Nenhum caso apresentou alterações cromossômicas clonais, da da t(9;22).

O caso H230, porém, apresentou o cromossomo Ph em todas as células e apenas uma das 20 metáfases analisadas com a perda do derivado do cromossomo 9 translocado, um evento considerado inicialmente como não clonal. Quando analisado por FISH, a maioria (88,5%) dos núcleos exibia apenas uma fusão e os dois sinais normais, caracterizando a perda de um dos cromossomos derivados (provavelmente o 9), como clonal e sugestiva de evolução clonal da doença.

Na análise por FISH, todos os outros casos também mostraram o rearranjo típico envolvendo *BCR* e *ABL*, caracterizado por dois sinais fundidos, um sinal verde e um sinal vermelho (Figura 1) em frequências que variavam de 0,5 a 99%.

A detecção por FISH de alterações atípicas adicionais foi observada em 32% dos pacientes (H230, H241, H251, H252, H267, H272, H298 e H361). Com exceção do caso H267, os demais apresentaram frequências destas alterações muito mais altas do que as do rearranjo *BCR/ABL*. Tal caso apresentou inclusive cromossomo Ph em 1% das células analisadas. A Tabela 2 mostra tais alterações observadas por FISH em núcleos considerados não poliplóides por não apresentar alterações de tamanho ou sinais fluorescentes indicativos de cópias extras de todos os cromossomos passíveis de análise.

Discussão

A detecção do rearranjo *BCR/ABL* ou do cromossomo Ph, que em alguns casos são a mesma coisa e em outros não, é importante para o diagnóstico diferencial e prognóstico da LMC (KOLDEHOFF *et al.*, 2004). Tais alterações foram observadas por bandamento GTG e FISH, mesmo em frequências diferentes, em todos os casos aqui estudados, o que possibilitou a conclusão do diagnóstico hematológico e a sugestão de um bom prognóstico para os pacientes (KOLDEHOFF *et al.*, 2004).

Neste trabalho foram utilizadas duas, contudo, são diversas as estratégias de análise genética das células leucêmicas e estas incluem além do bandamento GTG e da técnica de FISH, a técnica de RT-PCR e de PCR real-time (RAANANI *et al.*, 2004).

A análise em bandamento GTG, embora mais demorada e dependente da obtenção de metáfases em boas condições, tem uma importância fundamental na detecção de alterações adicionais ao cromossomo Ph ou variantes deste e, conseqüentemente, na investigação da evolução clonal da doença (CORTES *et al.*, 2003).

conseqüentemente, na investigação da evolução clonal da doença (CORTES *et al.*, 2003). Neste estudo, realizado em pacientes ao diagnóstico, apenas um deles (H230) apresentou uma alteração atípica observada em apenas uma metáfase como a perda não clonal do derivado do cromossomo 9. Pela técnica de FISH a alteração foi confirmada como clonal e caracterizada pela presença de apenas um sinal fundido e dois sinais normais, sugerindo a perda de um dos derivados da translocação t(9;22). Se a técnica de FISH não fosse realizada, a clonalidade e evolução clonal não seriam detectadas e o paciente seria muito prejudicado.

Realmente, a técnica de FISH possui vantagens em relação ao bandamento GTG, que incluem maior sensibilidade, total especificidade, uso de células interfásicas, número maior de células analisadas e capacidade de detectar rearranjos submicroscópicos. No entanto, a técnica de FISH tem sempre um alvo específico relacionado com que sondas foram utilizadas e não permite a detecção de outras alterações (USMAN *et al.*, 2004).

A porcentagem de células com o rearranjo *BCR/ABL* observadas por FISH ao diagnóstico variou de 0,5 to 99% ($\bar{x} = 54,5$). Outros autores tem descrito níveis de 30 a 98%, 66 a 98% e mais freqüentemente de 77 a 88% (CHAUFFAILLE *et al.*, 2001). Deve ser considerado, no entanto, que muitas freqüências descritas envolveram o uso de sondas de marcação simples que resultam em freqüências aumentadas de células falso positivas para a fusão, ao contrário das sondas de marcação dupla, como aqui utilizadas, com as quais esta possibilidade chega a ser nula (DEWALD *et al.*, 1998; USMAN *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos aqui estudados, a freqüência de células com Ph foi maior que a freqüência de núcleos detectados com o rearranjo *BCR/ABL* e, estes casos mostram, portanto, a existência de células hematopoéticas residuais normais e clones de células Ph

obviamente esperadas pela análise em bandamento GTG pelo fato desta ser realizada apenas em células metafásicas. Como as culturas não recebem estímulo mitogênico, as células que freqüentemente se dividem mais são as malignas, pelo próprio estímulo anormal para crescimento que possuem. Assim, esta técnica, ao diagnóstico, é fundamental para investigar a presença ou ausência de alterações, mas não a freqüência real na medula óssea *in vivo*, o que é possibilitado pela técnica de FISH, pelas razões já referidas anteriormente.

A freqüência do rearranjo *BCR/ABL* foi alta na maioria dos casos estudados, mas em 32% deles tais freqüências foram baixas e o rearranjo foi observado em associação com outros rearranjos incomuns envolvendo o oncogene *ABL* e o gene *BCR* detectados com freqüências altas na maioria deles. Com exceção do caso H267, cuja alteração era um rearranjo *BCR/ABL* extra, tais alterações atípicas, não puderam ser esclarecidas, pois não foram observadas em bandamento GTG, mas foram indicativas de evolução clonal da doença e de mau prognóstico, indicativos do uso de medidas terapêuticas mais agressivas (O'DWYER *et al.*, 2004).

Estudos recentes descrevem que 15% dos casos de LMC apresentam uma deleção no der(9), que ocorre no momento inicial da formação do cromossomo Ph, 76% destes casos apresentam deleções distais no *BCR* e proximais no *ABL*. Os pacientes com tais deleções têm sido relacionados com prognóstico pior quando tratados com quimioterapia convencional, embora quando tratados com imatinibe tanto os que apresentam a deleção ou aqueles que não apresentam, respondem de maneira igualmente favorável (HAIGH & CUTHBERT, 2004). Existem dois mecanismos que explicam como um rearranjo *BCR/ABL* atípico pode surgir. Um é que pode ocorrer uma inserção não recíproca entre os cromossomos 9 e 22, resultando na fusão gênica. A inserção pode ocorrer dentro de

qualquer cromossomo, embora a fusão gênica esteja situada mais freqüentemente (75%) em seu local habitual que é no 22q11, do que no derivado do cromossomo 9 (25%). O outro mecanismo, mais complexo, envolve duas translocações seqüenciais. Primeiro ocorre a translocação (9;22)(q34;q11) que origina o Ph. Esta é seguida por uma segunda translocação recíproca envolvendo outros pontos de quebra que reconstitui o padrão cromossômico normal e, neste caso, o gene quimérico pode estar nos pontos habituais ou nos recíprocos dependendo se a segunda quebra ocorreu distal ou proximal aos genes alterados, respectivamente (HAIGH & CUTHBERT, 2004).

HAIGH & CUTHBERT (2004) descreveram quatro casos de LMC com rearranjos *BCR/ABL* crípticos (atípicos): microinserção de BCR no ABL (resultando, em FISH, em FRGG); microinserção de ABL no BCR (FRRG); rearranjo complexo incluindo deleção de seqüências adjacentes flanqueadas (FRRG) e rearranjos mais complexos envolvendo o cromossomo 1 (FRRG). Nesses casos os autores utilizaram também a sonda ASS probe para detectar deleções de seqüências flanqueadas, que estão relacionadas a mau prognóstico. Portanto, uma única fusão pode estar relacionada a diferentes deleções no derivado do cromossomo 9 (ROBINSON *et al.*, 2005), o que poderia explicar a freqüência elevada de fusão única em sete dos pacientes.

A presença de fusão extra geralmente está relacionada a um segundo cromossomo Ph (ROBINSON *et al.*, 2005), o que foi observado em um caso deste estudo (casos H267), e que também está relacionado com um mau prognóstico.

Os resultados obtidos permitiram concluir que as técnicas de bandamento GTG e FISH são fundamentais e complementares para o diagnóstico e prognóstico da LMC. Contudo, como não esclarecem todos os eventos citogenéticos detectados na LMC devem também, sempre que possível, serem associadas, com técnicas moleculares.

Tabela 1. Sexo, idade em anos, frequência de metáfases submetidas ao bandamento GTG com a translocação t(9;22)(q34;q22), frequência de núcleos com o rearranjo *BCR/ABL* e frequência de núcleos com outras alterações envolvendo *BCR* e/ou *ABL*, detectados por FISH

Caso	Sexo	Idade	GTG Frequência de metáfases com Ph (%)	FISH núcleos com <i>BCR/ABL</i> (%)	FISH núcleos com alterações adicionais (%)
H51	M	44	100	84	—
H52	M	18	100	42	—
H90	M	55	100	97	—
H134	F	13	95	77	—
H152	M	42	100	96	—
H172	F	69	100	98	—
H190	F	26	100	31	—
H192	M	30	100	51,5	—
H203	M	40	100	79,5	—
H205	F	45	NP	78	—
H228	M	64	17	68	—
H230	M	49	100	0,5	88,5
H241	M	29	17	3	72
H246	F	36	NP	24	—
H250	F	48	22	76	—
H251	F	26	100	2	83,5
H252	M	52	NP	1	92,5
H265	M	48	NP	99	—
H267	M	16	NP	91	1
H272	M	26	NP	1,5	54,5
H286	M	58	67	75	—
H298	M	77	NP	4,5	69
H335	M	54	NP	81	—
H339	M	69	100	98	—
H361	F	60	17	4,5	41

M = masculino; F = feminino; C = fase crônica; NP = análise não foi possível.

Tabela 2. Descrição e frequência das alterações atípicas observadas.

Caso	Alterações atípicas	%
H230	FRG	88,5
H241	FRGG	72
H251	FRGG	69,5
	FRG	12
	FFG	2
H252	FRGG	67
	FRG	24
	FFG	1,5
H267	FFFRG	1
H272	FRG	54,5
H298	F/ganhos/perdas variáveis de R ou G	69
H361	FRRGGG	37
	FFRRGG	2
	FFRRGGG	2

F = fusão; R = vermelho (gene *ABL*); G = verde (gene *BCR*)

Figura 1. Núcleos celulares hibridados com a sonda LSI bcr/abl dual fusion apresentando núcleos normais (seta branca) e com rastreamento *BCR/ABL* (seta amarela).

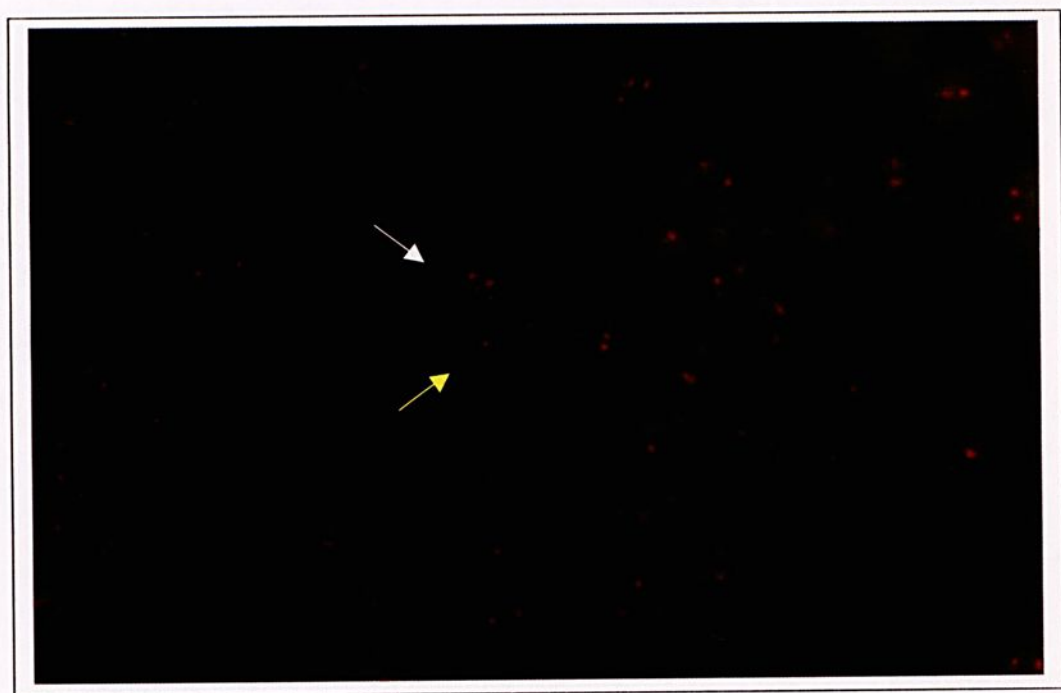


Figura 1. Núcleos celulares hibridados com a sonda LSI bcr/abl dual fusion apresentando núcleos normais (seta branca) e com rearranjo *BCR/ABL* (seta amarela).

