

VALDEREZ RAVAGLIO JAMUR

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE PACIENTES
COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA
TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Iglênir João Cavalli

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

**CURITIBA
2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE
CRÔNICA TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aluna: Valderez Ravaglio Jamur

Orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr.^ª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

**CURITIBA
2005**

A minhas queridas amigas da
Citogenética, que me ensinaram
a ver e a gostar de cromossomos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Iglénir João Cavalli, por sua incansável disposição e paciência na orientação deste trabalho.

À Dra. Enilze Maria S. F. Ribeiro por sua valiosa contribuição como co-orientadora.

À Dra. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo e a Dra. Neiva Isabel Rodrigues Magdalena pelas correções e sugestões.

À minhas queridas companheiras do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, sem as quais este trabalho não teria sido possível, uma vez que os exames incluídos nesta dissertação foram analisados por: Ana Teresa, Déborah, Lismeri, Loraine, Luciane, Néria, Tamara e Valdevez, com o auxílio de Aglaci e Roseli.

Ao Dr. Ricardo Pasquini, a quem devo muito por minha formação profissional e a toda equipe do Transplante de Medula Óssea e do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas da UFPR, sem os quais este trabalho também não seria possível.

A todos meus amigos do Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR, por todos esses anos de trabalho e amizade.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética que me receberam tão carinhosamente.

Aos meus colegas de mestrado, pela convivência adorável nesses dois anos.

À minha querida tia Elba Ravaglio, por seu árduo trabalho na correção gramatical, formatação e impressão da dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 HISTÓRICO	2
2.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)	3
2.2.1 Fases da doença	4
2.2.1.1 Fase crônica (FC)	5
2.2.1.2 Fase acelerada (FA)	6
2.2.1.3 Crise blástica (CB)	6
2.2.2 Fatores prognósticos da LMC	7
2.2.3 Citogenética da LMC	9
2.2.4 Aspectos moleculares da t(9;22)(q34;q11)	13
2.2.5 Patogênese da LMC	16
2.2.6 Diagnóstico da LMC	18
2.2.7 Definição de remissão hematológica e citogenética	21
2.2.8 Tratamento da LMC	21
2.2.8.1 A terapia clássica - quimioterapia	22
2.2.8.2 Interferon-alfa (INF- α)	22
2.2.8.3 Transplante alogênico de medula óssea (TMO) ou, em sentido mais amplo, transplante de células-tronco (TCT)	25
2.2.8.4 Estratégias terapêuticas moleculares	29
2.2.8.4.1 Mesilato de imatinibe	30
3 OBJETIVOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	39
4.1.1 Amostra dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe	39
4.1.2 Amostra dos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea	40
4.2 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS	41
4.2.1 Coleta do material	41
4.2.2 Cultura celular	41

4.2.3 Preparação citológica	42
4.2.4 Análise citogenética	42
4.2.4.1 Análise citogenética dos pacientes do protocolo mesilato de imatinibe	43
4.2.4.1.1 Definição de resposta citogenética	44
4.2.4.2 Análise citogenética dos pacientes submetidos ao TMO	44
4.2.5 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Resultados da resposta citogenética, cariótipos e evolução clínica dos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe	50
5.2 Resultados da análise cariotípica e evolução clínica dos pacientes submetidos ao TMO	57
6 DISCUSSÃO	59
6.1 Resultados da resposta citogenética, cariótipos e evolução clínica dos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe	59
6.2 Resultados da análise cariotípica e evolução clínica dos pacientes submetidos ao TMO	63
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SÍNTESE DO SISTEMA DE ESTADIAMENTO PROGNÓSTICO PARA A LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	9
QUADRO 2 - FASE II DAS PESQUISAS SOBRE A EFICÁCIA DO INF-A NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	24
QUADRO 3 - RESULTADOS DA FASE II SOBRE A EFICÁCIA DO MESILATO DE IMATINIBE NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA...	33
QUADRO 4 - RESPOSTA CITOGENÉTICA E TIPO DE ABERRAÇÃO ADICIONAL OU NÃO-ADICIONAL AO CROMOSSOMO PHILADELPHIA OBSERVADOS NOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE ANTES E DURANTE O TRATAMENTO	52
QUADRO 5 - CARIÓTIPO DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM ABERRAÇÕES ADICIONAIS E NÃO-ADICIONAIS ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE	54
QUADRO 6 - EVOLUÇÃO DO QUADRO CLÍNICO DOS 10 PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE QUE FORAM A ÓBITO	54
QUADRO 7 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS ADICIONAIS E EVOLUÇÃO CLÍNICA APRESENTADAS POR SEIS PACIENTES ANTES E DEPOIS DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA	56
QUADRO 8 - SETE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA QUE FORAM A ÓBITO	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CROMOSSOMOS DERIVATIVOS 9 E 22, RESULTANTES DA TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA t(9;22)(q34;q11)	9
FIGURA 2- TRANSCRITOS <i>BCR-ABL</i> NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA, LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC) E LMC NEUTROFÍLICA	14
FIGURA 3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO POR <i>BCR-ABL</i>	17
FIGURA 4 - MECANISMOS DE AÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE	31
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS APRESENTADAS NA TABELA 4 E RETA DE REGRESSÃO OBTIDA A PARTIR DOS PONTOS \underline{Q} ($\bar{x}=2,75$; $Y=0,44$); \underline{P} ($X=7,0$; $Y=0,13$) PARA O MESILATO DE IMATINIBE, E \underline{Q} ($\bar{x}=4,31$; $Y=0,28$); \underline{P} ($X=7,0$; $Y=0,33$) PARA O TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	48
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE E NOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ANALISADOS NO INÍCIO E EM PERÍODOS DIFERENTES APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DOSES DIÁRIAS DE MESILATO DE IMATINIBE E ASSOCIAÇÃO COM OUTRO MEDICAMENTO, ADMINISTRADAS A 57 PACIENTES	39
TABELA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS EXAMES DO PROTOCOLO MESILATO DE IMATINIBE, CONFORME O PERÍODO DE COLETA	42
TABELA 3 -	DISTRIBUIÇÃO DOS EXAMES DE PACIENTES DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, CONFORME O PERÍODO DE COLETA	44
TABELA 4 -	MÉDIAS DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS SETE PERÍODOS ANALISADOS, ENCONTRADAS NOS PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE E NOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA	47
TABELA 5 -	ANÁLISE DA VARIÂNCIA DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS SETE PERÍODOS DOS DOIS TIPOS DE TRATAMENTO	48
TABELA 6 -	RESPOSTA CITOGENÉTICA AO MESILATO DE IMATINIBE SEGUNDO A FASE DA DOENÇA NO INÍCIO DO TRATAMENTO DOS 90 PACIENTES	49
TABELA 7 -	DOSES E COMBINAÇÕES INICIAIS DO MESILATO DE IMATINIBE E RESPOSTA CITOGENÉTICA DOS 90 PACIENTES AO TRATAMENTO	50
TABELA 8 -	ABERRAÇÕES CITOGENÉTICAS ADICIONAIS E NÃO-ADICIONAIS MAIS FREQUENTEMENTE OBSERVADAS NOS PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE	51
TABELA 9	PERÍODOS EM QUE HOUVE RECIDIVA CITOGENÉTICA NOS 22 PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ...	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	Gene Abelson
Ara-C	Arabinosídeo de citosina
ARG	<i>Abelson-related gene</i>
ASH	<i>American Society of Hematology</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BCR	Gene <i>break cluster region</i>
BUS	Bussulfano
CART	<i>Classification and regression trees</i>
CB	Crise blástica
CMV	Citomegalovírus
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DRM	Doença residual mínima
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GVL	Enxerto <i>versus</i> leucemia (<i>graft versus leukemia</i>)
h-FISH	<i>Hypermetaphase fluorescence in situ hybridization</i>
HY	Hidroxiuréia
IBMTR	<i>International Bone Marrow Transplant Registry</i>
ICT	Irradiação corporal total
IFN- α	Interferon-alfa
ILD	Infusão de linfócitos do doador
IRIS	<i>Randomized Study of Interferon versus ST1571</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
M-bcr	<i>Major breakpoint cluster region</i>
MIUs	<i>Million international units</i>
MRC	Melhor resposta citogenética
NK	<i>Natural killer</i>
NLS	Sinal de localização nuclear C-terminal (<i>C-terminal nuclear localization signal</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDFGR-A e B	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor receptor</i>)
Ph	Philadelphia
RCC	Resposta citogenética completa
RCM	Resposta citogenética mínima
RCP	Resposta citogenética parcial
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase</i>
SH1	<i>src homology region 1 domain</i>
SH2	<i>src homology region 2 domain</i>
SH3	<i>src homology region 3 domain</i>
STI	<i>Signal transduction inhibitors</i>
TCT	Transplante de células-tronco
TMO	Transplante de medula óssea

RESUMO

Noventa pacientes (média de idade $41,18 \pm 13,13$) em tratamento com mesilato de imatinibe e 56 pacientes (média de idade $28,18 \pm 9,93$) submetidos ao transplante de medula óssea (TMO), todos portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) atendidos no Ambulatório de Hematologia, no Ambulatório de Leucemia Mielóide Crônica e no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, constituíram as amostras do presente estudo. Na primeira amostra (pacientes tratados com o mesilato de imatinibe), foram realizadas 292 análises citogenéticas no período de dezembro de 2000 a novembro de 2004; na segunda (pacientes submetidos ao TMO), 193 análises citogenéticas foram realizadas no período de abril de 1990 a outubro de 2004. As análises foram realizadas no Serviço de Citogenética do Laboratório de Imunogenética do hospital referido. Em cada exame foram analisadas, no mínimo, 20 células por bandeamento GTG. A obtenção das metáfases e das bandas G, seguiu, respectivamente, os procedimentos desenvolvidos por Raimondi et al.(1998) e por Scheres (1972), com modificações. A proporção de células Philadelphia positivas (Ph+), que constituiu unidade metodológica de análise, foi obtida em função de todas as células analisadas. Os objetivos específicos foram: 1) avaliar em portadores de LMC a proporção de células Ph+ em diferentes períodos de tratamento com mesilato de imatinibe; 2) comparar tais resultados com os de pacientes com LMC submetidos ao TMO; 3) identificar o cariótipo dos pacientes submetidos aos dois tipos de tratamentos; 4) correlacionar as informações citogenéticas com a evolução do quadro clínico dos pacientes. O coeficiente de regressão das proporções de células Ph+ em função do tempo de tratamento com mesilato de imatinibe foi de $-0,075 \pm 0,016$; $t=4,68$; $P < 0,001$, negativo e significativamente diferente de zero, indicando que a proporção de células Ph+ diminuiu consistentemente em função do período após o tratamento. Já o mesmo coeficiente para os pacientes submetidos ao TMO foi de $0,02 \pm 0,01$; $t=1,43$; $P > 0,10$, positivo e não significativamente diferente de zero, indicando que as variações das proporções de células Ph+ independem do período após o TMO. Nas duas amostras as diferenças entre as médias das proporções de células Ph+ do diagnóstico e do primeiro período (6^o mês) de tratamento foram significativas a 0,05, e tanto no diagnóstico como no primeiro período as médias dos pacientes submetidos ao TMO foram menores. O teste de Tukey demonstrou diferenças significativas nas médias das proporções de células Ph+ nos pacientes tratados com mesilato de imatinibe entre o 6^o mês e o 24^o mês e entre o 6^o mês e >36 meses. Por outro lado, as médias das proporções de células Ph+ dos diferentes períodos após o TMO não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que justifica o resultado não significativo entre períodos na análise da variância. As aberrações cromossômicas secundárias mais frequentes foram: +8, duplo Ph e i(17)(q10) nos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe, e i(17)(q10) nos submetidos ao TMO. Nos dois tipos de tratamento os óbitos coincidiram com os períodos de maior proporção de células Ph+. Finalmente, observou-se que na maioria dos parâmetros analisados a resposta dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe foi melhor do que a dos submetidos ao TMO.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços da citogenética e da biologia molecular levaram a uma melhor compreensão dos rearranjos moleculares nas doenças malignas. A descoberta do cromossomo Philadelphia (Ph) na leucemia mielóide crônica (LMC) tornou possível esclarecer o mecanismo molecular responsável pela proliferação anormal das células sanguíneas. O conhecimento adquirido a partir desses eventos contribuiu para o desenvolvimento de medicamentos mais específicos e menos tóxicos para o tratamento de indivíduos com essa doença, resultando em melhor prognóstico e em melhor qualidade de vida.