Referências

Amare PS, Baisane C, Saikia T, Nair R, Gawade H, Advani S. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;131(2):125-34.

Aoun P, Wiggins M, Pickering D, Foran J, Rasheed H, Pavletic Sz, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154(2):138-43.

Chauffaille MLLF, Oliveira JSR, Romeo M, Kerbaux J. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Sao Paulo Med J* 2001;119(1):16-18.

Cortes Je, Talpaz M, Giles F, O'brien S, Rios Mb. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003;101(10):3794-800.

Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *J Biol Chem* 2004;279(33):34227-39.

Dewald Gw, Wyatt Wa, Juneau Al, Carlson Ro, Zinsmeister Ar, Jalal Sm, et al. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; 9:3357-65.

Drummond Mw, Allan Ek, Pearce A, Holyoake, TL. Fluorescence in situ hybridization for *BCR/ABL*. *Methods Mol Med* 2004; 97:103-16.

Estécio, M.R.H.; Fett-Conte, A. C.; Varella-Garcia, M.; Fridman, C.C.; Silva A.E. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 2002;32:35-42.

Haigh, S.; Cuthbert, G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155(2):132-137.

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. MITELMAN, F. ed. Karger, Basel, 114p., 1995.

Koldehoff M, Beelen Dw, Trenchel L, Steckel Nk, Peceny R, Ditschkowski M, et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34:1047-50.

Melo JV, Hughes TH, Apperley JF. Chronic Myeloid Leukemia. *Hematology* 2003;132-52.

O'dwyer Me, Mauro Mj, Blasdel C, Farnsworth M, Kurilik G, Hsieh Yc, et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood* 2004;103:451-5.

Raanani P, Ben-Bassat I, Gan S, Trakhtenbrot L, Mark Z, Ashur-Fabian O, et al. Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients--comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods. *Eur J Haematol* 2004; 73(4):243-50.

Robinson Hm, Martineau M, Harris Rl, Barber Ke, Jalali Gr, Moorman Av, et al. Derivative chromosome 9 deletions are a significant feature of childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Lekemia*, 2005; 19(4):564-71.

Usman M, Kakepoto Gn, Adil Sn, Sajid R, Arain S, Khurshid M. Hematologic and cytogenetic findings in eleven chronic myelogenous leukemia patients treated with imatinib mesylate at a tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc* 2004; 54: 17-20.

Capítulo IV

Artigo original para publicação em revista de indexação científica

Capítulo IV

Artigo original para submissão ao periódico São Paulo Medical Journal

Artigo original para submissão ao periódico São Paulo Medical Journal

ABSTRACT

Frequency of the Genic BCR/ABL Rearrangements Detected by FISH, Disease-Free Survival Rates and Mortality Rates in CML after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Cristina Benitez Vendrame-Goloni¹, Andréa Borduchi Carvalho-Salles², Milton Arthur Ruiz³, Octávio Ricci Júnior², Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1. Department of Biology, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
2. Blood Bank, Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
3. Bone Marrow Transplant Unit (FUNFARME), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
4. Department of Molecular Biology, Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Footnotes:

This work was supported by BAP/FAMERP and CNPq

Corresponding author: Cristina B. Vendrame-Goloni, Hemocentro-Laboratório de Genética. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 – Bairro Universitário – CEP 15090-000 – Phone (017) 3201-5000, R. 1931 - E-mail: cristina.benitez@ig.com.br



ABSTRACT

CONTEXT: The identification of the efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) used in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) is fundamental to predict prognosis including survival of patients.

OBJETIVE: To investigate the time from HSCT until complete cytogenetic remission detected by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), the disease-free survival rate and the transplant-related mortality rate in CML after HSCT.

TYPE OF STUDY: Monitoring bone marrow transplantation in CML.

SETTING: Hematology and Hemotherapy Services and the Bone Marrow Transplant Unit of the Medical School in São José do Rio Preto, SP.

SAMPLE: 24 patients with chronic myelogenous leukemia studied over variable time periods after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation.

DIAGNOSTIC TEST: Fluorescence in situ hybridization performed with DNA dual-color, dual-fusion probes for the *BCR-ABL* rearrangement.

MAIN MEASUREMENT: Disease after transplantation

RESULTS: Among the patients studied, 19 (79.2%) achieved complete cytogenetic

remission (CCR) in from one to 52 months after the procedure, with a mean time of 9.7 months. Nine (37.5%) patients presented with CCR within 60 days after HSCT, a period indicative of a better prognosis.

The overall survival rate was 70.8%. The disease-free survival varied between eleven and 72 months, with a mean of 27.9 months.

The transplant-related mortality rate was 29.2%.

Four patients (16.7%) died even after achieving CCR in between two and four months after the procedure, all due to infections.

Five patients (20.8%) did not achieve CCR. Three died, one due to a stroke because of the involvement of the central nervous system by the disease and two due to infections, one after initiation of imatinib therapy.

Two others did not present with negative events after HSCT.

Follow-up was from one to 52 months (median = 12.4 months).

CONCLUSION: The results agree with results obtained by other authors and demonstrate the high efficacy of HSCT in chronic myelogenous leukemia. Transplantation promotes long term remission, the maintenance of which does not require therapy in 66.7% patients. Additionally, this study highlights the importance of the FISH technique in the follow-up of patients.

KEY WORDS: chronic myelogenous leukemia, *BCR/ABL*, stem cell transplantation, cytogenetic remission, FISH

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant disorder of an early hematopoietic progenitor cell that is genetically characterized by the presence of a *BCR/ABL* fusion (HAIGH & CUTHBERT, 2004). In the majority of cases, the fusion arises from a reciprocal translocation between the *ABL* locus on 9q34 and the *BCR* locus on 22q11.2, resulting in the classical Philadelphia (Ph) chromosome. CML is clinically characterized by an initial chronic phase followed by accelerated and blast crisis phases that are frequently resistant to treatment (AOUN *et al.*, 2004).

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the treatment modality that provides a potential cure for CML, but relapses after this procedure are still an ongoing problem (SOYDAN *et al.*, 2005). The rate of relapses is very low for patients allografted in the chronic phase (CP) with unmanipulated cells, but the rate is much higher when donor marrow cells are T-cell depleted (OLAVARRIA *et al.*, 2003). Relapse rates after HSCT vary from 20% to 50%, depending on T-cell depletion of the graft (POSTHUMA *et al.*, 2004).

The goal of the procedure is to replace autologous hematopoiesis with stem cells harvested from the donor. However, autologous cells (host cells) can be detected in peripheral blood or bone marrow of some patients after HSCT. The clinical significance of this phenomenon, called mixed chimerism or persistence of residual (host) hematopoiesis, remains controversial. Increased mixed chimerism may be associated with a high risk of relapse or rejection and a decrease in the number of host cells may indicate a low risk of recurrence. The consequence of the stable presence of a low-level autologous signal is still unclear. Conflicting data results in different therapeutic approaches (TURKIEWICZ *et al.*, 2003; WICKENHAUSER *et al.*, 2002).

The main aim of post-transplantation monitoring is to predict negative events, such as disease relapse, graft rejection and graft-versus-host disease, in order to use the appropriate therapy. In this context, cytogenetics is important in monitoring post-HSCT outcomes to detect positive Ph clones (KHAN *et al.*, 2004). Cytogenetic remission is mainly evaluated to define engraftment and relapse and is a prerequisite in both myeloablative and non-myeloablative HSCT, in order to assess the graft status and decide future therapeutic strategies (AU *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2004). Approaches to treat patients in relapse after allografting include alpha-Interferon, chemotherapy, a second HSCT and immunomodulation with donor lymphocyte infusions (OLAVARRIA *et al.*, 2003), as well as the most recent procedure of using imatinib, a tyrosine kinase inhibitor that blocks progenitor cell proliferation (SOYDAN *et al.*, 2005).

This work aimed at investigating the time from HSCT until complete cytogenetic remission as detected by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), the disease-free survival rate and the rate of transplant-related mortality in CML after allogeneic HSCT.

Materials and Methods

Bone marrow samples of 24 patients with CML who presented a *BCR/ABL* rearrangement at diagnosis, were collected one, two, three, four, six, twelve and 24 months after allogeneic myeloablative HSCT and at other additional intervals according to the medical indication of each case. Bone marrow cells were added to a 24-hour non-stimulated culture in RPMI1640 medium with 20% fetal cow serum. FISH assays were performed with the DNA dual-color, dual fusion probes for *BCR/ABL* (LSI/*BCR* labeled in SpectrumGreen and LSI/*ABL* labeled in SpectrumOrange, Vysis). The protocols for hybridization and detection were made according to those described by ESTÉCIO *et al.*

(2002) and the manufacturer's instructions. At least 800 cells were analyzing per patient in each examination and the data were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). Lymphocytes from healthy individuals were used as controls in each assay.

Complete cytogenetic remission was defined as the absence of *BCR/ABL* rearrangements evidenced by FISH. Disease-free survival was considered for the post-HSCT period of patients in hematologic and cytogenetic remission.

Results

Table 1 presents the time from bone marrow transplantation until complete cytogenetic remission (CCR), the disease-free survival rate and events after HSCT.

Among the patients studied, 19 (79.2%) achieved complete cytogenetic remission between one and 52 months after the procedure, with a mean time of 9.7 months. Nine patients (37.5%) presented with CCR up to 60 days after the HSCT, a time indicative of a better prognosis.

The overall survival rate was 70.8%. The frequencies of survival were calculated using the Kaplan-Meier method (Figure 1).

The disease-free survival was 58.3% and varied from 11 to 72 months, with a mean of 27.9 months.

The transplantation-related mortality rate was 29.2%.

Four patients (16.7%) died even after achieving CCR in between two and four months after the procedure, all due to infections.

Five patients (20.8%) did not achieve CCR. Three of whom died, one patient relapse because the disease affected the central nervous system and two patients died due

died due to infections, one after the introduction of imatinib mesylate. The other two patients did not present with post-HSCT events.

The follow up was from one to 52 months (median = 12.4 months).

Discussion

The success of the HSCT depends on, to a great extent, the cytogenetic following up of the patient, which influences the therapeutic conduct. Patients who present the BCR/ABL rearrangement in progressively higher frequencies after the procedure are at greater risk of relapse and are candidates for additional and more aggressive therapies. However, patients with stable or decreasing frequencies seem to have immunologic mechanisms which suppress the malignant clone, or perhaps this clone may lose its proliferative capacity resulting in a lower risk of relapse (OPGCSA *et al.*, 2003).

From the patients included in this study 79.2% achieved CCR, 37.5% of whom within the first two months after HSCT. The CCR rates described varied from 56% to 94.4%. However, these results were expected (VINOGRADOVA *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2005).

KEBRIAEL *et al.* (2004) described a patient in which the cytogenetic analysis revealed complete remission from CML with 100% donor engraftment 30 days after transplantation. Cases which achieve CCR earlier have a better prognosis (IMPARATO *et al.*, 1998). Although considered a good prognosis, three of the patients in this series died. Two of them died even after being submitted to other therapeutic measures such as a second transplantation and the use of imatinib mesylate.

Patients in relapse after allogeneic HSCT have few therapeutic options. Among the cases included in this study that relapsed, one patient took imatinib mesylate and

responded very well to the drug and the other not. The effect of imatinib on relapse after HSCT has been investigated in a few studies but this option seems to have a significant effect against CML in these circumstances (FUJISAWA *et al.*, 2003; GOPCSA *et al.*, 2003). SOYDAN *et al.* (2005) concluded that imatinib treatment for molecular relapse after HSCT has an acceptable adverse event profile and provides a molecular remission rate of over 60% but this response is not lasting and 25% of the patients have a second relapse early after cessation of the drug.

The transplantation-related mortality rate in this study was 29.2%. In the majority of these cases (85.7%), the death occurred due to infections, complications considered relatively common after HSCT and described in from 38.6% to 59.6% of patients (LIU *et al.*, 2004; YOO-JIN *et al.*, 2004; RUIZ-ARGÜLLES *et al.*, 2002; PETZER & GUNSILIUS, 2003).

In two of the cases in this study death occurred after 10 and 31 months of disease-free survival. The transplant-related mortality rates described in the literature for a period of approximately two years after HSCT are very variable. The mortality rate reported by LIU *et al.* (2004) was 16.7%; the rate experienced by LIUBIMOVA *et al.* (2004) was 14%; DE SOUZA *et al.* (2005) reported a rate of 45%; and VALCARCEL *et al.* (2005) published a rate of 30%. BURROUGHS & STORB (2005) described a mortality rate not related to relapse of from 15% to 55%.

Conclusion

The results agree with those published by other authors and demonstrate the high efficacy of HSCT in chronic myelogenous leukemia, as well as the importance of the FISH technique in the follow-up of transplanted patients.



Acknowledgements

The authors wish to thank David A. Hewitt for the English version of this manuscript.

Case	CR	CR	Post-transplant
	(MONTHS)	(MONTHS)	Event
H123	52	72	N
H150	34	57	N
H164	36	76	relapse → transplant → N
H178	35	47	N
H126	—	—	death → (N=40)
H134	4	21	N
H141	4	31	death (I)
H159	2	39	N
H173	2	9	relapse → 2 nd HSCT → death (I)
H180	13	25	N
H181	1	28	N
H186	1	27	N
H194	2	3	death (I)
H204	1	12	N
H212	3	23	N
H232	2	18	relapse → death (I)
H240	—	—	relapse → posttransplant → bone marrow aplasia → death (I)
H247	6	11	N
H272	3	18	N
H279	—	—	N
H292	1	11	N
H306	6	12	N
H317	—	—	N
H362	—	—	relapse → death (I)

I = infectious; N = no event; patients died; relapse = did not achieve remission

Table 1: Time (months) after HSCT to achieve complete cytogenetic remission (CCR), disease-free survival (DFS) and events observed post-HSCT

Case	CCR (MONTHS)	DFS (MONTHS)	Post-transplant Events
H23	52	72	N
H50	34	57	N
H64	24	36	relapse → imatinib → N
H78	15	42	N
H126	—	—	death → (stroke)
H134	4	31	N
H151	4	31	death (I)
H155	2	29	N
H173	2	5	relapse → 2 nd BMT → death (I)
H180	19	25	N
H181	1	28	N
H186	1	27	N
H194	2	3	death (I)
H204	1	12	N
H212	2	23	N
H237	2	10	relapse → death (I)
H263	—	—	relapse → imatinib → bone marrow aplasia → death (I)
H267	6	11	N
H272	3	10	N
H275	—	—	N
H282	1	11	N
H306	9	12	N
H307	—	—	N
H362	—	—	relapse → death (I)

I = infections; N = no event, patient in follow-up; — = did not achieve remission

-
- | Time (months) | Survival Frequency (%) - Solid Line | Survival Frequency (%) - Dashed Line |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 100 | 100 |
| 3 | 95 | 86 |
| 5 | 91 | 80 |
| 7 | 86 | 73 |
| 9 | 82 | 68 |
| 10 | 74 | 56 |
| 14 | 74 | 48 |

Reference

Aoun P, Wiggins M, Pickering D, Foran J, Rasheed H, Pavletic Sz, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154(2):138-43.

Au WY, Ma SK, Kwong YL. The occurrence of Philadelphia chromosome (Ph) negative leukemia after hematopoietic stem cell transplantation for Ph positive chronic myeloid leukemia: implications for disease monitoring and treatment. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44(7): 1121-29.

Burroughs L, Storb R. Low-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancies: separating graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 2005;12(1):45-54.

De Souza CA, Vigorito AC, Ruiz MA, Nucci M, Dulley FL, Funcke V, et al. Validation of the EBMT risk score in chronic myeloid leukemia in Brazil and allogeneic transplant outcome. *Haematologica* 2005;90(2):232-7.

Estécio MRH, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman CC, Silva AE. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 2002;32:35-42.

Fujisawa S, Yano K, Kobayashi M. A case of chronic myelogenous leukemia responding to imatinib mesilate (Glivec) after relapse of blastic crisis following allogeneic bone marrow transplantation. *Gan To Kagaku Ryoho* 2003;30(3):427-30.

Gopcsa L, Barta A, Bányai A, Dolgos J, Halm G, Pálóczi K. Salvage chemotherapy with donor lymphocyte infusion STI571 in a patient relapsing with B-lymphoblastic phase chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Pathology Oncology Research* 2003;9(2):131-3.

Haigh S, Cuthbert G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic *BCR/ABL* rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 155(2):132-7.

Imparato FP, Menezes CL, Anelli A, Oliveira RM, Caballero OL, Simpson AJG. Co-evolução da terapêutica e do diagnóstico molecular da leucemia mielóide crônica. *Act Oncol Br* 1998; 19(1):259-6.

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman, F. ed. Karger, Basel, 114p, 1995.

Kebriaei P, Winter JN, Laport GG, Le Beau MM, Dewald G, Larson RA. Multiple unrelated clonal abnormalities in host bone marrow cells after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2004;28(5):537-40.

Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance Of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004;34 (1):1-12.

Liu DH, Huang XJ, Guo NL, Xu LP, Chen H, Han W. Analysis of pathogenesis of pneumonia post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005; 37(2):130-5.

Liu QF, Sun J, Zhang Y, Liu XL, Xu D, Xu B, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia. *Ai Zheng* 2004;23(4):426-9.

Liubimova LS, Savchenko VG, Mendeleeva LP, Kuz'mina LA, Anukhina MV, Griбанова EO, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic myeloid leukemias. *Ter Arkh* 2004;76(7):18-24.

Olavarria E, Ottmann OG, Deininger M, Clark RE, Bandini G, Byrne J, et al. Response to imatinib in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2003;17(9):1707-12.

Petzer AL, Gunsilius E, Petzer AL, Gunsilius E. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Arch Med Res* 2003;34(6):496-506.

Posthuma EFM, Marijt EAF, Barge RMY, Van Soest RA, Baas IO, Starrenburg CWJ, et al. Alpha-Interferon with very-low-dose donor lymphocyte infusion for hematologic or cytogenetic relapse of chronic myeloid leukemia induces rapid and durable complete remissions and is associated with acceptable graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(3):204-12.

Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, Lopez-Martinez B, Cantu-Rodriguez OG, Jaime-Perez JC, Gonzalez-Llano O. Results of an allogeneic non-myeloablative stem cell transplantation program in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2002;87(8):894-6.

Soydan E, Civriz S, Becase M, Koc H, Gurman G, Ilhan O, et al. Imatinib only for molecular relapse is not sufficient to achieve a durable complete chimeric status and molecular remission after allo HCT in CML. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(2):25.

Turkiewicz D, Gorczynska E, Toporski J, Kalwak K, Rybka B, Noworolska D, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes. *Leuk Res* 2003; 27(11): 993-8.

Valcarcel D, Martino R, Sureda A, Canals C, Altes A, Briones J, Sanz MA, Parody R, Constans M, Villela SL, Brunet S, Sierra J. Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* 2005;74(2):144-51

Vinogradova OA, Savchenko VG, Domracheva EV, Liubimova LS, Oi'shanskaia IV, Diachenko LV, et al. Molecular cytogenetic monitoring of chimerism and minimal residual disease in patient with chronic myeloid leukemia after allogenic and syngenic bone marrow transplantation. *Ter Arkh* 2002;74(7):38-44.

Wickenhauser C, Thiele J, Perez F, Varus E, Stoffel MS, Kvasnicka HM, et al. Mixed chimerism of the resident macrophage population after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Transplantation*, 2002; 73: 104-11.

Yoo-Jin K, Dong-Wook K, Seok L, Chang-Ki M, Hyun-Gyung G, Su-hyun et al. Early periction of molecular remission by monitoring BCR-ABL transcript levels in patients achieving a complete cytogenetic response after imatinib therapy for posttransplantation chronic myelogenous leukemia relapse. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10(10):718-25.

Capítulo V

Frequency of the BCR/ABL Rearrangements and Associated Abnormalities Detected by FISH During Monitoring of Patients Taking Imatinib Mesylate in Politation

Cláudio Augusto Mendonça Mendes¹, Andreia Gonçalves de Almeida-Silva², Cláudio de Almeida Mendes³, Carlos Eduardo Mendes³, Agnieszka Wójcik-Pawłowska³

1. Department of Clinical Hematology, Instituto de Hematologia e Hematologia, São Paulo, Brazil
2. Hematology Transfusion Service, Instituto de Hematologia e Hematologia, São Paulo, Brazil
3. Department of Molecular Biology, Medical School (FAMM), São Paulo, São Paulo, Brazil

Capítulo V

Keywords: Chronic myelogenous leukemia, Imatinib, FISH

Introduction

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Corresponding author: Cláudio Mendes, *Artigo original para submissão ao periódico Haematologica*

Av. Brigadeiro Faria Lima, 3447 - Jd. Pinheiros, 05424-900, São Paulo, São Paulo, Brazil

E-mail: claudio@usp.br

Phone: +55 (11) 3201-3440 x. 1431 - Fax: +55 (11) 3201-3440

Frequency of the *BCR/ABL* Rearrangements and Associated Alterations Detected by FISH During Monitoring of Patients Taking Imatinib Mesylate in Isolation

Cristina Benitez Vendrame-Goloni¹, Andréa Borduchi Carvalho-Salles², Octávio Ricci Júnior², Carlos Eduardo Miguel², Agnes Cristina Fett-Conte³

1. Department of Biology, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
2. Blood bank (FAMERP/FUNFARME), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
3. Department of Molecular Biology, Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto,
São Paulo, Brazil

Keywords: Chronic myelogenous leukemia, Imatinib, FISH

Footnotes:

This work was supported by BAP/FAMERP and CNPq

Corresponding author: Cristina B. Vendrame-Goloni, Hemocentro-Laboratório de Genética. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 – Bairro Universitário, São José do Rio Preto, SP, Brazil – CEP 15090-000

Phone (+55 17) 3201-5000 R. 1931 - E-mail: cristina.benitez@ig.com.br



Abstract

The introduction of imatinib mesylate as treatment of chronic myelogenous leukemia has saved many patients, but the success of therapy is hampered by resistance and possible non-destruction of the malignant clone. This article describes the cytogenetic responses and abnormal cytogenetic patterns involving the *ABL* and *BCR* genes detected by FISH in patients who use exclusively imatinib. The results showed that other alterations involving the *BCR* and *ABL* genes do not seem to be related to resistance to the drug as they occur in low frequencies and can not be associated to the cytogenetic response or to the time of treatment. Moreover, the response to imatinib seems to be individual and unpredictable, independent of the time of treatment and of its initiation after diagnosis.