O mesilato de imatinibe é um medicamento desenvolvido na segunda metade da década de 90 (DRUKER et al., 1996). No ano de 2000 sua eficiência terapêutica para a leucemia mielóide crônica (LMC) passou a ser testada em Centros Hematológicos de referência em diferentes países do mundo, incluindo o do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Em 10 de maio de 2001, a *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou definitivamente seu uso, devido à sua eficiente ação terapêutica, demonstrada pelos resultados dos protocolos pilotos. Essa droga se liga especificamente à proteína quimérica p210, resultante, em geral, da translocação t(9;22)(q34;q11), atuando portanto seletivamente nos clones celulares Philadelphia positivos.

Assim, embora a boa resposta clínica dos pacientes tenha sido atestada e considerando também que são raras as informações citogenéticas (KANTARJIAN et al., 2003), é de interesse avaliar qualitativa e quantitativamente o comportamento citogenético dos clones neoplásicos mediante análise do cromossomo Philadelphia, que é o principal marcador genético da LMC. Evidentemente, tal avaliação é mais efetiva em termos comparativos. Assim, uma amostra de pacientes com LMC, submetidos ao transplante de medula óssea (TMO) foi também analisada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

As primeiras informações sobre a relação entre anormalidades cromossômicas e desenvolvimento do câncer foram descritas em 1890 pelo patologista alemão David von Hansemann (citado por HEIM; MITELMAN, 1995). Foi, entretanto, em 1914 que o biólogo Theodor Boveri (citado por NOWELL; ROWLEY; KNUDSON, 1998), estudando ouriços do mar, postulou a Teoria Mutacional do Câncer, sugerindo a importância da instabilidade genética das células tumorais, a sua possível origem unicelular e o significado das alterações cromossômicas. Essas hipóteses precederam em aproximadamente quatro décadas o desenvolvimento de técnicas que possibilitassem a sua avaliação. Nos anos 30 e 40 do século XX, estudos, tanto em tumores humanos como em tumores murinos induzidos experimentalmente, sugeriram que o número de cromossomos era comumente anormal em células neoplásicas, dando início à análise da natureza clonal dos tumores (cf. NOWELL; ROWLEY; KNUDSON, 1998). No entanto, somente a partir da década de 50 é que as metodologias citogenéticas puderam ser efetivamente desenvolvidas.

Atualmente, três fases distintas podem ser identificadas. A primeira corresponde à descoberta e ao desenvolvimento de métodos para obtenção de metáfases de células normais e malignas. O tratamento de células com solução hipotônica (HSU, 1952) resultou numa separação adequada dos cromossomos, possibilitando a definição de 46 cromossomos como o número correto nas células somáticas humanas (TJIO; LEVAN, 1956). Nowell, em 1956, no Departamento de Patologia da Universidade da Pennsylvania, iniciou estudos sobre o crescimento e a diferenciação de células leucêmicas humanas em culturas de curto-tempo. Em colaboração com Hungerford, identificou um pequeno cromossomo acrocêntrico – morfologicamente anormal por apresentar-se menor do que os outros acrocêntricos – nas células de indivíduos com leucemia mielóide crônica (NOWELL; HUNGERFORD, 1960). Esse cromossomo, denominado Philadelphia (Ph) em referência à cidade onde foi descrito, foi a primeira anormalidade cromossômica associada a uma neoplasia.

A segunda fase da citogenética humana e dos estudos citogenéticos do câncer inicia-se com o desenvolvimento das técnicas de bandeamento cromossômico (ZECH, 1969; CASPERSSON et al., 1970a, 1970b, 1970c, 1970d, 1970e). O bandeamento cromossômico permitiu a perfeita identificação de todos os cromossomos do genoma humano e a constata-

ção de que os ganhos e perdas cromossômicos não eram eventos aleatórios. ROWLEY (1973a) descreveu a primeira translocação, a t(8;21)(q22;q22), em indivíduos com leucemia mielóide aguda (LMA), e no mesmo ano descreveu a t(9;22)(q34;q11), identificando a origem citológica do cromossomo Philadelphia (ROWLEY, 1973b).

A terceira fase da citogenética inicia-se com o uso de sondas de DNA específicas para a identificação de genes ou de regiões cromossômicas. A técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), desenvolvida em 1986 (CREMER et al., 1986), complementa a análise citogenética clássica na detecção de aberrações cromossômicas. A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) foi usada pela primeira vez na leucemia mielóide crônica em 1988 (BERGER, 1988). Desde então, outras técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para o estudo dos rearranjos cromossômicos envolvidos no câncer.

2.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

A leucemia mielóide crônica (LMC) foi descrita há mais de 150 anos, independentemente, por Virchow (1845), na Alemanha, e por Craigie e Bennet (1845), em Edinburgo (citados por CHOPRA; PU; ELEFANTY, 1999). A epidemiologia e a história natural da LMC foram documentadas por volta de 1920. Embora a transformação da LMC para leucemia aguda (crise blástica) já tivesse sido observada no início do século XX, a alta frequência dessa fase terminal só foi documentada por Louis (1956) e por Bernard (1959) (citados por CHOPRA; PU; ELEFANTY, 1999). Essa transformação foi classificada, durante os anos de 1960-70, como leucemia mielóide aguda, quando as formas variantes eritroblástica (CLEIN et al., 1966), linfóide (JANOSSY et al., 1976) e megacariocítica (BAIN et al., 1977) foram reconhecidas. A leucemia basofílica também foi observada na fase terminal da LMC (KYLE et al., 1966) (citados por CHOPRA; PU; ELEFANTY, 1999).

A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal da célula-tronco hematopoética pluripotente, caracterizada pela proliferação do componente granulocítico da medula óssea. FIALKOW et al. (1977) demonstraram, a partir de estudo de granulócitos em heterozigotos para as isoenzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que a LMC é uma doença originada da célula-tronco. Nos granulócitos de pacientes com LMC somente um tipo da isoenzima era expresso, a isoenzima A ou a B, dependendo do cromossomo X inativado. O mesmo ocorreu em eritrócitos, leucócitos e plaquetas, mostrando que todas essas células eram originadas de uma mesma célula-tronco.

Conquanto seja bem aceita a origem clonal da LMC, com um progenitor comum aos granulócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos, eritrócitos, megacariócitos e linfócitos B, (CANELLOS; GRIFFIN, 1985; CHAMPLIN; GOLDE, 1985), o envolvimento dos linfócitos T ainda não está esclarecido. GIANNONE et al. (1988) relatam um caso de recidiva da doença após transplante de medula óssea (TMO), com linfadenopatia supraclavicular de origem T, com o mesmo rearranjo *BCR/ABL* presente na medula óssea antes do transplante. Outro caso mostrou que os blastos presentes na crise linfóide de origem T podiam expressar a proteína p210, característica da LMC (SCHUH et al., 1990). Esses episódios indicam que a LMC pode originar-se de células precursoras comuns às células mielóides e aos linfócitos T.

A LMC é caracterizada por: 1) heterogeneidade entre os pacientes, 2) curso bi ou trifásico, 3) presença do cromossomo Philadelphia. Sendo o aumento da proliferação celular uma característica comum da LMC e de outras doenças mieloproliferativas – como a trombocitose essencial, a policitemia vera e a metaplasia mielóide/mielofibrose –, estudos citogenéticos e moleculares são necessários para a confirmação do diagnóstico, uma vez que a história natural e o tratamento para cada uma delas são diferentes.

A doença afeta homens e mulheres na proporção 1,4:1; sua prevalência aumenta com a idade e os indivíduos são diagnosticados geralmente com 45 a 55 anos, embora estudos relatem sua ocorrência acima de 67 anos (BRINCKER, 1982). A LMC compreende 7% a 20% de todas as leucemias, atingindo 1 a 2 indivíduos para cada 100 000 na população em geral (SILVER et al., 1999).

2.2.1 Fases da doença

Três fases de atividade da doença são reconhecidas na LMC: *fase crônica* ou *estável*, *fase acelerada* e *crise blástica*. A LMC, no início, apresenta-se como fase indolente ou crônica, facilmente controlável com terapia. Aproximadamente 90% dos doentes estão nessa fase, no diagnóstico. Com o tratamento clássico, a doença progride para a fase acelerada, com duração menor que um a um ano e meio, seguida da fase blástica, que resulta na morte do paciente num prazo de três a seis meses. Aproximadamente 20% a 25% dos doentes morrem de complicações da fase acelerada, enquanto outros tantos desenvolvem a fase blástica diretamente, sem passar pela fase acelerada intermediária (KANTARJIAN et al., 1993).

2.2.1.1 Fase crônica (FC)

Os portadores de LMC mostram na fase crônica uma heterogeneidade clínica ainda não bem compreendida molecularmente, que envolve várias questões: fatores ambientais que modulam a competição entre as células-tronco normais e as malignas; diferenças genéticas entre os indivíduos; diferenças que têm sido analisadas entre os pontos de quebras envolvidos na translocação (SINCLAIR et al., 2000). Por ser indolente a fase crônica, quase 50% dos doentes são assintomáticos nesse estágio, ficando o diagnóstico comumente por conta de exames sanguíneos de rotina, que mostram leucocitose acentuada com granulócitos em todas as fases de maturação, anemia e trombocitose. Os doentes sintomáticos exibem fadiga, anorexia, perda de peso, desconforto abdominal, sudorese; nos raros casos de leucocitose muito alta, sintomas de hiperviscosidade podem aparecer, como hemorragia de retina, cefaléia, priapismo, entre outros. O exame físico revela esplenomegalia em 50% dos doentes e hepatomegalia em percentagens menores. O tamanho do baço pode ser volumoso, mas a terapia inicial com bussulfano (BUS) ou hidroxiuréia (HY) pode reduzi-lo ao normal (FADERL, 1999).

Os portadores de LMC na fase crônica têm sistema imune efetivo e geralmente se sentem bem por períodos prolongados. Quando os sintomas e sinais estão presentes, são, em geral, leves e relacionados à proliferação celular aumentada. A terapia inicial quase sempre é suficiente para restabelecer rapidamente a hematopoese efetiva.

A duração dessa fase é muito variável, pois a transformação para a fase aguda pode ocorrer dentro de 3 a 8 anos após o diagnóstico. Nos dois primeiros anos é menor o risco de transformação, com desenvolvimento da crise blástica em apenas 5%-10% dos doentes (SOKAL et al., 1984). Após dois anos, o índice de progressão anual aumenta para 20%-25%.