Key words: chronic myelogenous leukemia, imatinib, FISH

Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a malignant myeloproliferative disorder originating from a pluripotent hematopoietic stem cell that acquires a Philadelphia (Ph) chromosome encoding the BCR/ABL oncogeneic fusion protein, acting tyrosine kinase, essential for leukemic transformation (LATAGLIATA *et al.*, 2005).

The natural course of the disease is usually characterized by three sequential phases, chronic, accelerated and blast crisis, during which progressive resistance to therapy can be acquired (PETZER & GUNSILIUS, 2003).

Recently the treatment of CML has been revolutionized by the introduction of imatinib mesylate. This is the treatment of choice for the chronic phase of the disease and is used in CML as the first therapeutic option after diagnosis in cases where other treatments failed or in cases where it is not possible to perform bone marrow transplantation (CALABRETTA & PERROTTI, 2004). Imatinib stabilizes an inactive conformation of the BCR-ABL protein and related kinase and suppresses the growth of BCR-ABL expressing CML progenitor cells by the blockade of the ATP-binding site of the kinase domain of the protein (BORTHAKUR & CORTES, 2004; DEININGER *et al.*, 2005; DEWAR *et al.*, 2005).

The success of imatinib is hampered by acquired resistance, which occurs over months to years as a result of the selection of a subclone bearing mutations in the kinase domain (BURGESS *et al.*, 2005).

This outcome confirms the molecular basis for the success of imatinib, but also points to issues that will likely emerge with longer term use (SAUSVILLE, 2003). In some patients clonal cytogenetic aberrations can appear including an escape strategy of leukemic clones from the action of the drug (WONG & WITTE, 2004).



Frequent periodic monitoring of a patient's response to therapy has become an essential component of disease evaluation, allowing possible alterations to drug dose schedules, addition of other agents, or the change to other therapies, including allogeneic bone marrow transplantation (KANTARJIAN *et al.*, 2003).

This article describes the frequencies of *BCR-ABL* (cytogenetic responses) and of abnormal cytogenetic patterns involving *ABL* and *BCR* genes detected by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) in interphasic nuclei of leukemic cells in bone marrow of Brazilian patients with CML exclusively taking imatinib mesylate.

Materials and Methods

Cells aspirated from bone marrow of 28 patients with CML were collected at different intervals of from 5 to 34 months after the beginning of treatment with imatinib, according to doctor's requests. All the patients had the *BCR/ABL* rearrangement detected at diagnosis and were being treated continuously and exclusively with imatinib mesylate. The cells were left for 24 hours in a non-stimulated culture in RPMI1640 medium with 20% fetal cow serum. FISH assays were performed with the DNA dual-color, dual fusion probes for *BCR-ABL* (LSI/BCR labeled in SpectrumGreen and LSI/ABL labeled in SpectrumOrange, Vysis). The protocols for hybridization and detection were made according to ESTÉCIO *et al.* (2002) and the manufacturer's instructions. At least 800 cells were analyzed per patient per test and the data were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). As controls, cells from lymphocyte cultures of healthy individuals were utilized and none presented with the two established signals. Cases with *BCR/ABL* rearrangement frequencies of over 0.5% were considered positive (AOUN *et al.*, 2004). The evaluation of the cytogenetic

response followed the criteria described by TBAKHI (2002): complete, defined as non-detectable Ph+/BCR-ABL+ cells; partial, in which there are 1-34% of Ph+/BCR-ABL+ cells; minor, in which there are 35-94% of Ph+/BCR-ABL+ cells and no response in which more than 95% of Ph+/BCR-ABL+ cells are present in bone marrow. The cases with <35% of Ph+/BCR-ABL+ cells were also considered as major response, defined as the sum of complete and partial responses.

Results

Table 1 shows the relative frequency of the *BCR/ABL* rearrangement and of other alterations observed in each case, in different periods after the beginning of therapy using imatinib. With the exception of case H268 in blast crisis, the others were in the chronic phase of the disease when they started imatinib treatment.

The time of treatment with imatinib and the period from diagnosis until the start of treatment was very heterogeneous in the studied series. This variation made the observation of irregularities in the cytogenetic response to the drug possible reflecting individual and unexpected responses.

For 10 patients, cytogenetic investigations were made more than once and in 8 of them the frequencies obtained after variable periods of treatment were zero, low or progressively reduced, suggesting a good therapeutic response. Two patients presented with progressively higher rearrangement frequencies, suggesting worsening of the disease.

In 8 (28.6%) patients no *BCR/ABL* rearrangement was identified, suggesting complete cytogenetic response. In case H13, even though the patient achieved complete



T. 1417/05

cytogenetic response at eight and nine months after treatment with imatinib, at 20 months the patient presented with 2% of cells with another previously non-detected alteration.

In 15 (53.6%) cases the frequency of the rearrangement was low (1 to 31%) indicating partial cytogenetic response, observed in a period varying from 5 to 34 months of treatment. Seven (25%) patients presented high frequencies of the rearrangement (35% to 94%), that is a minor response, obtained from 7 to 24 months of treatment. Cases H26 and H223 presented with variable cytogenetic responses and were included in the two last categories. However, a major cytogenetic response was observed in 82.2% of the patients.

Six cases (21.4%) showed the *BCR/ABL* rearrangement associated with other alterations, such as additional simple fusions and extra copies of *ABL* or *BCR* in non-polyploid cells not present at diagnosis, suggesting clonal evolution of the disease with involvement of the same genes and chromosomes. Case H13 (3.6%) presented with an extra copy of the *BCR* gene without the presence of the typical rearrangement of the disease. Table 2 shows the types and frequencies of the other alterations found.

Discussion

Imatinib mesylate has given efficient results in all phases of LMC, although the responses are more significant and lasting in patients in the chronic phase (CORBIN *et al.*, 2003). Compared to other treatment methods, cytogenic responses with imatinib occur much more rapidly, in many cases within three and six months of treatment (DEININGER, 2003). In the cases studied here, patients in the chronic phase had varying responses to the drug which were not associated to the time of treatment. The patient in the blast crisis phase did not improve with imatinib.

A shorter interval between CML diagnosis and the initiation of imatinib is predictive of a better molecular response to therapy (ROCHE-LESTIENNE *et al.*, 2005). Eight cases of this study took imatinib shortly after diagnosis (from 2 to 3 months) and four of these (H205, H241, H251 and H252) presented complete cytogenetic responses in at least the first six months of the treatment. However, another three (H228, H250 and H265) achieved partial responses and the other patient (H223) had partial and later minor response at different times of treatment.

Really, it is not clear if the resulting cytogenetic remissions with the use of the drug are lasting or if the mesylate imatinib can eliminate the malignant primitive progenitors from which the disease arises (USUI, 2005).

The origin of CML begins in a hematopoietic stem cell, a target population that is largely quiescent, which either does not express BCR-ABL or is unaffected by the BCR-ABL expression. Quiescent Ph⁺ stem cells are insensitive to mesylate imatinib treatment *in vitro*. This suggests that the Ph⁺ cells may not be eliminated by mesylate imatinib treatment in CML patients. Long-term mesylate imatinib mono-therapy may be required to continually suppress leukemic development but this may lead to the generation and selection of *BCR-ABL* resistant escape mutants (WONG & WITTE, 2004).

Results for the chronic phase of CML obtained during efficacy and safety studies are outstanding, but few data are available about long-term effects (GOZZETTI *et al.*, 2004). Some authors described cytogenetic relapse after the interruption of the treatment with imatinib. MAURO *et al.* (2004) reported two cases of CML in which imatinib therapy, which sustained complete cytogenetic response, was ceased after 14 months and the disease relapsed. USUKI *et al.* (2005) described a case in which complete cytogenetic response was maintained for 24 months with imatinib, followed by cytogenetic relapse

after cessation of imatinib therapy. In the cases studied here, the patients who achieved complete cytogenetic response, sustained for periods varying from 5 to 31 months, were all maintained in therapy exactly because of the possibility of relapse after the interruption of the treatment.

Most patients in the chronic phase maintain lasting responses however, many in blast crisis fail to respond and the evolution of the disease is quick as was observed in this study. When CML progresses to “blast” crisis, cytogenetic changes in addition to the Ph chromosome are often evident as can explain the less efficacious effects of imatinib (SAUSVILLE, 2003).

Patients who do not present cytogenetic responses after six months of therapy are generally defined as having primary resistance to imatinib and are likely to present mutations in *ABL* (AGIRRE *et al.*, 2003). Kinase domain mutations are the most commonly identified mechanism associated with relapse. Many of these mutations decrease the sensitivity of *ABL* kinase to imatinib, thus accounting for resistance to imatinib (CORBIN *et al.*, 2003; DEININGER *et al.*, 2005). This was not evaluated in this study, nor was the presence of other cytogenetic alterations without the involvement of the 9 and 22 chromosomes.

In several cases the appearance of other alterations of clonal chromosomal abnormalities after therapy using imatinib have also been reported, but their incidence, etiology and prognosis remain unclear (TERRE *et al.*, 2004). Our patients who presented with other alterations involving the *BCR* and *ABL* genes do not seem to have developed them as a result of resistance to imatinib as, apart from the alterations occurring in low frequencies, they were not be correlated to the cytogenetic response or to the time of treatment using the drug.

Deletions of der(9) have been recognized in 9% to 15% of patients with CML over recent years. These deletions are usually large, involving several megabases and are thought to occur at the time of the Ph chromosome translocation rather than during disease progression (QUINTAS-CARDAMA *et al.*, 2005). Alterations, as observed in case H14 (one fusion, two red signals and one green signal) have been described as resulting from the microinsertion of *ABL* in the *BCR*, of complex rearrangements including deletion of adjacent flanking sequences and of complex rearrangements involving other chromosomes (HAIGH & CUTHBERT, 2004). However, a single fusion can be related to deletions from derivative chromosome 9 (ROBINSON *et al.*, 2005). The presence or absence of alterations do not change the response to imatinib. The alterations observed in the other cases that presented fusions, a green signal and a red signal could be related to the loss of one of the chromosomes derived from the translocation.

In spite of the Brazilian series being small, the frequencies of the cytogenetic response to imatinib mesylate were equal as previously described by other authors (TURKINA *et al.*, 2003; USUI, 2005). This response to imatinib, which was good in the majority of the cases, seems to be individual and unpredictable, independently of the phase, the initiation and time of treatment using the drug.

Acknowledgements

The authors wish to thank David A. Hewitt for the English version of this manuscript.

Table 1: Relative frequency of the *BCR/ABL* rearrangement and of other alterations observed in each case.