A duração da primeira fase crônica tem sido o principal indicador da eficácia do tratamento para a LMC. Muitos tratamentos têm por finalidade prolongar essa fase, embora o transplante alogênico de célula-tronco hematopoética busque a cura da doença com a erradicação permanente do clone Ph positivo (FRANKLIN; MILLS, 2000).

2.2.1.2 Fase acelerada (FA)

A fase acelerada é caracterizada por alguns dos índices propostos pelo *Internacional Bone Marrow Transplant Registry* (IBMTR) (1997): leucocitose (contagem global de leucócitos $>100 \times 10^9/L$), anemia (hemoglobina $<8g/dL$), trombocitopenia (plaquetas $<100 \times 10^9/L$) ou trombocitose (plaquetas $>1000 \times 10^9/L$) e esplenomegalia palpável – todos refratários ao tratamento com bussulfano ou hidroxiuréia – desenvolvimento de doença extramedular; presença de $\geq 10\%$ de blastos na medula óssea ou no sangue periférico; presença de $\geq 20\%$ de blastos + promielócitos no sangue ou na medula; presença de $\geq 20\%$ de basófilos + eosinófilos no sangue; e anormalidades citogenéticas adicionais ao cromossomo Philadelphia, como o duplo Ph, trissomia do cromossomo 8, trissomia do cromossomo 19, isocromossomo 17q e novas translocações ou deleções. Quarenta a setenta por cento dos doentes permanecem de 4 a 6 meses na fase acelerada antes de evoluir para a crise blástica (GRIESSHAMMER et al., 1996).

2.2.1.3 Crise blástica (CB)

A crise blástica é geralmente definida pela presença de infiltrado extramedular de células leucêmicas ou por contagem de blastos maior que 30% no sangue periférico ou na medula óssea (MAJLIS et al., 1996; FADERL, 1999), ou, ainda, pela presença de 20%-30% de blastos mais promielócitos no sangue periférico ou na medula óssea (GRIESSHAMMER et al., 1996). Os blastos podem ter origem tanto mielóide (responsáveis por dois terços das crises blásticas) como linfóide.

Na crise blástica, mais de 50% dos doentes evoluem para um quadro semelhante ao da leucemia mieloblástica aguda (LMA); 30% para um quadro similar ao da leucemia linfoblástica aguda (LLA), com blastos de linhagem pré-B, e 10% com blastos de linhagem eritróide (LICHTMAN, 1995). Raramente a evolução ocorre com blastos de linhagem de células T.

Somente 20%-30% dos pacientes com LMC em crise blástica respondem à indução com quimioterápicos e apresentam sobrevida de 3 a 6 meses. A crise blástica linfóide freqüentemente responde melhor à primeira linha de quimioterápicos, alcançando remissão em 40%-60% dos pacientes; mas as respostas não são duráveis e eles recaem precocemente (DERDERIAN et al., 1993). A sobrevida média é maior do que na crise blástica mielóide, alcançando de 9 a 12 meses (SHIMONI, 2003). A transformação para a crise blástica – que

pode ocorrer em qualquer período, saindo diretamente da fase crônica ou passando pela fase acelerada – é raramente seguida de remissão completa após transplante de medula óssea alogênico.

2.2.2 Fatores prognósticos da LMC

Em razão de ser a fase crônica muito indolente e as fases terminais de rápida evolução, muitos investigadores tentaram desenvolver escalas prognósticas para orientar a conduta terapêutica. A esse respeito foram publicados vários indicadores de estratificação de risco, mas, segundo HEHLMANN et al. (1997) e LEE (2000), o melhor deles é o escore de SOKAL (1984), obtido a partir de análise de dados de seis grupos europeus e americanos sobre indivíduos que receberam tratamento para LMC entre os anos de 1960 e 1970.

Nesse trabalho, o significado prognóstico das características da doença no diagnóstico foi analisado a partir de uma amostra de 813 doentes na fase crônica, positivos para o cromossomo Philadelphia. O padrão dessa população era típico de pacientes de baixo risco, com média de 47 meses de sobrevida. A análise de regressão multivariada indicou que o tamanho do baço e a percentagem de blastos circulantes foram os indicadores prognósticos mais importantes. Essas características, além da idade, comportaram-se como variáveis contínuas, progressivamente desfavoráveis nos valores mais altos. A contagem de plaquetas não influenciou significativamente a sobrevida quando abaixo de $700 \times 10^9/L$, mas aumentou o risco quando estava acima desses valores. A presença de basófilos mais eosinófilos acima de 15%, de blastos acima de 5% e de aberrações cariotípicas adicionais ao Ph também se mostrou desfavorável.

Para calcular o risco de morte, o índice de Sokal baseia-se na contagem de plaquetas e de blastos periféricos, no tamanho do baço e na idade do paciente verificados durante o diagnóstico. Com base nesse cálculo é classificada a população em três grupos: *de alto*, *de intermediário* e *de baixo risco*, com sobrevida média de 3, 4 e 5 anos, respectivamente. Outros modelos prognósticos classificam os doentes em grupos de risco *bom*, *intermediário* e *ruim*, com diferentes expectativas de sobrevida. No Quadro 1 é apresentada uma síntese de modelo prognóstico baseado em vários estudos, proposta por KANTARJIAN et al. (1993).

Segundo KANTARJIAN et al. (1993), os fatores de mau prognóstico são: **clínicos**: idade avançada, sintomas no diagnóstico, perda de peso importante, hepatomegalia, esplenomegalia e estado geral comprometido; **laboratoriais**: anemia; trombocitose, trombocitopenia, megacariocitopenia; aumento do número de blastos ou de blastos + promielócitos no sangue periférico ou na medula óssea; aumento do número de basófilos no sangue ou na medula; graus 3-4 de fibrose de reticulina ou de colágeno; **associados a tratamentos**: tempo prolongado para atingir remissão hematológica com o uso de bussulfano; período curto de remissão; necessidade da dose total de bussulfano ou de hidroxuréia no primeiro ano do tratamento para controlar a contagem de leucócitos; ausência de supressão significativa de metafases Ph positivas durante o tratamento com INF- α ou com quimioterapia intensiva; baixa resposta inicial à terapia com INF- α .

QUADRO 1 - SÍNTESE DO SISTEMA DE ESTADIAMENTO PROGNÓSTICO PARA A LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

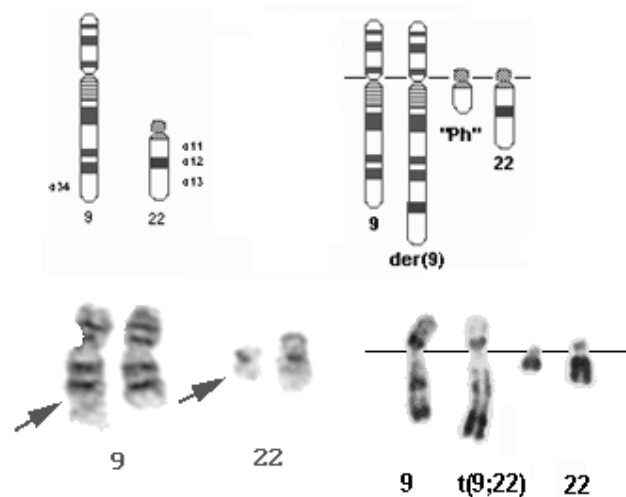
ESTÁDIO	NÚMERO DE CARACTERÍSTICAS DE MAU PROGNÓSTICO	DETERMINANTES PROGNÓSTICOS
1	0 ou 1	Características de mau prognóstico:
2	2	1) idade ≥ 60 anos
		2) baço ≥ 10 cm abaixo do rebordo costal
		3) blastos $\geq 3\%$ no s.p. ou m.o
3	3	4) basófilos $\geq 7\%$ no s.p ou $\geq 3\%$ na m.o
		5) plaquetas $\geq 700 \times 10^9/L$
4	Qualquer característica da fase acelerada	Características de fase acelerada
		Evolução citogenética clonal
		Blastos $\geq 15\%$ no s.p
		Blastos + promielócitos $\geq 30\%$ no s.p
		Basófilos $\geq 20\%$ no s.p
		Plaquetas $< 100 \times 10^9/L$

FONTE: KANTARJIAN et al., 1993.

2.2.3 Citogenética da LMC

O cromossomo Philadelphia (Figura 1) é um derivativo do cromossomo 22, resultante da translocação $t(9;22)(q34;q11)$, que pode ser detectado por citogenética clássica em 90-95% dos indivíduos com LMC. Em 2%-10% dos casos esse cromossomo origina-se de rearranjos variantes decorrentes tanto de simples aberração envolvendo a região 22q11 como de alterações complexas envolvendo ambas as regiões 9q34 e 22q11 com um terceiro ou mais cromossomos.

FIGURA 1- CROMOSSOMOS DERIVATIVOS 9 E 22 (SETAS), RESULTANTES DA TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA $t(9;22)(q34;q11)$.



FONTE: WWW.INFOBIOGEN.FR

Essas translocações variantes são ditas *simples* quando o segmento do cromossomo 22 foi translocado para outro cromossomo que não o 9; e *complexas* quando três ou mais cromossomos estão envolvidos (HEIM; MITELMAN, 1995). As translocações variantes simples, na verdade, são translocações complexas não detectadas pela análise citogenética clássica, que, quando estudadas por outros métodos, revelam o envolvimento da região 9q34.

HAGEMEIJER et al. (1984) estudaram translocações variantes simples por bandas R de alta resolução, que revelaram uma pequena deleção na região terminal de um dos cromossomos 9, sugerindo que este esteja também envolvido no rearranjo e, portanto, essas translocações seriam complexas. Os autores também as analisaram pela técnica de FISH, que

demonstrou a presença de seqüências do gene *ABL* no cromossomo Ph, confirmando a presença de rearranjos complexos. Deleções adjacentes aos pontos de quebra no cromossomo 9 têm sido descritas em 10% a 15% dos indivíduos com LMC. Essas deleções são extensas, chegando a muitos megabases; transpõem os pontos de quebra da translocação, muitas vezes resultam na perda genômica de seqüências de ambos os cromossomos 9 e 22; ocorrem simultaneamente à formação do cromossomo Philadelphia e estão associadas a um prognóstico desfavorável. Os doentes que exibem a deleção têm curto período de fase crônica, transformação precoce da doença e diminuição da sobrevida (HUNTLY et al., 2003).

Embora todos os cromossomos, inclusive o cromossomo Y, tenham sido descritos como participantes dessas translocações variantes, a distribuição dos pontos de quebra exibe um padrão não-randômico, com maior envolvimento de algumas regiões cromossômicas, como: 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12, e 22q13 (JOHANSSON et al., 2002). Além disso, alguns tipos específicos dessas variantes são recorrentes, como as translocações t(3;9;22)(p21;q34;q11) e t(17;22)(q25;q11), ambas relatadas em mais de 10 casos (MITELMAN et al., 2001). Apesar da complexidade genética dessas variantes, os dados disponíveis indicam que elas não conferem alterações fenotípicas ou prognósticas quando comparadas com a translocação clássica t(9;22) (JOHANSSON et al., 2002).

O cromossomo Ph é a aberração predominante durante a fase crônica. Com a progressão da doença, entretanto, 50% a 80% dos indivíduos adquirem aberrações cromossômicas adicionais, que precedem as manifestações clínicas e hematológicas da crise blástica. As aberrações cromossômicas mais comumente associadas à evolução clonal são: +8 (30%-40%), duplo Ph (20%-30%) e i(17q) ou outras aberrações envolvendo o cromossomo 17 (15%-20%), +19 (13%), +21 (7%), +17 (5%) e monossomia do 7 (5%) (JOHANSSON et al., 2002).

Em uma análise multivariada realizada por KANTARJIAN et al. (1988) com 357 doentes, a evolução citogenética clonal mostrou ser uma característica independente, indicativa de aceleração da doença. Em 20% a 50% dos pacientes a transformação ocorre sem sinais de evolução cariotípica (MITELMAN, 1993). As translocações variantes, a perda do cromossomo Y e as aberrações constitucionais não são consideradas aberrações que indicam evolução clonal.

HEIM e MITELMAN (1995) classificam em *maiores* (> 5%) e *menores* (< 5%) as alterações citogenéticas quanto à frequência na evolução da LMC:

- a) *alterações maiores*: trissomias dos cromossomos 8 e 19, presença do isocromossomo i(17q) e do duplo Philadelphia;
- b) *alterações menores*: monossomias dos cromossomos 7, 17, nulissomia do Y, trissomias dos cromossomos 17, 21, e a translocação t(3;21)(q26;q22).

Essas alterações podem preceder as manifestações clínicas e hematológicas da transformação da doença. A evolução citogenética clonal confere mau prognóstico quando presente no momento do diagnóstico. Seu significado prognóstico depende de sua natureza, da predominância nas metáfases da medula óssea e da associação com outras características da fase acelerada. MAJLIS et al. (1996) identificaram os seguintes fatores de mau prognóstico associados com a sobrevida após a evolução clonal, num estudo realizado por análise de regressão e por CART (*classification and regression trees*): 1) presença de aberrações envolvendo o cromossomo 17; 2) alta percentagem de metáfases anormais; 3) outras características de fase acelerada e 4) tempo de evolução clonal maior que 2 anos. A ausência ou a presença de duas, de três ou mais desses fatos foram associadas ao tempo de sobrevida médio de 51, 24, 14 e 7 meses, respectivamente.

As células transformadas na LMC podem ser linfóides, mielóides ou indiferenciadas. BERNSTEIN e GALE (1990) sugerem que alterações citogenéticas adicionais determinam o fenótipo da fase aguda da LMC. O fenótipo agressivo e pleiotrópico da crise blástica sugere que anormalidades oncogênicas diferentes possam ser responsáveis pela transição da fase crônica para a crise blástica.

A ordem temporal das alterações secundárias pode variar, mas a via preferencial parece começar com o i(17q), seguida de +8 e +Ph, e +19 (JOHANSSON et al., 2002). A trissomia do cromossomo 8 é a mais comum das aberrações, especialmente durante a transformação mielóide. O isocromossomo i(17q) é observado quase que exclusivamente na fase blástica do tipo mielóide (MITELMAN, 1993). Em 17p13 está localizado o gene supressor tumoral *TP53*. A perda de função da proteína p53 por deleção ou mutação ocorre em aproximadamente 25%-35% dos doentes em crise blástica, mas é provável que essas mutações não sejam suficientes para desencadeá-la, o que tornaria necessárias outras

alterações genéticas. Tanto a perda do braço curto (17p-) como a duplicação do braço longo (isocromossomo 17) determinam a ausência do efeito supressor da p53 e contribuem para a progressão da doença.

Além da perda de função da p53 na formação do i(17q), numerosos eventos têm sido associados com a crise blástica, entre os quais: trissomia do cromossomo 8, amplificação do *MYC*, deleção ou rearranjo do *RB* (*RBI*) e deleção ou rearranjo da p16 (*CDKN2*), cujo gene se localiza em 9p21. A deleção homocigota do gene da p16 inibe a CDK-4, uma proteína de checagem do ciclo celular (WONG; WITTE, 2004).

A análise por *Southern blotting* mostrou que podem ocorrer múltiplos cromossomos Ph em todas as linhagens celulares durante a transformação da doença (COLLINS; GROUDINE, 1987). Essas alterações citogenéticas, que presumidamente foram adquiridas durante a fase crônica, são o fator determinante da curta sobrevida após a transformação da doença (COLEMAN et al., 1980; KANTARJIAN et al., 1987).

O padrão de evolução citogenética varia significativamente em relação ao tratamento administrado durante a fase crônica, como a trissomia do cromossomo 8, que é mais comum após a terapia com o bussulfano (encontrada em 44% dos casos) do que com a hidroxiuréia (em 12%) (JOHANSSON et al., 2002). Alterações secundárias observadas após o tratamento com INF- α ou após o TMO são raras, aparentemente aleatórias e transitórias. Uma alta incidência de translocações e deleções envolvendo 13q foi relatada em pacientes com persistência ou recidiva da doença após o TMO (CHASE et al., 2000). A presença de aberrações adicionais balanceadas, de clones divergentes, isto é, de aberrações citogenéticas não-relacionadas, adicionais à t(9;22), e de pseudodiploidia são muito mais comuns após o TMO do que após o tratamento com BUS ou HY. Essas aberrações não-comuns da LMC podem ser resultado do regime de condicionamento pré-transplante, como o efeito clastogênico da radioterapia e da ciclofosfamida, ou causadas pela alteração do microambiente pós-transplante, em decorrência das células do doador e da concomitante imunossupressão (JOHANSSON et al., 2002).

2.2.4 Aspectos moleculares da t(9;22)(q34;q11)

Os genes localizados nos pontos de quebra envolvidos na translocação entre os cromossomos 9 e 22 foram identificados como o *ABL* (*Abelson*) e o *BCR* (*breakpoint cluster region*), respectivamente.

O proto-oncogene *ABL* humano está localizado em 9q34, ocupa uma região de aproximadamente 225 kb e possui, no mínimo, 11 éxons. Esse gene contém seqüências homólogas às seqüências *v.abl* do gene Abelson da leucemia murina, associadas à transformação celular (HEISTERKAMP et al., 1982; DALEY et al., 1990).

Um mecanismo de *splicing* alternativo determina que cada um dos dois éxons na região 5' (éxons **1a** e **1b**), mas não ambos, seja traduzido com o conjunto comum dos dez éxons. Dois tipos de RNAm são transcritos: a) RNAm de 6 kb, contendo os éxons 1a-11; b) RNAm de 7 kb, contendo os éxons 1b-11 (SHTIVELMAN et al., 1986). Os transcritos codificam uma proteína de 145 kDa (p145), localizada no núcleo, que pode ligar-se ao DNA e tem baixa atividade de tirosina-quinase (YEE et al., 1999). Essa proteína possui vários domínios estruturais, três dos quais (SH1-SH3) – localizados na região amino-terminal – têm homologia *src*. A proteína *src* é uma proteína tirosina-quinase não-receptora, cuja função é a transdução de sinais de controle de crescimento, provenientes dos receptores de superfície celular ativados (LEHNINGER, 2000).

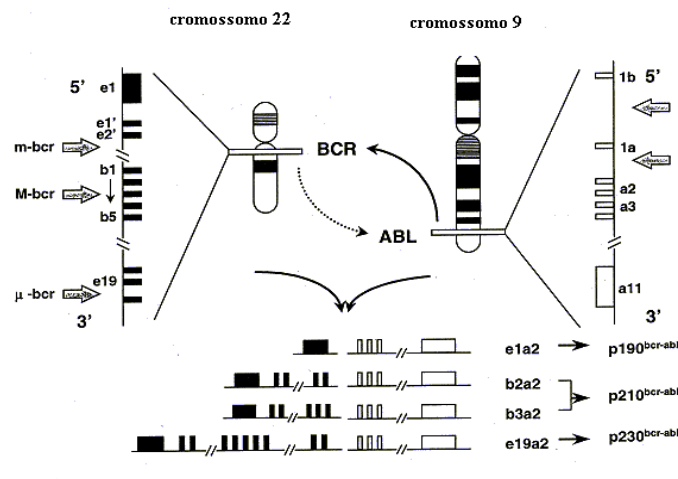
O domínio SH1 (*src homology region 1 domain*) tem função de tirosina-quinase, enquanto o SH2 (*src homology region 2 domain*) e o SH3 (*src homology region 3 domain*) permitem interações com outras proteínas (COHEN et al., 1995). O domínio SH2 reconhece tirosinas fosforiladas e o SH3, seqüências ricas em prolina. No sentido 3' da molécula são encontradas seqüências de ligação com o DNA e com a actina e sinais de localização nuclear.

A proteína normal atua na regulação do ciclo celular, na resposta celular ao estresse genotóxico e na transmissão da informação sobre o ambiente celular, por meio de sinalização de integrinas (DEININGER et al., 2000). O aumento da expressão da p145 impede a progressão do ciclo celular na fase G1/S. A atividade e a localização intracelular dessa proteína são reguladas por integrinas – tem sido postulado que o seu papel é transmitir o sinal das integrinas envolvidas no controle do ciclo celular para o núcleo (ENRIGHT; MCGLAVE, 1999).

O gene *BCR*, com atividade de quinase, localiza-se em 22q11, apresenta aproximadamente 135 kb e contém 23 éxons. Esse gene codifica uma proteína de 160 kDa, amplamente expressa em tecidos normais (COLLINS et al., 1987; SILVER et al., 1999). A p160, ou proteína BCR, é uma molécula transdutora de sinal multifuncional, que contém três domínios estruturais principais: a) a região amino-terminal, codificada pelo primeiro éxon do *BCR*, tem atividade serina / treonina-quinase (MARU et al., 1991); essa região é essencial para a ligação do domínio SH2 da proteína ABL e para a ativação tirosina-quinase desta proteína; b) a região central, que estimula a troca trifosfato de guanidina (GTP) para difosfato de guanidina (GDP); e a região carboxi-terminal, com atividade GTPase para a Rac, uma pequena GTPase da superfamília Ras, que regula a polimerização da actina e a atividade de uma oxidase NADPH nas células fagocíticas (DIEKMANN et al., 1991).

Na LMC, o produto da translocação t(9;22)(q34;q11) é o gene quimérico *BCR-ABL*, formado pela transposição da maior parte do gene *ABL* (éxons 2-11) para o cromossomo 22, onde se funde com a região 5' do gene *BCR* (HEISTERKAMP et al., 1985). O ponto de quebra no gene *ABL* é variável, e ocorre geralmente dentro do íntron, tanto entre os primeiros éxons alternativos **1b** e **1a**, como também entre os éxons **1a** e **2** (Figura 2). Três pontos de quebra são descritos no gene *BCR*: **M-bcr**, **m-bcr** e **μ-bcr** (Figura 2). Dependendo da localização do ponto de quebra, esse oncogene híbrido terá tamanhos diferentes.

FIGURA 2 - TRANSCRITOS *BCR-ABL* NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA, LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC) E LMC NEUTROFÍLICA



FONTE: <www.cancernetwork.com/journals/oncology/images/o9902af1.gif>.

Aproximadamente 98% dos pontos de quebra ocorrem numa região de 5,8 kb do gene *BCR*, conhecida como região principal de agrupamento de pontos de quebra (*major breakpoint cluster region- M-bcr*), tanto entre os éxons **b2** e **b3**, como entre os éxons **b3** e **b4** (HEISTERKAMP et al., 1985; SHTIVELMAN et al., 1985).