Case	DF	TDT	TTI	<i>BCR-ABL</i> %	Other alterations %
H7	CP	39	10	51.0	7.0
H13	CP	15	8	0	0
			9	0	0
			20	0	2.0
H26	CP	16	7	80.0	0
			17	31.0	0
			24	52.0	0
			34	9.0	0
H58	CP	16	12	1.0	1.5
H79	CP	28	12	0	0
			27	0	0
H112	CP	31	10	0	0
			17	0	0
H118	CP	66	14	66.0	2.0
H137	CP	72	7	89.0	0
H139	CP	43	12	5.0	0
H144	CP	58	15	1.0	10.5
H149	CP	20	11	31.0	0
H160	CP	6	7	4.0	0
H172	CP	4	12	1.0	0
			16	1.0	0
H205	CP	3	6	0	0
			14	0	0
H218	CP	21	15	56.0	0
H223	CP	3	5	4.0	0
			15	60.0	0
H224	CP	41	26	0	0
			31	0	0
H228	CP	3	8	26.0	0
H231	CP	5	16	3.0	0
			27	27.0	0
H241	CP	2	6	0	0
			11	0	0
H250	CP	2	5	3.0	0.5
H251	CP	2	5	0	0
H252	CP	2	6	0	0
H265	CP	2	6	6.0	0
H268	BC	35	15	73.5	0
H291	CP	40	8	23.0	0
H293	CP	48	13	8.0	0
H337	CP	14	12	1.0	0

Phase of disease at the beginning of treatment (DF); time (months) from diagnosis of CML until the start of treatment (TDT); time (months) of treatment with imatinib (TTI), CP= Chronic phase; BC= Blast crisis

Table 2: Description and frequency of other alterations involving the *BCR* and/or *ABL* genes

Case	Alteration	%
H7	FFFRG/FFFFRG	7.0
H13	GGG	2.0
H58	FRG	1.5
H118	FRG	2.0
H144	FRG	6.5
	FRRG	4.0
H250	GGG	0.5

F = fusion, R = red (*ABL* gene), G = green (*BCR* gene)

References

- Agirre X, Fontalba A, Andreu EJ, Otero MD, Larrayoz MJ, Montiel C. Lack of *BCR/ABL* point mutations in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase before imatinib treatment is not predictive of response. *Haematologica* 2003;88(12):1425-6.
- Aoun P, Wiggins M, Pickering D, Foran J, Rasheed H, Pavletic Sz, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154(2):138-43.
- Borthakur G, Cortes JE. Imatinib mesylate in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol* 2004; 79(5):411-19.
- Burgess MR, Skaggs BJ, Shah NP, Lee FY, Sawyers C. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance PNAS – Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(9):3395-400.
- Calabretta B, Perrotti D. The Biology of CML blast crisis. *Blood* 2004;103(11):4010-22.
- Corbin AS, La Rosee P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW. Several BCR-ABL kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003;101(11):4611-14.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105(7):2640-53.
- Deininger MWN. Cytogenetic Studies in Patients on Imatinib. *Sem Hematol* 2003;40(2):50-55.
- Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino AC, Miller BL, Doherty KV, Hughes TP, et al. Macrophage colony stimulating factor receptor, c-fms, is a novel target of imatinib. *Blood*. 2005;105(8):3127-32.
- Estécio MRH, Fett-Conte AC, Varella-Garcia M, Fridman CC, Silva AE. Molecular and cytogenetic analyses on Brazilian youths with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 2002;32:35-42.
- Gozzetti A, Tozzuoli D, Crupi R, Fanelli A, Gentili S, Bocchia M, et al. A novel t(6;7)(p24;q21) in a chronic myelocytic leukemia in complete cytogenetic remission after therapy with imatinib mesylate. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:152-4.
- Haigh S, Cuthbert G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155(2):132-7.
- ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. Mitelman, F. ed. Karger, Basel, 114p., 1995.

Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, O'Brien S, Faderl S, Thomas D. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of *BCR-ABL* during therapy with imatinib mesylate (STI571; Gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2003;9:160-166.

Latagliata R, Breccia M, Carmosino I, Sarlo C, Montefusco E, Mancini M, et al. Elderly patients with Ph⁺ chronic myelogenous leukemia (CML): results of imatinib mesylate treatment. *Leuk Res* 2005;29(3):287-291.

Mauro MJ, Druker BJ, MAZIARZ RT. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk Res* 2004;28:71-3.

Petzer AL, Gunsilius E. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Arch Med Res* 2003;34(6):496-506.

Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2005;105(6): 2281-6.

Robinson HM, Martineau M, Harris RL, Barber KE, Jalali GR, Moorman AV, et al. Derivative chromosome 9 deletions are a significant feature of childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblast leukaemia. *Leukemia* 2005;19(4):564-71.

Roche-Lestienne C, Darré S, Lai JL, Bacón T. Factors predicting molecular and cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Haematologica* 2005;90: 131-3.

Sausville EA. Imatinib for chronic myelogenous leukaemia: a 9 or 24 carat gold standard? *Lancet* 2003;361(9367):1400-1.

Tbakhi A. Qualitative and quantitative detection of residual disease in chronic myelogenous leukaemia. *Histopathology* 2002; 41(2):83-87.

Terre C, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, et al. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2004;18(8):1340-46.

Turkina AG, Khprpshko ND, Druzhkova GA, Zingerman BV, Zakharova ES, Chelysheva EIU, et al. Therapeutic efficacy of imatinib mesylate (glivec) in chronic phase of myeloid leukemia. *Ter Arkh* 2003;75(8):62-7.

Usui N. Imatinib therapy for patients with chronic myelogenous leukemia. *Gan To Kagaku Ryoho* 2005;32(3):397-403.

Usuki K, Tijima K, Iki S, Urabe A. CML cytogenetic relapse after cessation of imatinib therapy. *Leuk Res* 2005;29(2):237-8.

Wong S, Witte ON. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. *Annu. Rev. Immunol* 2004; 22:247-306.



Capítulo VI

Carta ao Editor para submissão ao periódico Arquivos de Ciências da Saúde



Exposição Ocupacional a Agentes Carcinogênicos de Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Cristina Benitez Vendrame-Goloni¹, Octávio Ricci Júnior², Agnes Cristina Fett-Conte³

1. Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP
2. Hemocentro (FUNFARME), São José do Rio Preto, SP
3. Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP - (FAMERP)

Palavras chave: leucemia mielóide crônica, cromossomo Ph, agentes carcinogênicos

Footnotes:

Apoio Financeiro: BAP/FAMERP e CNPq

Correspondência ao autor: Cristina B. Vendrame-Goloni, Hemocentro-Laboratório de Genética. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 – Bairro Universitário – CEP 15090-000 – Fone (017) 3201-5000, R. 1931 - E-mail: cristina.benitez@ig.com.br

Carta ao Editor

Sr. Editor,

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia das células hematopoéticas que é morfológica e citogeneticamente homogênea. Cerca de 95% dos casos apresentam uma translocação específica [t(9;22)(q34;q11)] que resulta na fusão gênica do oncogene *ABL* com o gene *BCR* e na proteína quimérica *BCR/ABL*, responsável pela transformação maligna (AOUN *et al.*, 2004).

Embora a translocação seja conhecida desde a década de 70, os fatores que levam ao seu surgimento não são conhecidos. A etiologia da doença é pouco conhecida. Apenas a radiação ionizante tem sido comprovadamente relacionada ao surgimento da doença, porém, vários agentes carcinogênicos têm sido referidos como possíveis fatores de risco. Entre eles destacam-se o tabaco, o uso pessoal de tintura para cabelos, o benzeno e outros solventes orgânicos, campo eletromagnético, alguns vírus e pesticidas, agentes sabidamente mutagênicos (BJÖRK *et al.* 2001).

Longos tempos de exposição, como por exemplo a exposição ocupacional, poderiam supostamente contribuir para o surgimento da doença.

Em um estudo realizado no Hospital de Base (FAMERP/FUNFARME), em uma casuística de 62 pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, 15 (24,2%) relataram exposição ocupacional a agentes carcinogênicos. Destes, 80% eram lavradores e lidavam com agrotóxicos, 13,3% lidavam profissionalmente com substâncias para tintura de cabelos e 6,7% era pintor e lidava com tinturas e solventes. Nestes casos, tais agentes poderiam ter contribuído com a etiopatogenia da doença.

A maioria dos pacientes estudados, contudo, não apresentou exposição ocupacional relacionada aos fatores de risco conhecidos (Tabela 1). Embora vários agentes sejam responsáveis por danos no DNA que podem levar a carcinogênese, em LMC o que provoca a formação do rearranjo específico *BCR/ABL* ainda é desconhecido, mas é provável que envolva diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos .

Tabela 1. Profissão dos 62 pacientes estudados

Caso	Profissão	Caso	Profissão
H7	faxineira	H194	lavrador
H13	cabeleireira	H203	comerciante
H23	estudante	H204	doméstica
H26	autônomo	H205	escriturária
H50	pedreiro	H212	motorista
H51	metalúrgico	H218	doméstica
H52	lavrador	H224	do lar
H58	do lar	H228	fiscal
H64	lavrador	H230	lavrador
H78	lavrador	H231	do lar
H79	do lar	H237	lavrador
H90	guarda noturno	H241	aviarista
H112	servente	H246	lavradora
H118	do lar	H250	professora
H126	fisioterapeuta	H263	cobrador
H134	estudante	H265	motorista
H137	lavrador	H268	mecânico
H139	do lar	H272	garçon
H144	doméstica	H275	vigia noturno
H149	cozinheira	H282	do lar
H151	do lar	H286	oleiro
H152	pintor	H291	psicólogo
H155	do lar	H293	lavrador
H160	ag. operacional	H298	aposentado
H172	pensionista	H306	do lar
H173	lavrador	H307	orives
H180	lavrador	H335	motorista
H181	porteiro	H337	repres. comercial
H186	aux. escritório	H339	lavrador
H190	aux. enfermagem	H361	cabeleireira
H192	aux. de analista	H362	do lar

Referências

Aoun P, Wiggins M, Pickering D, Foran J, Rasheed H, Pavletic SZ, Sanger W. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia: a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 154(2):138-43.

Bjork J, Albin M, Welinder H, Tinnerberg H, Mauritzson N, Kauppinen T, Stromberg U, Johansson B, Billstrom R, Mikoczy Z, Ahlgren T, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L. Are occupational, hobby, or lifestyle exposures associated with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia? *Occup Environ Med* 2001; 58(11):722-7.



Capítulo VII

Discussão



Discussão

Na leucemia mielóide crônica (LMC), os aspectos relacionados ao gênero não são muito estudados, mas é sabido que há um ligeiro predomínio de pacientes do sexo masculino (BERGER *et al.*, 2005). Nos pacientes aqui estudados, este ligeiro predomínio também foi observado, 57,6% dos casos eram do sexo masculino e 42,4% do sexo feminino.

Os fatores que predisõem para a LMC não são conhecidos, uma vez que a etiologia da doença não está totalmente esclarecida. Vários fatores de risco têm sido referidos, principalmente aqueles relacionados com exposição ocupacional a agentes carcinogênicos. Por exemplo as exposições longas ao benzeno, aos agrotóxicos, tinturas de cabelo, entre outros são citadas mas os estudos não comprovam tal associação (BJÖRK *et al.*, 2001). Nos casos aqui estudados, também o surgimento da doença não pôde ser relacionado com determinada exposição ocupacional. A maioria dos pacientes não tinha história de tempo longo de exposição a agentes tóxicos, mas naqueles que tinham, a participação dos agentes carcinogênicos na etiopatogenia da doença dos seus portadores não pode ser descartada. Assim, considerando-se o número elevado de ocorrências da doença, e também de outras neoplasias hematopoéticas, a exposição somática a fatores carcinogênicos deve ser evitada.

A maior incidência da doença ocorre principalmente na quarta década de vida, mas ela pode ocorrer também em crianças e idosos (FADERL *et al.*, 1999). Uma incidência maior desta faixa etária também foi encontrada nos pacientes aqui estudados ao diagnóstico.

O diagnóstico da doença é confirmado com a identificação do cromossomo Ph e/ou do rearranjo gênico *BCR/ABL*. A detecção destas alterações é, importante tanto para pesquisa quanto para aplicação clínica (USMAN *et al.*, 2004).