Dois tipos de RNAm são comumente transcritos do gene *BCR-ABL*, dependendo do tipo de fusão: 1) RNAm contendo o éxon **b3** do *BCR* que se une com o éxon **a2** do *ABL* (**b3-a2**); 2) RNAm contendo o éxon **b2** do *BCR* unido ao **a2** do *ABL* (**b2-a2**). Os tipos de junções *BCR-ABL* também têm sido designados **e13a2** (para b2a2) e **e14a2** (para b3a2) (MELO et al., 2003).

Pesquisas têm sido feitas sobre possível relação entre o tipo de rearranjo molecular e os aspectos clínicos da doença, como contagem de plaquetas no diagnóstico, duração da fase crônica etc. CERVANTES et al. (1996) estudaram 84 indivíduos com LMC em fase crônica, que estavam sendo investigados para o RNAm híbrido BCR/ABL. Seis deles (7%) exibiam no diagnóstico uma doença que se assemelhava à trombocitemia essencial (TE), por apresentar trombocitose acentuada (contagem de plaquetas entre $1\ 003 \times 10^9/L$ e $2\ 800 \times 10^9/L$) e moderada leucocitose (contagem de leucócitos de $10 \times 10^9/L$ a $19 \times 10^9/L$). Todos os seis desenvolveram leucocitose acentuada e dois morreram logo depois, um em crise blástica e outro em fase acelerada. Nesse estudo, 38 pacientes (45%) expressaram o RNAm BCR/ABL do tipo e13a2 (b2a2) e 46 (55%) expressaram o tipo e14a2 (b3a2) ou ambos. Somente um dos seis pacientes com LMC apresentando trombocitemia no diagnóstico expressou o e13a2 (b2a2), contra cinco que expressaram e14a2 (b3a2) (n= 4) ou ambos os tipos (n= 1).

O RNAm quimérico transcrito dos rearranjos e13a2 (b2a2) ou e14a2 (b3a2) tem extensão de 8,5 kb e codifica uma proteína de 210 kDa, a p210 (BEN NERIAH et al., 1986), responsável pela maioria – se não todas – das anormalidades fenotípicas da LMC em fase crônica. Muito mais raramente a LMC pode ser resultado de genes híbridos derivados de quebras nas regiões **m-bcr** (com transcritos e1a2) ou na **μ -bcr** (com transcritos e19a2). A fusão do éxon 1 do *BCR* com o éxon 2 do *ABL* produz a p190, expressa nas células de indivíduos com LLA – Ph positivo (KURZROCK et al., 1987). O rearranjo **μ -bcr**, mais raro, é resultante da quebra na região 3' do *BCR*, entre os éxons e19 e e20, e produz a p230, que está associada à leucemia crônica neutrofílica (SAGLIO et al., 1990). Pode haver co-expressão das proteínas p190 e p210 sem estar necessariamente associada à progressão da doença (SAGLIO et al., 1996).

O cromossomo derivativo 9q+ apresenta a fusão gênica recíproca *ABL-BCR*, cujo produto gênico é expresso em níveis muito baixos na metade ou em dois terços dos indivíduos com LMC, e pode não ter significado na patogênese da doença, mas, se formado, pode envolver-se na desregulação da proteína com atividade GTPase do *BCR* (CHOPRA; ÉLEFANTY, 1999; FRANKLIN; MILLS, 2000).

2.2.5 Patogênese da LMC

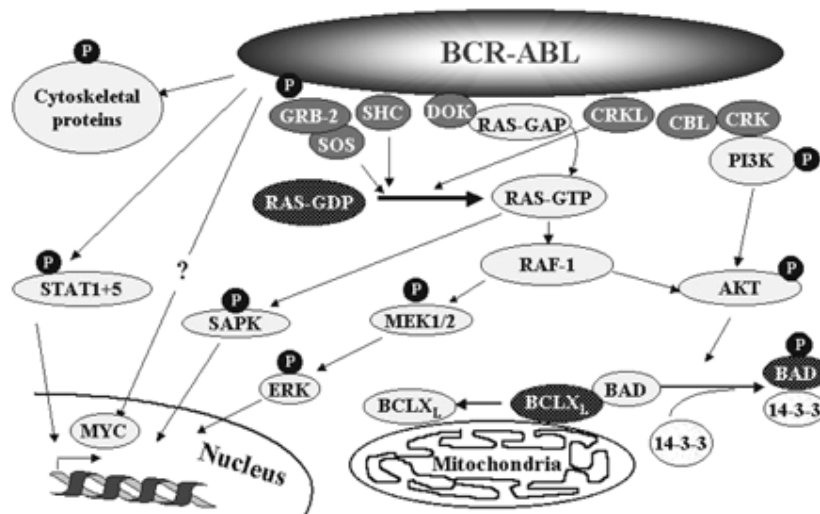
A p210 ou proteína BCR-ABL é encontrada em mais de 95% dos portadores de LMC (STANGLMAIER et al., 2003). Seu potencial leucemogênico deve-se ao fato de a atividade de tirosina-quinase da proteína ABL, normalmente regulada, ser ativada pela justaposição da seqüência BCR. A p210 transduz sinais para várias vias de maneira autônoma, determinando a transformação maligna pela interferência no processo celular básico, como controle da proliferação (Puil et al., 1994), aderência (Gordon et al., 1987) e morte fisiológica (Cortez et al., 1995) (citados por KANTARJIAN et al., 2000). Análises mutacionais identificaram vários domínios na proteína BCR-ABL que são essenciais para a transformação celular.

Na região correspondente à Abl estão incluídos os domínios SH1, que codifica a tirosina-quinase; SH2; o sinal de localização nuclear C-terminal (*C-terminal nuclear localization signal* -NLS) e os domínios de ligação com a actina e com o DNA. Na porção Bcr são encontrados: a região *coiled-coil*, codificada pelo primeiro éxon do *BCR* e localizada entre os aminoácidos 1-63, que é responsável pela dimerização da oncoproteína; a tirosina da posição 177, crucial para a ligação das proteínas adaptadoras, como a Grb-2; e os resíduos fosfoserina/fosfotreonina amino-terminais, necessários para a interação entre as proteínas e o SH2, incluindo a própria Abl (MELO et al., 2003).

Ambas as proteínas anormais (p210 e p190) exibem atividade tirosina-quinase aumentada, quando comparadas com a proteína normal p145. Enquanto esta se localiza no núcleo, a p210 fica no citoplasma (VAN-ETTEN et al., 1989), onde é encontrada num complexo com proteínas do citoesqueleto e de adesão local por meio de interações envolvendo o domínio carbóxi-terminal de ligação com a actina. A localização da oncoproteína quimérica é importante na transformação celular, pois facilita a interação com diferentes alvos.

A justaposição da seqüência Bcr promove a dimerização da oncoproteína, de maneira que as duas moléculas BCR-ABL adjacentes fosforilem suas respectivas parceiras nos resíduos de tirosina, nas alças de ativação de quinases (McWhirter, 1993, citado por MELO, 2003). Grande número de substratos podem ser fosforilados pela BCR-ABL (Figura 3). Devido à autofosforilação, há um acentuado aumento de fosfotirosina nessa proteína híbrida, criando sítios de ligação para os domínios SH2 de outras proteínas.

FIGURA 3- MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SINALIZAÇÃO POR BCR-ABL



FONTE: HEMATOLOGY. Am. Soc. Hematol. Educ. Program, p. 91, 2000.

Em geral, os substratos da BCR-ABL podem ser agrupados, segundo seus papéis fisiológicos, em moléculas adaptadoras (Grb-2, Crkl e Dok); proteínas associadas com a organização do citoesqueleto e da membrana celular (paxilina, talina e Fak) e proteínas com funções catalíticas (tirosina-quinase Fes não-receptora, quinase PI-3 e fosfatase Syp). A escolha do substrato depende do contexto celular: Crkl é a principal proteína fosforilada por tirosina nos neutrófilos da LMC, enquanto Dok fosforilada é observada predominantemente nas células progenitoras mais imaturas.

As sinalizações controladas pela BCR-ABL são complexas e altamente redundantes. Sua atividade quinase desregulada substitui as funções fisiológicas da enzima Abl normal, interagindo com uma variedade de proteínas efetoras. A soma dessas interações protéicas se traduz no fenótipo alterado das células leucêmicas, isto é, no desenvolvimento da independência em relação ao fator de crescimento, na proliferação celular desregulada, na aderência

defeituosa às células do estroma e da matriz extracelular e na redução da resposta apoptótica ao estímulo mutagênico.

As células que expressam a p210 são resistentes à indução de apoptose por drogas citostáticas e radiação ionizante (BEDI et al., 1995; NISHII et al., 1996). O oncogene *BCR-ABL* previne essas células de entrar em apoptose, por induzir a via de expressão do *BCL2*. Se a expressão deste gene for suprimida, as células reverterem a dependência de fator de crescimento e de não-tumorigenicidade. A correção de qualquer uma das características do fenótipo alterado por um procedimento terapêutico, racionalmente idealizado, pode restabelecer a hematopoese normal.

2.2.6 Diagnóstico da LMC

O diagnóstico da doença é feito por exame clínico; por exame citológico do sangue periférico, com contagem global completa, incluindo plaquetas e contagem diferencial dos leucócitos; por análise do aspirado da medula óssea, com a percentagem de blastos e de basófilos; por biópsia da medula óssea e por análise citogenética clássica para a detecção do cromossomo Philadelphia e de outros marcadores da evolução cariotípica.

A contagem de leucócitos no diagnóstico, que é geralmente maior que $25 \times 10^9/L$, fica, muitas vezes, entre $100 \times 10^9/L$ e $500 \times 10^9/L$. A contagem diferencial mostra os granulócitos em todas as fases de maturação e basofilia, com ou sem eosinofilia. É comum a presença de anemia discreta e de trombocitose. A atividade da fosfatase alcalina dos leucócitos fica reduzida em quase todos os pacientes e pode ser usada para distinguir a LMC de outras doenças mieloproliferativas. A medula óssea, geralmente hiper celular devido à intensa hiperplasia mielóide, pode exibir fibrose, especialmente com a progressão da doença, confirmada por biópsia (ENRIGHT; McGLAVE, 1999).

O cromossomo Philadelphia (Ph) é identificado pela citogenética clássica em aproximadamente 90% dos casos de LMC, mas não é patognomônico dessa doença, uma vez que na leucemia linfoblástica aguda (LLA) está presente em 25% dos indivíduos adultos e em 3%-5% de crianças (BEHM, 1996), e em LMA em 2% dos doentes (LEE, 2000).

No exame citogenético são analisadas 20 a 25 metáfases por amostra de medula óssea. Embora metodologicamente essa análise não seja rápida, é o método de escolha para o diagnóstico da LMC, pela confiabilidade que proporciona. A sensibilidade do método é superior a 90%, com um limite de detecção celular de 1:20 (uma célula maligna para vinte

células normais) (YEE et al., 1999). BEIGUELMAN(1982) estimou que, na análise de 20 metáfases, a probabilidade de detectar uma célula pertencente a uma população com ocorrência inferior a 10% de quimerismo ou mosaicismo é de 85% (ver início da Discussão).