Neste estudo, o cromossomo Ph, que é responsável pela etiologia de mais de 95% dos casos de LMC (ZAGARIA *et al.*, 2004), foi observado com a utilização da técnica de bandamento GTG em 100% dos casos. A técnica de FISH permitiu a detecção do rearranjo *BCR/ABL* também em 100% dos casos de LMC. Portanto, a participação efetiva desta alteração na patogênese dos casos aqui estudados foi certa pôde confirmar o diagnóstico hematológico e sugerir um prognóstico mais favorável para os portadores.

A presença de rearranjos incomuns ou complexos na LMC pode ser indicativa de mau prognóstico (LA STARZA *et al.*, 2002). Neste estudo, ao diagnóstico, apenas um paciente apresentou uma alteração incomum, sugestiva de mau prognóstico.

Além da presença do rearranjo típico, a técnica de FISH também detectou alterações inespecíficas, que não puderam ser observadas por bandamento GTG, portanto, não puderam ser esclarecidas. Recentemente, vários estudos têm relatado a perda de seqüência de DNA no ponto de quebra do derivado do cromossomo 9. Pacientes que apresentam tais deleções tem características clínicas similares àqueles sem a anomalia, porém apresentam prognóstico pior quando tratados com quimioterapia convencional, embora quando tratados com imatinibe parecem responder igualmente (HAIGH & CUTHBERT, 2004; QUINTAS-CARDOMA *et al.*, 2005).

O baixo número de casos confirmados (25 = 36,2%) diante da demanda de 68 casos que foram encaminhados ao diagnóstico com hipótese de LMC, pode ser explicado, entre outros, porque outras patologias hematológicas podem apresentar, no início, características clínicas e hematológicas semelhantes a este tipo de leucemia. Por

exemplo, a Policitemia Vera, a mielofibrose e a trombocitemia essencial são diagnósticos diferenciais da LMC, onde a ausência do rearranjo gênico *BCR/ABL* é um dos critérios diagnósticos diferenciais (KAUSHANSKY, 2005). Também, os critérios internacionais padronizam a análise de 20 células em bandamento GTG, em casos de leucemias e este número pode não ser suficiente para detectar rearranjos de baixa frequência (CORTES *et al.*, 2003).

Deve ser considerado, inclusive, que as metáfases *in vitro*, que estão em condições de análise podem não representar o clone maligno. Portanto, a realização da técnica de FISH nos casos aqui estudados foi decisiva para a exclusão da presença do rearranjo e seleção da casuística.

Segundo a literatura, a técnica de bandamento GTG tem uma importância fundamental na detecção de alterações adicionais ao cromossomo Ph e, conseqüentemente, no estudo da evolução clonal da doença (CORTES *et al.*, 2003). Neste estudo, porém, apenas o caso H230 apresentou uma alteração inespecífica ao diagnóstico revelada pela técnica de FISH, uma vez que com a técnica de bandamento GTG, que revelou apenas uma metáfase com a perda do derivado do cromossomo 9, a clonalidade não pôde ser confirmada.

A técnica de FISH, contudo, permite a detecção do rearranjo gênico em núcleos interfásicos e a detecção da frequência exata das células portadoras do mesmo. Tem sensibilidade e especificidade de 100%, contudo, necessita de um alvo específico e, não pode detectar alterações extras (PASKULIN *et al.*, 1998). Neste trabalho o alvo foi o rearranjo *BCR/ABL* e para a sonda de marcação dupla utilizada, a detecção de falsos positivos é praticamente nula.

Assim, pode ser sugerido um protocolo de rotina que inclua as duas técnicas, ao diagnóstico e após terapia, com a utilização da sonda de marcação dupla, que são fundamentais nestas fases e após o transplante de medula óssea (TMO), como ficou demonstrado nos casos aqui estudados.

Por exemplo, o monitoramento do caso H134, três meses após tratamento com bussulfan e antes de ser submetida ao TMO, mostrou um aumento no número de células com a fusão gênica *BCR/ABL*, indicando progressão da doença e necessidade de mudança de terapia. O bussulfan, inclusive, é considerado um tratamento paliativo na LMC (TEFFERI, 2001) e foi utilizado para condicionamento antes do TMO. Dois e quatro meses após o TMO, as técnicas de FISH e GTG foram novamente realizadas e permitiram a confirmação do sucesso do mesmo.

Os demais casos, que entraram na amostra ao diagnóstico e que ainda estavam em acompanhamento pelos hematologistas até a conclusão deste trabalho, após confirmação do diagnóstico foram submetidos inicialmente ao tratamento com hydrea. Alguns foram submetidos ao transplante de medula óssea alogênico (TMO) e outros tratados com mesilato de imatinibe.

O TMO é considerado, até o momento, o único tratamento potencialmente curativo, porém está associado com altas taxas de morbidade e mortalidade devido à doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e/ou crônica, infecções bacterianas, virais ou fúngicas e principalmente à recaída da doença. (OLAVARRIA *et al.*, 2003; PETZER & GUNSILUS, 2003).

As complicações pós-transplante eventualmente apresentam sintomas clínicos específicos, porém, o monitoramento tem proporcionado a detecção precoce desses eventos, sugerindo novas opções terapêuticas. Portanto, é importante o seguimento de



marcadores clonais da doença para tratamento precoce de falha do procedimento ou recaída (FUCHRER *et al.*, 2005). Nos casos aqui estudados, a recaída foi detectada em cinco dos pacientes, porém apenas um respondeu a nova tentativa terapêutica e sobreviveu.

A sobrevida global do grupo foi de 70,8%. Dos pacientes aqui estudados, 79,2% atingiram a remissão citogenética completa (RCC), 37,5% deles até o segundo mês após o TMO. Os casos que atingem RCC mais precocemente têm um bom prognóstico (IMPARATO *et al.*, 1998). Embora considerando este bom prognóstico, três pacientes foram a óbito, dois deles mesmo após serem submetidos a outras alternativas terapêuticas como um segundo TMO e o uso de mesilato de imatinibe.

Na casuística estudada, a sobrevida livre de doença variou de 11 a 72 meses. Porém, o tempo de monitoramento é muito discutido e necessário mesmo em pacientes que há vários meses se encontram livres da doença (DVORAKOVA *et al.*, 2003).

O TMO é uma opção limitada a pacientes com idades inferiores a 55 anos, àqueles que apresentam um doador imunologicamente compatível e de acordo com o estágio da doença (McBRIDE *et al.*, 2000; TEFFERI, 2001; PETZER & GUNSILUS, 2003). Entretanto, novas drogas têm buscado atingir remissões duradouras e até mesmo a cura para os pacientes que não são candidatos ao TMO, ou para aqueles que recaíram após este procedimento.

A quimioterapia convencional muitas vezes oferece somente respostas parciais, temporárias e imprevisíveis. As terapias voltadas para mecanismos moleculares têm sido reconhecidas como mais efetivas em associar eficácia com níveis mais baixos de efeitos tóxicos (VARELLA-GARCIA, 2004). Imatinibe é o protótipo esperado para revolução na terapêutica oncológica por ser um inibidor de transdução de sinais intracelulares. O

alvo deste medicamento é a base etiológica da LMC (SAUSVILLE, 2003), ou seja, a proteína codificada pelo gene quimérico, que pode ser efetivamente bloqueada. A ausência da fosforilação inibe o prosseguimento da sinalização celular e muda o balanço fisiológico para a redução da proliferação celular e aumento da apoptose. Este inibidor induz respostas dramáticas e duráveis em pacientes com LMC (DEWAR *et al.*, 2005; VLAHOVIC & CRAWFORD, 2003).

Comparada com as obtidas por outros tratamentos, a resposta citogenética ao imatinibe ocorre mais rapidamente em alguns casos, dentro de 3 a 6 meses de tratamento (DEININGER, 2003). Nos casos aqui estudados, dos pacientes em fase crônica 81,5% responderam bem e outros 18,5% não à droga e tal resposta não mostrou associação com o tempo de tratamento. Um paciente que estava em crise blástica não obteve melhora com imatinibe.

Em 28,6% dos pacientes o rearranjo *BCR-ABL* não foi encontrado, sugerindo resposta citogenética completa após uma média de 9,8 meses de tratamento. Em 53,6% dos casos a frequência do rearranjo foi baixa, indicando resposta citogenética parcial, observada em um período que variou de 5 a 34 meses de tratamento. Frequências altas do rearranjo foram observadas em 25% dos pacientes, ou seja, resposta minor entre 7 e 24 meses de tratamento. Dois casos apresentaram respostas citogenéticas variáveis e foram incluídos nas duas ultimas categorias. A resposta citogenética major, portanto, foi observada em 89,3% dos pacientes.

O rearranjo *BCR-ABL* foi encontrado associado a outras alterações, como fusões simples adicionais e cópias extras de *ABL* e/ou de *BCR*, em 21,4% dos casos, sugerindo evolução clonal da doença com envolvimento dos mesmos genes.

As frequências da resposta citogenética ao mesilato de imatinibe foram semelhantes às descritas na literatura (TURKINA *et al.*, 2003; USUI, 2005). Mas, de um modo geral, a resposta citogenética ao imatinibe foi boa, porém, parece ser individual e imprevisível, independentemente do tempo de tratamento e do seu início após diagnóstico.

Se as respostas citogenéticas nos casos aqui estudados serão duradouras ou não, somente o monitoramento a longo prazo poderá esclarecer.

Muitos pacientes apresentam anomalias cromossômicas clonais após terapia com imatinibe (TERRE *et al.*, 2004). Alguns adquirem resistência e recaem após um curto período de terapia. Os mecanismos de resistência à droga são diversos mas, em muitos casos, são encontradas trocas de aminoácidos no domínio kinase de *BCR/ABL* (HOCHHAUS & HUGHES, 2004). Os pacientes aqui estudados que apresentaram outras alterações envolvendo *BCR* e *ABL* não parecem tê-las desenvolvido como resistência ao imatinibe pois, além destas ocorrerem em frequências baixas, não puderam ser relacionadas com a resposta citogenética ou com o tempo de tratamento.

Pacientes que recaem após o término da terapêutica também têm sido relatados. O sistema Nervoso Central (SNC) pode não receber concentrações de imatinibe suficientes para suprir a atividade tirosina quinase de *BCR/ABL*. Um paciente com LMC em crise blástica linfóide com excelente resposta sistêmica ao imatinibe recaiu devido à leucemia linfóide no SNC. O fluido cerebrospinal tem nível de imatinibe 2 log mais baixo que o plasma sanguíneo. Estes resultados sugerem que pacientes com LMC em remissão com imatinibe poderiam eventualmente recair com leucemia no SNC devido à ineficiência de imatinibe cruzar a barreira de sangue-cérebro (WONG & WITTE, 2004).

com imatinibe, para a detecção de recaída precoce e até mesmo para constatar a cura. Portanto, devem fazer parte dos protocolos investigativos de LMC e, sempre que possível, serem associadas a técnicas moleculares.



Referências

BERGER, U. et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. **Leukemia**, v. 19, n. 6, p. 984-989, 2005.

BJORK, J. et.al. Are occupational, hobby, or lifestyle exposures associated with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia? **Occup Environ Med**, v. 58, n. 11, p. 722-727, 2001.

CORTES, J.E. et.al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. **Blood**, v. 101, n. 10, p.3794-3800, 2003.

DEININGER, M.W.N. Cytogenetic Studies in Patients on Imatinib. **Seminars in Hematology**, v. 40, n.2, p. 50-55, 2003.

DEWAR, A.L. et.al. Macrophage colony stimulating factor receptor, c-fms, is a novel target of imatinib. **Blood**, v. 105, n. 8, p. 3127-3132, 2005.

DVORAKOVA, R. et al. Long-term follow-up of chimerical state of the patients transplanted for different haematologic diseases. **Sb Lek**, v. 104, n. 2, p. 209-215, 2003.

FADERL, S. et al. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. **Ann Intern. Med.**, v. 131, p. 207-219, 1999.

HAIGH, S.; CUTHBERT, G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 155, n. 2, p. 132-137, 2004.

HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Clinical resistance to imatinib: mechanisms and implications. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 18, n. 3, p. 641-656, 2004.

IMPARATO, F.P. et al. Co-evolução da terapêutica e do diagnóstico molecular da leucemia mielóide crônica. **Act. Oncol. Br.**, v. 19, n. 1, p. 259-266, 1998.

KAUSHANSKY, K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4187-4190, 2005.

LA STARZA, R. et al. Complex variant Philadelphia translocations involving the short arm of chromosome 6 in chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 87, n. 2, p. 143-147, 2002.

McBRIDE, N.C. et al. Autologous transplantation with Philadelphia-negative progenitor cells for patients with chronic myeloid leukemia (LMC) failing to attain a cytogenetic response to alpha interferon. **Bone Marrow Transplantation**, v. 26, p. 1165-1172, 2000.

OLAVARIA, E. et al. Response to imatinib in patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 17, p. 107-1712, 2003.

PASKULIN, G.A. et al. Pre-clinical evaluation of probes to detect t(8;21) AML minimal residual disease by fluorescence *in situ* Hybridization. **Genes Chromosom. Cancer**, v.21, n. 2, 1998.

PETZER, A. L.; GUNSILIUS, E. Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia. **Archives of Medical Research**, v. 34, n. 6, p. 496-506, 2003.

QUINTAS-CARDAMA, A. et.al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 105, n. 6, p. 2281-2286, 2005.

SAUSVILLE, E.A. Imatinib for chronic myelogenous leukemia: a 9 or 24 carat gold standard? **The Lancet.**, v. 361, p. 1400-1401, 2003.

TEFFERI, A. Chronic myeloid disorders: classification and Treatment overview. **Sem. Hematol.**, v. 38, n.1, p. 1-4, 2001.

TERRE, C. et al. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 8, p. 1340-1346, 2004.

TURKINA, A.G. et al. Therapeutic efficacy of imatinib mesylate (glivec) in chronic phase of myeloid leukemia. **Ter Arkh**, v. 75, n. 8, p. 62-67, 2003.

USMAN M, et al. Hematologic and cytogenetic findings in eleven chronic myelogenous leukemia patients treated with imatinib mesylate at a tertiary care hospital. **J. Pak Med Assoc.**, v. 54, p. 17-20, 2004.

USUI, N. Imatinib therapy for patients with chronic myelogenous leukemia. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 32, n. 3, p. 397-303, 2005.

VARELLA-GARCIA M. Análise genômica: do laboratório à prática oncológica. **Arq Ciênc. Saúde**, v. 11, n. 1, p. 40-43, 2004.

VLAHOVIC G, CRAWFORD J. Activation of tyrosine kinases in cancer. **Oncologist.**, v. 8, n. 6, p. 531-538, 2003.

WONG S.; WITTE O.N. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p.247-306, 2004.

ZAGARIA, A, et al. A fluorescence in situ hybridization study of complex t(9;22) in two chronic myelocytic leukemia cases with a masked Philadelphia chromosome. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 150, p. 81-85, 2004.

Capítulo VIII

Conclusões



Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. as técnicas de bandamento GTG e FISH permitem a confirmação do diagnóstico e dão subsídios para o prognóstico e para a terapia dos doentes. Os resultados positivos obtidos com estas técnicas possibilitam a liberação do medicamento interferon- α e do mesilato de imatinibe junto aos órgãos governamentais de saúde, uma vez que a maioria dos pacientes são atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS);
2. as técnicas de bandamento GTG e FISH devem ser utilizadas de forma complementar, contudo, podem ser associadas, com outras técnicas moleculares, principalmente para elucidação de variantes cariotípicas submicroscópicas ou que não envolvam *BCR/ABL*;
3. As freqüências do rearranjo *BCR/ABL* ao diagnóstico são mais elevadas quando analisadas por bandamento GTG, porém a estimativa das freqüências *in vivo* deve ser obtida com a utilização da técnica de FISH;
4. o transplante alogênico de *stem cell* hematopoética em LMC é eficaz e a técnica de FISH mostrou ser fundamental para seguimento dos pacientes transplantados;



5. outras alterações envolvendo *BCR/ABL* ocorrem em frequências baixas em pacientes com LMC em monoterapia com mesilato de imatinibe e não parecem estar relacionadas com a resistência a droga ou serem provocadas por ela;
6. a resposta citogenética ao mesilato de imatinibe é boa na maioria dos casos e parece ser individual e imprevisível, independente da fase da doença, início e tempo de tratamento com a droga;
7. o tempo para atingir remissão citogenética completa, a sobrevida livre de doença e a taxa de mortalidade, relacionados ao TMO, corroboram os dados da literatura e mostram a alta eficácia deste procedimento em LMC, pois 66,7% dos pacientes mantêm-se em remissão por períodos longos e não necessitam de terapias adicionais;
8. a maioria dos pacientes com LMC não apresentou exposição ocupacional relacionada aos fatores de risco. O que provoca a formação do rearranjo específico *BCR/ABL* ainda é desconhecido, mas é provável que envolva diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos;
9. as técnicas citogenéticas devem ser implantadas nos serviços que atendem pacientes com leucemias, pois são de extrema importância pelos benefícios que trazem para os pacientes e para a equipe médica.

Capítulo IX

Resumo

Abstract



Resumo

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal que surge da transformação neoplásica das células progenitoras pluripotentes, resultando em uma granulocitose progressiva. É um protótipo de câncer desencadeado por uma alteração cromossômica específica, a t(9:22) que origina o cromossomo Philadelphia (Ph). Essa translocação resulta na formação de um gene quimérico *BCR/ABL*.

O presente trabalho teve como objetivos investigar as alterações cariotípicas ao diagnóstico da LMC, com o uso da técnica do bandamento GTG, estudar a presença e a frequência do rearranjo gênico *BCR/ABL* ao diagnóstico, durante o tratamento com mesilato de imatinibe e após o transplante de medula óssea, com o uso da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). Também, com base na frequência de *BCR/ABL*, avaliar o tempo para aquisição da remissão citogenética completa, a sobrevida livre de doença após o TMO e a taxa de mortalidade relacionada a este procedimento, além de avaliar a resposta citogenética dos pacientes em uso exclusivo do mesilato de imatinibe e investigar as exposições ocupacionais dos pacientes, para e tentar correlacionar tal exposição com possíveis agentes etiológicos da LMC.

Foram estudadas 145 amostras de medula óssea de 66 indivíduos portadores de LMC. A análise por citogenética convencional foi realizada somente nos casos encaminhados ao diagnóstico antes de qualquer tipo de tratamento e a análise por FISH foi realizada em todos os casos.

O cromossomo Ph e o rearranjo *BCR/ABL* foram observados em 100% dos casos analisados ao diagnóstico com as diferentes técnicas. A frequência do cromossomo Ph detectado por bandamento GTG foi mais alta do que do rearranjo, porém a técnica de

FISH foi mais eficaz na estimativa das frequências in vivo e possibilitou a identificação de alterações inespecíficas envolvendo os genes *BCR* e/ou *ABL*.

Dos 24 pacientes submetidos ao TMO, 79,2% atingiram remissão citogenética completa, 37,5% desses até 60 dias após o transplante, um tempo indicativo de melhor prognóstico. A sobrevida global foi de 70,8% e a sobrevida livre de doença variou de 11 a 72 meses. A taxa de mortalidade relacionada ao transplante foi de 29,2%. Estes dados foram compatíveis com os previamente descritos.

Para os pacientes tratados com imatinibe, 28,6% não apresentaram o rearranjo *BCR/ABL*, sugerindo resposta citogenética completa, 25% apresentaram frequência alta do rearranjo e 21,4% apresentaram o rearranjo associado com outras alterações envolvendo *BCR* e *ABL*. Os resultados mostraram que essas outras alterações não parecem estar relacionadas com resistência à droga pois ocorreram em frequências baixas e não puderam ser relacionadas com a resposta citogenética ou com o tempo de tratamento.

A resposta ao mesilato de imatinibe foi boa na maioria dos casos. Parece ser individual e imprevisível, independente da fase de início e do tempo de tratamento com a droga.

As técnicas de bandamento GTG e FISH foram fundamentais para a obtenção dos resultados e foram complementares, portanto, devem ser utilizadas na análise de pacientes com LMC.

Palavras-chave: leucemia mielóide crônica; citogenética; FISH; imatinibe; TMO.

Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease which emerges from a neoplastic transformation of the pluripotent stem cells, resulting in a progressive granulocytosis. It is a prototype for cancer triggered by a specific chromosomal alteration, t(9:22) which originates the Philadelphia (Ph) chromosome. This translocation results in the formation of a *BCR/ABL* chimeric gene.

This work aimed at investigating the karyotypic alterations at diagnosis of CML using GTG banding and studying the presence and the frequency of the *BCR/ABL* gene rearrangement at diagnosis, during treatment with imatinib mesylate and after bone marrow transplantation, using the Fluorescence in situ hybridization method (FISH). Additionally, the frequency of the *BCR/ABL* rearrangement was used to evaluate the time to reach complete cytogenetic remission, the disease-free survival rate after bone marrow transplantation and the procedure-related mortality rate, as well as to assess the cytogenetic response of patients to the exclusive use of imatinib mesylate and investigate the occupational exposure of patients, to attempt to correlate the exposure to possible etiological agents with CML.

One hundred and forty-five samples of bone marrow from 66 individuals suffering from CML were studied. Conventional cytogenetic analysis was only performed in the cases received at diagnosis, that is before any type of treatment and FISH analysis was carried out in all cases.

The Ph chromosome and the *BCR/ABL* rearrangement were identified in all the cases analyzed at diagnosis by the different techniques. The frequency of the Ph chromosome detected by GTG banding was higher than the rearrangement however, the FISH technique was more efficacious in the estimates of *in vivo* frequencies and enabled

the identification of unspecific alterations involving the *BCR* and *ABL* genes.

Of the 24 patients submitted to bone marrow transplantation, 79.2% achieved complete cytogenetic remission, 37.5% of whom within 60 days of transplantation, a time indicative of better prognosis. The overall survival rate was 70.8% and the disease-free survival varied from 11 to 72 months. The transplant-related mortality rate was 29.2%. These data were similar to previously published results.

For patients treated with imatinib, 28.6% did not present with the *BCR/ABL* rearrangement, suggesting complete cytogenetic response, 25% presented with a high frequency and 21.4% presented with the rearrangement associated with other alterations involving the *BCR* and *ABL* genes. The results demonstrated that these other alterations do not seem to be related with drug resistance as they occurred at low rates and could not be related to cytogenetic response or to the time of treatment.

The response to imatinib mesylate was good in the majority of cases. It seems to be individual and unpredictable, independent of the initial phase and of the length of treatment using the drug.

The GTG banding and FISH techniques were essential to obtain the results and were complementary and thus should be used in the analysis of patients with CML.

Key-words: chronic myelogenous leukemia, cytogenetic, FISH, imatinib, BMT

Anexos

Anexo I

Anexo II

Anexo III

Anexo IV

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Título da Pesquisa: Alterações Cromossômicas e Frequência do Rearranjo Gênico *BCR/ABL* ao Diagnóstico, Tratamento com Mesilato de Imatinibe e Após Transplante de Medula Óssea em Leucemia Mielóide Crônica

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, Depto de Biologia Molecular – FAMERP, Chefe do Serviço de Genética; Cristina Benitez Vendrame Goloni, doutoranda – IBILCE/UNESP. Telefone para contato: (0xx17) 3201-5000 ramal 1931.