Cinco por cento dos indivíduos que são Ph negativos mas possuem o rearranjo molecular (*BCR-ABL*) são diagnosticados por técnicas moleculares, entre as quais a de FISH, a PCR e a análise por *Northern* ou *Southern blotting*. As técnicas moleculares são também usadas para distinguir casos de LLA com cromossomo Philadelphia, das crises blásticas linfóides da LMC, uma vez que por citogenética clássica não é possível identificar os diferentes rearranjos moleculares resultantes da translocação nas duas doenças. Como já foi explicado no item 2.2.4, o produto protéico na LLA é a p190 e na LMC é a p210.

Na técnica do *Southern blotting* para detectar o rearranjo *BCR/ABL* é usado o DNA genômico, após digestão com endonucleases de restrição. O DNA pode ser extraído das células do sangue ou da medula óssea, frescas ou congeladas. A sensibilidade do método é dependente da distribuição espacial dos pontos de quebra e da combinação da sonda com a enzima de restrição. A limitação do método deve-se à ocorrência de pontos de quebra fora da região M-BCR. A sensibilidade desse método para detectar o rearranjo é de aproximadamente 98%, com um limite de detecção celular de 1:20 a 1:100, mais sensível do que a citogenética clássica (YEE et al., 1999).

A técnica de FISH é usada não só para determinar genes ou regiões particulares envolvidos na translocação, mas também deleções e amplificações cromossômicas (ROWLEY, 1999). Essa técnica permite a análise de células tanto em metáfase como na interfase (i-FISH), por meio do uso de sondas específicas para os genes *BCR* e *ABL*; além disso, os resultados são facilmente quantificáveis.

O i-FISH é realizado com células do sangue periférico, o que dispensa a necessidade de aspirar medula óssea. É um método rápido, permite a análise de um número maior de células do que o possível com a citogenética clássica e pode identificar translocações variantes envolvendo qualquer um dos dois genes (BEHM, 1996; ENRIGHT; McGLAVE, 1999; FRANKLIN; MILLS, 2000). Entretanto fornece resultados falso-positivos acima de 10%.

O h-FISH (*hypermetaphase fluorescence in situ hybridization*) permite a análise de mais que 500 metáfases por amostra, é realizado com células da medula óssea e não fornece resultado falso-positivo. A sensibilidade do FISH para detectar a doença residual mínima (DRM) é superior a 98%, com um limite de detecção celular de 1:20 a 1:100 (YEE et al., 1999). Na DRM as células malignas compreendem menos que 1% da população celular total.

O método mais sensível para detecção de células leucêmicas residuais é o da RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*). Nessa técnica, o DNAC sintetizado a partir do RNAm é amplificado por PCR. Existem oligonucleotídios iniciadores (*primers*) e sondas para os transcritos e13a2 (b2a2), e14a2 (b3a2) e para a forma variante da LLA, e1a2. A técnica pode ser realizada com uma ou duas seqüências de amplificação. A primeira é menos sensível e detecta uma célula maligna para 10^3 a 10^6 células normais. Na segunda, em que se utiliza o produto da primeira para ser amplificado com *primers* mais internos (*nested PCR*), a sensibilidade aumenta para uma célula maligna detectada contra 10^5 a 10^7 células normais (YEE et al., 1999). Os resultados são expressos como a razão BCR-ABL/ABL ou BCR-ABL/BCR (CROSSMAN et al., 2004a).

O objetivo de detectar precocemente a DRM é de permitir uma intervenção terapêutica antes que ocorra franca recidiva, resistente à terapia (FADERL et al., 2004). Estudo realizado por RADICH et al. (1995) com 346 pacientes mostrou uma clara associação entre a recidiva da doença e a DRM detectada por PCR. A detecção de DRM logo após o TMO não necessariamente indica mau prognóstico, assim como uma amostra PCR positiva obtida dentro dos três primeiros meses após o transplante não é informativa para o acompanhamento clínico, uma vez que não houve tempo suficiente para que o clone residual do receptor fosse totalmente substituído pelas células do doador. Já amostras positivas de medula óssea ou de sangue periférico após seis meses do transplante indicam recidiva subsequente.

GUTIERREZ et al. (2005) aperfeiçoaram o método RT-PCR em um teste por PCR em tempo real, capaz de identificar e quantificar os diferentes transcritos BCR/ABL. Esse método tornou-se o exame apropriado para a detecção da DRM tanto nos pacientes com LLA, como nos pacientes com LMC, submetidos ao TMO ou em tratamento com INF- α ou com mesilato de imatinibe. Segundo GOLDMAN (2005), os pacientes com LMC devem ser monitorados rotineiramente por análise citogenética da medula óssea até quando não forem mais observadas células Ph+. Desse momento em diante devem ser feitas análises por PCR quantitativo de três em três meses. Apesar da sensibilidade do método, a RT-PCR qualitativa e quantitativa pode não detectar células positivas, por não estar sendo transcrito o produto gênico em questão no momento da análise (FRANKLIN; MILLS, 2000).

2.2.7 Definição de remissão hematológica e citogenética

KANTARJIAN et al. (2003), em estudo comparativo entre 187 doentes tratados com mesilato de imatinibe e 650 tratados com INF- α , usaram os seguintes critérios de resposta hematológica ao tratamento:

- a) *remissão hematológica completa*: quando permanecem normais por quatro semanas, no mínimo, a medula óssea ($\leq 5\%$ de blastos); o sangue periférico ($< 10 \times 10^9/L$ e sem formas imaturas); e as plaquetas ($< 450 \times 10^9/L$), além de desaparecerem todos os sinais e sintomas da LMC;
- b) *resposta hematológica parcial*: consideram-se os mesmos critérios da resposta completa – com exceção da persistência de células imaturas (mielócitos e metamielócitos) –, e mais: esplenomegalia 50% menor do que antes do tratamento ou trombocitose maior que $450 \times 10^9/L$, mas 50% menor que o valor anterior ao tratamento.

Em estudo realizado por Talpaz et al. (2002), a resposta citogenética – baseada na prevalência de metáfases Ph positivas em 20 células, no mínimo, em cada amostra de medula óssea – foi assim classificada: *completa* (0% de células Ph+); *parcial* (1%-35%); *menor* (36%-65%); *mínima* (66%-95%); *ausente* (95% de células Ph+). Como principal ou melhor resposta citogenética são consideradas tanto a completa como a parcial. Os critérios de resposta citogenética ao tratamento com INF- α e com mesilato de imatinibe são consensuais entre vários pesquisadores (SPENCER et al., 1995; ENRIGHT; MCGLAVE, 1999; KANTARJIAN et al., 2002), que adotam a seguinte classificação:

- *sem resposta*: $> 95\%$ de metáfases Ph+
- *resposta citogenética mínima (RCM)*: 35% a 95% de metáfases Ph+
- *resposta citogenética parcial (RCP)*: 1% a 34% de metáfases Ph+
- *resposta citogenética completa (RCC)*: sem metáfases Ph+
- *melhor resposta citogenética (MRC)*: RCP+RCC

2.2.8 Tratamento da LMC

O tratamento para LMC com cromossomo Philadelphia positivo inclui diferentes estratégias, que vão desde o simples controle na contagem de leucócitos (bussulfano,

hidroxiuréia), eliminação das células Ph positivas por substituição de células alogênicas (TCT - transplante de células-tronco) ou por supressão não-específica do clone neoplásico (INF- α).

Até recentemente, o TCT era o tratamento de escolha para todos os pacientes elegíveis, por ser o único capaz de mudar a história natural da doença. De acordo com SILVER et al. (1999), o INF- α também mostra essa capacidade e prolonga a sobrevida. Antes da introdução do TCT – quando os doentes eram tratados com a quimioterapia clássica – o tempo médio de sobrevida era de três anos, e menos de 20% dos pacientes sobreviviam após cinco anos do diagnóstico. Terapias recentes para LMC têm suprimido as células Ph positivas, mudando a história natural da doença.

2.2.8.1 A terapia clássica – quimioterapia

A fase crônica da doença pode ser controlada com o bussulfano (BUS) ou com a hidróxiuréia (HY), mas seu curso natural é apenas minimamente melhorado. Tanto BUS, agente alquilante, como HY, inibidor específico do ciclo celular para a síntese do DNA, atingem um controle hematológico em 50% a 80% dos doentes. Entretanto a remissão citogenética é rara e ambos os medicamentos têm pouco ou nenhum efeito sobre a progressão da doença. Pacientes tratados somente com essas drogas progridem inevitavelmente para a fase blástica e vão a óbito após três a seis anos. O bussulfano é administrado oralmente, age sobre o clone leucêmico e tem baixo custo. Por outro lado, seu uso prolongado pode levar a mielosupressão, fibrose pulmonar, hiperpigmentação da pele e mielofibrose; pode também provocar infertilidade permanente, o que atualmente limita seu uso a pessoas idosas; além disso, pode causar malignidades secundárias. Esse medicamento foi o principal quimioterápico usado no tratamento para a LMC durante muitos anos, substituído durante a década de oitenta pela hidróxiuréia (SILVER et al., 1999). A hidróxiuréia, por sua atividade antimetabólica, não apresenta o mesmo risco de causar malignidades secundárias e, quando usada para controlar a contagem sangüínea dentro dos limites normais, proporciona melhor resultado que o obtido com bussulfano no que se refere a sobrevida (HELMANN et al., 1993).

2.2.8.2 Interferon-alfa (INF- α)

Os interferons são uma família de proteínas produzidas por células de eucariotos, que ocorrem naturalmente em resposta à exposição a antígenos e a mitógenos, como nas infecções virais e doenças malignas. Os interferons têm efeito biológico pleiotrópico que

inclui a inibição da proliferação celular, a regulação da expressão de citocinas e a modulação do sistema de vigilância imune.

Dos três grupos de interferons já identificados (interferon-alfa, interferon-beta e interferon-gama), o interferon-alfa (INF- α) é o que tem sido mais usado no tratamento de malignidades hematológicas e tumores sólidos (FADERL; KANTARJIAN; TALPAZ, 1999). O INF- α ou interferon leucocitário é uma citocina produzida por linfócitos B, por macrófagos e por células NK (*natural killer*), com atividade antitumoral em malignidades hematológicas e outros tipos de câncer (VIAL; DESCOTES, 1994).

As células na fase crônica da LMC são sensíveis a fatores de crescimento hematopoético e a citocinas. Doentes tratados com INF- α podem obter significativa redução de células Ph positivas na medula óssea, chegando alguns a apresentar completa remissão citogenética, embora quase todos permaneçam com o rearranjo *BCR-ABL*, evidenciado por técnicas moleculares.

Desde os anos oitenta o INF- α tem sido usado para regular a proliferação do clone Ph positivo. Seu uso na LMC foi avaliado primeiramente (Fase I) pelo grupo de pesquisadores do *M.D. Anderson Cancer Center*, Houston, 20 anos atrás. TALPAZ et al. (1983) descreveram os benefícios terapêuticos desse medicamento em estudo realizado com sete pacientes de LMC que receberam doses diárias de 9 a 15 milhões de unidades internacionais (MIUs - *million international units*), cinco dos quais obtiveram remissão hematológica. Outro estudo, com 51 pacientes de LMC em fase crônica, no qual a dose usada foi de 3 a 9 MIUs/d, resultou em satisfatório controle da doença em 36 pacientes (71%), dos quais 20 obtiveram redução na percentagem de células Ph positivas (TALPAZ et al., 1987). Por essa razão, o INF- α foi a primeira droga não-mielotóxica capaz de reduzir o número de células leucêmicas e de controlar a progressão da doença na fase crônica. Vários estudos subsequentes (Fase II) realizados por uma única instituição ou por grupos cooperativos confirmaram a eficácia do INF- α (Quadro 2). KANTARJIAN et al. (1995), no *M.D. Anderson Cancer Center*, trataram 274 doentes com INF- α em doses diárias de 5 MIU/m², e os resultados obtidos foram resposta hematológica completa em 80% dos pacientes, resposta citogenética em 58% e sobrevida média de 89 meses. A obtenção de resposta citogenética após 12 meses de terapia foi associada com sobrevida estatisticamente mais longa. Aos 5 anos do tratamento o índice de sobrevida foi de 90% para resposta citogenética completa, 88% para resposta citogenética parcial e de 76% para resposta citogenética mínima; e 38% em outras categorias de resposta.