Para uma investigação científica honesta e segura, a pessoa que vai participar do estudo, seu pai, mãe ou tutor legal, responsável por ela, deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem informado sobre os riscos e benefícios do estudo.

É da responsabilidade do pesquisador dar toda e qualquer informação necessária e solicitada pelo participante do estudo. Este termo de consentimento, que foi aprovado por um Comitê de Ética, tem a finalidade de proteger e informar o participante, que ficará com uma cópia do mesmo.

Fui esclarecido que este estudo tem como objetivo investigar, algumas alterações genéticas das células da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide crônica. ao diagnóstico e tratamento da doença, na tentativa de relacionar os achados com a evolução da mesma e a resposta aos medicamentos, além de investigar possíveis causas relacionadas ao aparecimento da mesma.

Também fui informado que as técnicas que serão realizadas utilizarão uma parte do material (medula) obtida por aspiração com seringa, procedimento que é realizado pelo meu médico hematologista durante processo de rotina para coleta do mielograma, no Serviço de Hematologia do Hospital de Base.

Soube que os riscos para a minha saúde, serão os mesmos daqueles que não participarem do projeto, ou seja, os dos procedimentos médicos de rotina, que neste caso, incluirão dor, ardência ou mancha roxa no local de retirada do material (entrada da agulha).

Fui informado que posso consultar as pesquisadoras responsáveis, pelo telefone ou pessoalmente, para esclarecimento de dúvidas. Também que todas as informações obtidas da minha participação serão consideradas confidenciais, ficando minha identidade mantida em sigilo, em qualquer situação.

As informações obtidas desta pesquisa só poderão ser divulgadas em reuniões ou revistas científicas e com minha identidade preservada.

Se decidir não participar ou interromper a minha participação, em qualquer época, não terei nenhum tipo de prejuízo, não perderei nenhum benefício e não precisarei dar justificativas da minha atitude.

Li este termo, recebi informações claras sobre a presente investigação, tive oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Estou de acordo em participar livre e espontaneamente deste estudo e sei que, sob hipótese alguma receberei qualquer tipo de gratificação pela minha participação.



Entendi que os resultados deste estudo poderão ser muito úteis para esclarecimento do diagnóstico, na conduta terapêutica (tratamento) e prognóstico (evolução) da minha doença.

Dou, portanto o meu consentimento.

Nome:

RG:

Data:/...../.....

Assinatura:

Paciente ou responsável legal

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios desta investigação. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para qualquer outro esclarecimento pelo telefone (0xx17) 3201-5000 ramal 1931.

PESQUISADOR:

RG:

Data:/...../.....

Assinatura:



ANEXO II

HOSPITAL DE BASE DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Serviço de Genética

Ficha de Acompanhamento Clínico e Interrogatório Complementar para Pacientes com LMC para a Avaliação da Exposição a Agentes Lesivos à Medula Óssea

I - IDENTIFICAÇÃO

Nome _____ N° Registro HB _____ N° Genética _____
Sexo _____ Cor _____ idade _____ Data Nasc. ____/____/____ Estado civil _____
Endereço _____ Fone (____) _____
Bairro _____ Cidade _____ UF _____ CEP _____

MÉDICO RESPONSÁVEL _____

MATERIAL Sangue () Medula ()
Data Coleta _____ Hora _____

DIAGNÓSTICO CONSIDERADO

II - INFORMAÇÕES CLÍNICAS

1- Sinais Clínicos _____

2- Medula: % de Blastos _____ 3- Sangue periférico: % de blastos na periferia _____

DATA									
Ht/Hb									
Leuc.									
Blastos									
Bastões									
Neutróf.									
Eosinóf.									
Basóf.									
Linfócit.									
Monócit.									

4 – Exames Complementares

Mielograma ____/____/____ _____

____/____/____

B.M.O. ____/____/____

____/____/____

5 - Outras Doenças _____

6 - Cronologia da doença: _____

III - PROTOCOLO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS

IV - OUTRAS INFORMAÇÕES

Antecedentes pessoais

- Terapia prévia () Não () Sim: Químico () Radio () Outras ()

OBS: indicação _____

medicamentos (se químico) _____

tempo decorrido _____

- Utilização de tinturas para cabelo ou acetona () Não () Sim: produto _____

tempo total de exposição _____

- Contato com tintas e solventes () Não () Sim: produto _____

tempo total de exposição _____

- Utilização de drogas injetáveis ou inalatórias () Não () Sim: especificar tipo _____

tempo total de exposição _____

- Tabagismo () Não () Sim: nº de cigarros/dia _____

tempo total de exposição _____

- Etilismo () Não () Sim: tipo de bebida _____

tempo total de ingestão _____

- Uso de medicamentos () Não () Sim: especificar _____
Frequência _____
- História familiar de neoplasia () Não () Sim: tipo _____ parentesco _____
- Radiografias () esporádico () freqüente () recente tipo _____
- Informações sobre a profissão
 - Profissão 1 _____ Período 19 _____ a 19 _____
exposição a produtos tóxicos (radiação, pesticidas, solventes)
() Não () Sim: especificar o tipo _____
horas por dia de exposição _____
dias por semana de exposição _____
tempo total de exposição _____
 - Profissão 2 _____ Período 19 _____ a 19 _____
exposição a produtos tóxicos (radiação, pesticidas, solventes)
() não () sim: especificar o tipo _____
horas por dia de exposição _____
dias por semana de exposição _____
tempo total de exposição _____
 - Profissão 3 _____ Período 19 _____ a 19 _____
exposição a produtos tóxicos (radiação, pesticidas, solventes)
() não () sim: especificar o tipo _____
horas por dia de exposição _____
dias por semana de exposição _____
tempo total de exposição _____

V - CARACTERÍSTICAS DA MORADIA

- Moradia em área rural () não () sim: menos do que 1 ano () 1-3 anos ()
3 - 5 anos () mais do que 5 anos ()
- Contato com agrotóxicos () não () sim: direto () indireto () produto _____
tempo total de exposição _____
- Moradia em área urbana () não () sim: menos do que 1 ano () 1-3 anos ()
3 - 5 anos () mais do que 5 anos ()



- Fontes utilizadas para cozinhar ou iluminar

Botijão de gás () não () sim

fogão a lenha () não () sim

Eletricidade () não () sim

querosene/ óleo () não () sim

Outros _____

- Poluição do ar nas imediações () não () sim: chaminés de fábricas () incineradores ()
vias de tráfego intenso (ônibus e caminhões) ()

- Utilização de pesticidas ou inseticidas () não () sim: produto _____
tempo total de exposição _____

- Utilização de produtos de limpeza como removedores e desengordurantes
() não () sim: produto _____
tempo total de exposição _____

Comentários Gerais _____

ANEXO III**FISH - SOLUÇÕES****• Ácido acético a 70%**

15ml de água
35ml de ácido acético

• Solução de PBS 10x

80g de NaCl
2g de KCl
11,5g de NaHPO₄
2g de KH₂PO₄
1.000ml de água autoclavada

• Solução de PBS 1x

20ml PBS10x
180ml de água autoclavada

• Solução Salina 20xSSC

87,650g de NaCl
44,10g de Na₃C₆H₇O₇ · 2H₂O
1.000ml de água autoclavada

• Solução 2xSSC

20ml de 20xSSC
180ml água autoclavada

• RNase

Solução estoque (10mg/ml)
0,010g de RNase
1ml de água

Solução de uso (100µg/ml 2xSSC)

10µl de solução estoque
1ml de 2xSSC (pH 7.0)

Preparação para lâmina

1µl da solução de uso
100µl de 2xSSC

• Solução desnaturante de Formamida a 70%

Colocar no banho-maria a 37°C

28ml de formamida
4ml de 20xSSC pH 5,0
8ml de água autoclavada

Transferir para banho-maria a 70°C

• Diluição da sonda

7µl LSI/WCP Hybridization Buffer
2µl de água autoclavada
1µl de sonda

Manter em banho-maria a 73°C por 5 minutos

Transferir para uma cuba com gelo.



Anexo IV

Informações sobre os pacientes

Caso	Exposição a carcinógenos	Neoplasia em familiares	Profissão	Queixas clínicas
H7	–	NI	faxineira	NI
H13	+	NI	cabeleireira	NI
H23	–	–	estudante	NI
H26	–	NI	autônomo	NI
H50	–	NI	pedreiro	NI
H51	–	NI	metalúrgico	NI
H52	+	NI	lavrador	dor nas costas, esplenomegalia
H58	–	NI	do lar	NI
H64	+	NI	lavrador	NI
H78	+	NI	lavrador	NI
H79	–	–	do lar	NI
H90	–	–	guarda noturno	aumento do volume e dor abdominal, perda de peso e fraqueza
H112	–	–	servente	esplenomegalia, fraqueza
H118	–	+	do lar	NI
H126	–	NI	fisioterapeuta	NI
H134	–	–	estudante	dor em hipogástrio, diarreia, urina escurecida, febre, quadro de desorientação e dificuldade de ambulação por fraqueza em M.M.I.I
H137	+	NI	lavrador	NI
H139	–	NI	do lar	NI
H144	–	NI	doméstica	NI
H149	–	NI	cozinheira	NI
H151	–	–	do lar	NI
H152	+	NI	pintor	NI
H155	–	–	do lar	NI
H160	–	NI	ag. operacional	NI
H172	–	NI	pensionista	queimação em região retroesternal, associado à dispnéia
H173	+	–	lavrador	NI
H180	+	–	lavrador	NI
H181	–	–	porteiro	NI
H186	–	–	aux. escritório	NI

Continuação

H190	-	+	aux. enfermagem	NI
H192	-	-	aux. de analista	dores ósseas, febre e emagrecimento
H194	+	-	lavrador	NI
H203	-	+	comerciante	NI
H204	-	-	doméstica	NI
H205	-	+	escriturária	mialgia
H212	-	-	motorista	NI
H218	-	-	doméstica	dor abdominal, na coluna e cefaléia
H223	NI	NI	NI	NI
H224	-	NI	do lar	NI
H228	+	NI	fiscal	alteração no hemograma em exames de rotina
H230	+	+	lavrador	dor em hipocôndrio e esplenomegalia
H231	-	NI	do lar	NI
H237	+	-	lavrador	NI
H241	-	-	aviarista	nódulo no braço
H246	+	+	lavradora	náusea e febre
H250	-	NI	professora	tontura, náusea, cefaléia, febre
H251	NI	NI	NI	astúria
H252	-	NI	NI	esplenomegalia
H263	-	-	cobrador	NI
H265	-	+	motorista	esplenomegalia
H267	-	-	NI	falta de apetite, palidez, aumento do volume abdominal, sangramento nas fezes, febre, tosse, falta de ar e cansaço
H268	+	-	mecânico	esplenomegalia
H272	-	-	garçon	dor epigástrica
H275	-	NI	vigia noturno	NI
H282	-	NI	do lar	NI
H286	-	NI	oleiro	NI
H291	-	NI	psicólogo	NI
H298	NI	NI	aposentado	queimação epigástrica
H293	+	NI	lavrador	NI
H306	-	NI	do lar	NI
H307	-	NI	orives	NI
H335	+	+	motorista	nodulações em região anterior,
			aposentado	endurecimento região abdominal esquerda

Continuação				
H337	-	NI	repres. comercial	NI
H339	+	-	lavrador	prurido pelo corpo, placas eritematosas e emagrecimento
H361	+	+	cabelereira	leucocitose evidente em exames pré-operatórios a incontinência urinária
H362	-	NI	do lar	NI

NI = não informado (ausência da informação na ficha enviada ao laboratório e no prontuário do doente); - ausência da queixa; + = presença da queixa.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 08 de junho de 2005.

Cristina Benitez Vendrame Goloni