Nesse estudo, a melhora na sobrevida resultou de retardo na progressão para a crise blástica e foi independente de tratamentos anteriores.

QUADRO 2- FASE II DAS PESQUISAS SOBRE A EFICÁCIA DO INF-A NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

ESTUDO	N ^(*)	DOSE DE alfa- INF	RHC ^(**) (%)	RESPOSTA CITOGENÉTICA (%)		
				Qualquer	Melhor	Completa
KANTARJIAN et al. (1995)	274	5 MIU/m ² /d	80	58	38	26
MAHON et al. (1994)	52	5 MIU/m ² /d	81	—	49	—
OZER et al. (1993)	107	5 MIU/m ² /d	59	21	18	—
NIERDELE et al. (1993)	58	4 MIU/m ² /d	46	36	—	—
ALIMENA et al.(1989) ^(***)	63	5 e 2 MIU/m ² /s	46	70	2	—
FREUND et al. (1989)	10	5 MIU/m ² /d	33	0	0	0
SCHOFIELD et al. (1994)	27	2 MIU/m ² /d e semanal.	70	33	22	7

FONTE: GUILHOT et al., 2004, p.586.

(*) Número de pacientes. (**) Resposta hematológica completa.

(***) Estudo randomizado com 5 MIL/m² versus 2 MIL/m² — = não avaliado.

Os resultados dos estudos apresentados no Quadro 2 deram suporte à dose recomendada de INF- α em 5 MIL/m²/d, por via subcutânea. Essa dosagem foi selecionada para subseqüentes estudos randomizados que testaram o INF- α isolado ou em combinação com outras drogas.

Alguns protocolos, entretanto, enfocaram a questão crucial da dose em relação a qualidade de vida, aceitação e custo. Dois grupos nacionais, Reino Unido e Holanda, esboçaram estudos prospectivos para comparar a dose padrão com doses mais baixas. Resultados preliminares sugeriram que os índices de resposta e de sobrevida são idênticos (citados por GUILHOT et al., 2004).

Segundo um estudo colaborativo mundial realizado com 1 554 pacientes randomizados para sete tipos de protocolos, verificou-se que os experimentos com INF- α apresentaram sobrevida estatisticamente maior do que os realizados com hidroxiuréia ou bussulfano. O índice de maior de 5 anos foi de 57% com INF- α e 42% com quimioterapia (TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1997).

Muitas evidências sugerem que o INF- α é mais eficaz quando combinado com outras drogas e quando administrado no início da fase crônica. Na tentativa de melhorar o

índice e a duração da resposta, o INF- α tem sido testado em conjunto com agentes quimioterápicos. Índice maior de resposta citogenética pode ser obtido mediante aumento da mielossupressão, com a combinação de drogas mielotóxicas como o arabinosídeo de citosina (Ara-C), que mostrou reduzir significativamente as metáfases Philadelphia positivas quando testado com o α -INF.

Em um protocolo randomizado de α -INF/ Ara-C (n=360) e INF- α isolado (n=361) para o tratamento de doentes recém-diagnosticados, o índice de RHC foi de 66% *versus* 55% (p=0,003), e a MRC observada após 12 meses foi de 41% *versus* 24% (p<0,001), mostrando superioridade significativa de resposta dos pacientes que haviam recebido o Ara-C (GUILHOT et al, 1997). A adição da citarabina ao tratamento com o INF- α melhora a sobrevida, mas aumenta a toxicidade (SILVER et al., 1999).

O acompanhamento de 512 indivíduos tratados com terapias baseadas no α -INF, no período de 1981 a 1995, mostrou que 140 (27%) obtiveram RCC, que foi durável (mediana de 10,6 anos) em 44 pacientes (31%) ou em aproximadamente 10% de todos os pacientes (KANTARJIAN et al., 2003a). A correlação entre a RCC e a sobrevida foi sustentada pela análise de vários estudos sobre o tratamento com o α -INF, que mostrou os melhores resultados em doentes de baixo risco. A RHC foi atingida em 3-6 meses, a MRC em 1 ano e a RCC após 1 ano (BACCARANI et al., 2003). Aproximadamente 50% dos pacientes que atingem RCC têm longa sobrevida; entre os que atingem a melhor resposta citogenética, o índice de sobrevida de 10 anos é de 70% ou mais (KANTARJIAN et al., 2002a).

A terapia com o INF- α está associada com importante toxicidade. A maioria dos pacientes exibe uma síndrome semelhante à da gripe (febre, calafrios, mialgia, dor de cabeça), náusea, vômitos e diarreia. Efeitos adversos tardios são limitados à dose em somente 20% dos pacientes. Em geral, 10% a 25% dos doentes interrompem a terapia por causa da intolerância (STONE, 2004).

2.2.8.3 Transplante alogênico de medula óssea (TMO) ou, em sentido mais amplo, transplante de células-tronco (TCT)

O transplante de medula óssea (TMO) alogênico foi primeiramente introduzido no final dos anos 60 para tratar deficiências congênitas imunológicas e outras doenças hematológicas não malignas. Nos anos 70, E. Donnall Thomas e colegas mostraram que alguns pacientes com leucemia aguda refratária obtinham sobrevida longa e livre de doença após

quimioterapia em altas doses, seguida de transplante da medula óssea de irmão HLA-idêntico. No final dos anos 70 e início dos anos 80, o TMO – tanto alogênico (de outro indivíduo) como singênico (de gêmeo idêntico) – mostrou ser capaz de induzir remissão citogenética e sobrevida longa e livre de doença nos pacientes com LMC (PASSWEG, 1998; NOWELL, 2002).

Embora tivesse sido demonstrado pela primeira vez em cães (1950), o TMO só se tornou opção terapêutica quando a reação da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) foi suficientemente controlada. Na década de 90 esse procedimento se tornou mais sofisticado. Técnicas foram desenvolvidas para gerar populações de células-tronco hematopóéticas da medula óssea e do sangue periférico não só para transplantes alogênicos como também para isolar células-tronco autólogas, livres de células Ph positivas.

As células-tronco usadas para o transplante alogênico podem ser obtidas tanto da medula óssea e do sangue periférico, como também do cordão umbilical. Por essa razão, o que antes era conhecido como transplante de medula óssea atualmente é generalizado como transplante de células-tronco. Em ambas as circunstâncias o paciente é submetido a altas doses de quimioterapia, com o objetivo de eliminar as células leucêmicas antes do transplante, e esse tratamento agressivo limita, em certo grau, a seleção dos doentes considerados apropriados para tal procedimento (NOWELL, 2002).

As opções de tratamento para os portadores de LMC continuam a aumentar, mas o TMO permanece como a única terapia curativa para essa doença. Infelizmente somente 35% (KOLIBABA et al., 2000) a 40% (STONE, 2004) dos doentes são submetidos a esse procedimento, pela limitação da idade e de disponibilidade de doador HLA compatível.

Os resultados obtidos de estudos sobre TMO na LMC relatam índices de 55%-80% de sobrevida prolongada – com a mediana de sobrevida maior que 10 anos para doentes submetidos ao transplante durante a fase crônica – quando usados novos métodos de profilaxia da DECH e do citomegalovírus (CMV) (KOLIBABA et al., 2000).

A fase da doença na época do transplante interfere no sucesso do procedimento. Dos 5 816 transplantes de medula óssea entre irmãos HLA-idênticos para o tratamento da LMC em fase crônica, realizados no período de 1994 a 1999 e informados ao IBMTR, a probabilidade de três anos de sobrevida foi de $69\% \pm 2\%$ para 2 876 transplantes realizados dentro do primeiro ano pós-diagnóstico e de $57\% \pm 3\%$ para 1 391 transplantes feitos com mais de um ano de diagnóstico.

Transplantes com doadores não-aparentados podem curar a LMC, mas estão associados com riscos maiores de DECH e de mortalidade relacionada ao transplante (IBMTR, 2002). Os resultados do TMO alogênico para LMC são bem melhores quando a doença está em fase crônica do que em fases mais avançadas. Os índices de sobrevida prolongada são de 50%-60% para transplantes feitos na fase crônica, com medula óssea de irmão de doador HLA compatível; de 15%-20% para transplantes feitos durante a fase acelerada e menor do que 10% para transplantes feitos durante a crise blástica (GRATWOHL et al., 1996).

O TMO alogênico está associado com altos índices de morbidade e mortalidade devido à toxicidade do regime de condicionamento prévio ao transplante, à DECH e às complicações de infecções. O índice de mortalidade no primeiro ano pode ser de 5% a 50%, dependendo da idade do paciente, do tipo de célula transplantada, do grau de compatibilidade, da sorologia para CMV, da profilaxia com antibióticos e da profilaxia para a DECH.

As causas mais importantes de risco no tratamento são recidiva da doença e de mortalidade relacionada ao transplante, que têm índices mais baixos quando é feito em primeira fase crônica (PASSWEG, 1998). Os índices de recidiva são menores para transplantes feitos na fase crônica (10%-20%), são intermediários na fase acelerada (aproximadamente 25%) e são altos na crise blástica ($\geq 60\%$) (HOROWITZ et al, 1996). A maior parte das recidivas ocorre nos dois ou três anos após o transplante.

Nos pacientes submetidos ao transplante existe forte evidência de regulação imunológica da doença residual mínima, mediada por linfócitos T do doador. O efeito anti-leucêmico mediado pelo enxerto no transplante alogênico é conhecido como *graft versus leukemia (GVL)*. A importância do GVL é evidenciada pelo baixo risco de recidiva apresentado por pacientes que desenvolvem a DECH, após transplante com medula óssea de irmão HLA-idêntico. Nos transplantes singênicos não ocorre a DECH e o risco de recidiva é alto. Transplantes com infusão de medula óssea depletada de células T estão associados com risco de recidiva similar ao do transplante entre gêmeos idênticos (APPERLEY et al., 1986; PASSWEG et al., 1998), porque o efeito GVL é anulado. Uma resposta do tipo GVL efetiva é obtida com a infusão de linfócitos do doador (ILD) na recidiva pós-transplante. As células T do doador, presentes na infusão, reagem contra as células leucêmicas do receptor, recuperando a pega do transplante e obtendo remissão hematológica, citogenética e molecular (PASSWEG et al., 1998).

Num estado normal não há resposta imunológica para a LMC, possivelmente devido à ausência de moléculas co-estimuladoras na superfície das células leucêmicas. A LMC, todavia, está associada a uma nova mutação gênica que produz uma tirosina-quinase quimérica estranha ao organismo, que pode gerar antigenicidade. Várias estratégias têm sido propostas para estimular a resposta imune contra a LMC. Uma tentativa é a de aumentar a imunogenicidade pelo aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (FRANKLIN; MILLS, 2000).

A recidiva após transplante alogênico tem sido tratada com ILD, com INF- α ou com um segundo transplante. Embora a ILD forneça resposta molecular completa (ausência da oncoproteína BCR-ABL) em 60% a 70% das recidivas em fase crônica, pode também causar recorrência da DECH, complicações associadas com a mielossupressão e morte. A terapia baseada no INF- α tem sucesso moderado, induzindo resposta em 40% a 50% dos pacientes. Um segundo transplante pode ser necessário se a recidiva ocorrer dentro de 12 meses após o primeiro, mas esse procedimento é restrito a pacientes que não respondem à ILD. Em geral, a ILD é a primeira indicação de tratamento para os pacientes que recidivaram após o transplante (KANTARJIAN et al., 2002b). A fase da doença na recidiva é fundamental para prever sua evolução. Quando a recidiva é detectada por análise citogenética ou molecular, a ILD é caracteristicamente eficaz, enquanto pouco efeito tem na recidiva hematológica (KOLIBABA et al., 2000).

A análise citogenética clássica da medula óssea após o transplante permite o monitoramento da doença por meio do cromossomo Ph, do complemento sexual ou de variantes cromossômicas polimórficas (RIBEIRO, 1993; RIBEIRO et al., 1996) e é a única metodologia capaz de fornecer informações sobre todo o cariótipo, embora seja menos sensível para identificar as células residuais. O FISH interfásico ou metafásico é mais eficaz, mas a técnica mais sensível é a RT-PCR, tanto qualitativa como quantitativamente.

A persistência de resultados RT-PCR negativos após o transplante indica remissão durável, ao passo que o aumento dos níveis de transcritos BCR-ABL geralmente precede recidiva citogenética. Em geral, a recidiva da LMC após o TMO pode ser reconhecida pelo aumento de transcritos BCR-ABL no sangue periférico; subseqüentemente, as células Ph positivas podem ser identificadas na medula óssea, e, eventualmente, os pacientes mostram evidências de recidiva hematológica. Ocasionalmente, as recidivas citogenética e molecular são transitórias, entretanto são raras. Essas recidivas são detectadas nos exames de rotina e

desaparecem sem tratamento. A recidiva citogenética é definida pela presença de uma ou mais células Ph, sem evidência de recidiva hematológica (DAZZI et al., 2000).

Pacientes com sobrevida de longa duração após TMO podem apresentar resultados negativos para o rearranjo *BCR-ABL* em reações de PCR de alta sensibilidade. Entretanto, se a célula primitiva Ph positiva não estiver transcrevendo o RNA quimérico no momento do estudo, o teste pode fornecer resultados falso-negativos. Além disso, indivíduos normais também podem apresentar células com o rearranjo *BCR-ABL*, e ainda não se sabe o significado desse fato (STRYCKMANS et al., 1995). O uso de uma técnica muito sensível para detectar essas células antes ou depois do TMO poderá gerar mais dificuldade do que esclarecimentos na interpretação (NOWELL, 2002).

2.2.8.4 Estratégias terapêuticas moleculares

O objetivo das estratégias terapêuticas curativas é a eliminação das células precursoras Ph positivas. Muitos inibidores da proteína BCR-ABL que têm sido desenvolvidos são altamente potentes e agem por inibição seletiva, eliminando a maioria das células progenitoras primitivas malignas em proliferação, com mínimo efeito sobre as células progenitoras normais. Entretanto muitas células-tronco do clone maligno estão quiescentes num dado momento, o que as torna relativamente resistentes aos inibidores da tirosina-quinase e a outros medicamentos. Segundo CLARKSON et al. (2003), essa é a principal razão da incapacidade de curar a doença no tratamento inicial uma vez que o principal mecanismo de resistência aos inibidores durante o tratamento são as mutações dentro do domínio da quinase da BCR-ABL.

Estudos sobre os mecanismos de sinalização celular ativados durante a transformação maligna induzida pelo *BCR-ABL* têm indicado vários alvos em potencial para novas estratégias terapêuticas. Uma das primeiras estratégias envolve o uso de oligonucleotídeos *antisense* para tentar inibir a tradução do *BCR-ABL* ou do *MYC*. Uma variação da tecnologia *antisense* é o uso de ribozimas para inibir a transcrição gênica. Ribozimas são moléculas de RNA com atividade enzimática, que podem clivar o RNA não-enzimático de maneira seqüência-específica. Ribozimas para o RNAm originado do *BCR-ABL* diminuem a proliferação celular, os níveis de RNAm e de proteína e a tumorigenicidade em células murinas (FRANKLIN; MILLS, 2000).

2.2.8.4.1 Mesilato de imatinibe

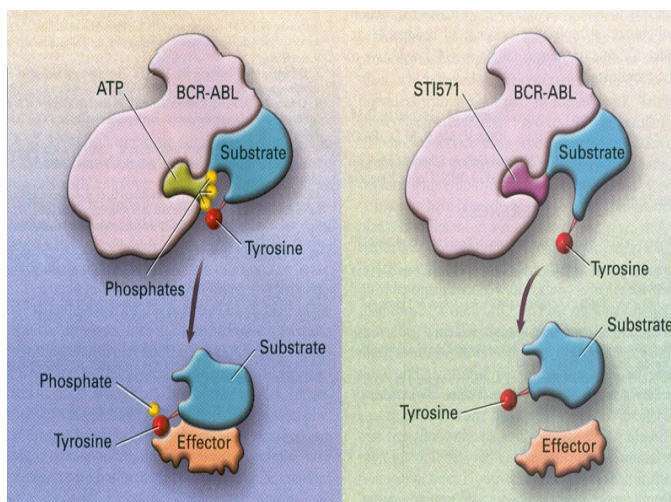
O domínio SH1 da BCR-ABL é um alvo molecular para o tratamento da LMC, por ter papel essencial na leucemogenicidade da oncoproteína, por meio de sua atividade tirosina-quinase. Inicialmente, pesquisas de produtos naturais para compostos antagônicos da atividade catalítica da BCR-ABL identificaram potenciais candidatos, como a genisteína (isoflavonóide) e a herbimicina-A (antibiótico). Tentativas subseqüentes foram feitas a partir de compostos sintéticos com estruturas químicas capazes de competir tanto com o trifosfato de adenosina (ATP) como com o substrato do sítio de ligação no domínio da quinase.

O melhor inibidor sintético de ligação com o ATP é o 2-fenilaminopirimidina ou mesilato de imatinibe, antes denominado STI571 (Glivec® ou Gleevec™, da Novartis Pharma, Basel, Suíça) (DRUKER et al., 1996). Anteriormente, supunha-se que esse composto agia diretamente como um inibidor competitivo do ATP, mas hoje se sabe que ele ocupa somente parte do espaço de ligação com o ATP na enzima ABL (Figura 4) e atue principalmente por ligar e estabilizar a BCR-ABL na sua forma inativa, de maneira que a oncoproteína não se ligue ao ATP (Schindler et al., 2001; Nagar et al., 2002; Gambacorti-Passerini et al., 2003 – citados por GOLDMAN, 2004).

O mesilato de imatinibe é um potente inibidor de quatro proteínas tirosina-quinases: da autofosforilação da ABL, do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor receptor* – PDGFR-A e B), do receptor KIT (receptor do fator de células-tronco) e da ARG (*Abelson-related gene*), em concentração submicromolar (Buchdunger et al., 2000; Okuda et al., 2001 – citados por MELO, 2003). Das 100 ou mais tirosina-quinases humanas conhecidas, somente a p210 é inibida com a eficiência demonstrada pelo mesilato de imatinibe, e essa seletividade, presumivelmente, explica sua relativa ausência de toxicidade (GOLDMAN, 2004).

O composto é um inibidor de transdução de sinal (*signal transduction inhibitors* – STI) que inibe a função tirosina-quinase da p210 impedindo que as células que a expressam se proliferem (DEININGER et al., 1997; KANTARJIAN et al., 2002a).

FIGURA 4. MECANISMO DE AÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE



LEGENDA: substrate= substrato; tyrosine= tirosina; phosphates= fosfatos; effector= efetor; STI571= nome do mesilato de imatinibe antes de ser aprovado.

FONTE: GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. N.England J.Med, v.344, p.1084-1086,2001.

A inibição da oncoproteína resulta na modulação transcricional de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, na adesão celular e na organização do citoesqueleto, resultando na apoptose das células Ph positivas (DEININGER et al., 2000). Em ensaios clonogênicos, há um decréscimo de 95% no número de células Ph positivas, mas sem inibição de formação de colônias de células normais. A inibição seletiva do crescimento pode ser demonstrada para as linhagens *BCR-ABL+* tanto *in vitro* (DEININGER et al., 1997) como em camundongos (DRUKER et al., 1996; Le COUTRE et al., 1999).

Em junho de 1998, pela primeira vez, esse composto foi administrado a um paciente com LMC (DRUKER et al., 2001), e desde então continua mostrando eficiência no tratamento da doença. O mesilato de imatinibe foi avaliado inicialmente em 83 portadores de LMC em fase crônica, refratários ao tratamento com $INF-\alpha$. Nesse primeiro estudo ou Fase I, as doses do medicamento foram de 25 mg/dia a 1 000 mg/dia (DRUKER et al, 2001). Os efeitos adversos apareceram com doses acima de 750 mg, e a relação dose/resposta foi evidente. Os pacientes que receberam doses iguais ou superiores a 300 mg obtiveram 98% de resposta hematológica completa (RHC) em quatro semanas; desses, 31% tiveram resposta citogenética parcial e 13% resposta citogenética completa. Não foi identificada a dose

máxima tolerada, principalmente porque os pacientes que receberam 400 mg exibiram níveis plasmáticos do medicamento com correlação adequada aos níveis de morte celular *in vitro* e de inibição da atividade tirosina-quinase do *BCR/ABL in vivo*, ficando, portanto, essa dosagem como a recomendada para os futuros estudos.

Em junho de 1999 três amplos protocolos multinacionais iniciaram a Fase II da avaliação terapêutica do mesilato de imatinibe. Em um, o novo medicamento foi administrado na dose de 400 mg/dia para 532 portadores de LMC que não haviam respondido ao tratamento com INF- α (KANTARJIAN et al., 2002a). Os outros dois protocolos avaliaram o mesilato de imatinibe nas doses de 400 mg/dia e 600 mg/dia em 235 pacientes em fase acelerada (TAPAZ et al., 2002) e em 260 pacientes em crise blástica mielóide (SAWYERS et al., 2002), respectivamente. Os efeitos colaterais mais freqüentes foram náusea leve, vômitos, edema e câimbras. Raros efeitos adversos graves foram descritos, como síndrome de retenção de líquido ou de toxicidade hepática. As citopenias foram mais comuns na doença em estágio avançado, sugerindo que foram causadas antes pelo comprometimento da reserva medular do que por toxicidade direta à droga (CROSSMAN; O'BRIEN, 2004a).

Os protocolos da Fase II demonstraram que quanto mais cedo o mesilato de imatinibe é usado na fase crônica, melhor é a resposta citogenética. Também se observou que boas respostas hematológica e citogenética estão associadas com melhor sobrevida livre de progressão da doença (Quadro 3). Num dos estudos da Fase II, pacientes em fase crônica com doença refratária ao INF- α mostraram com o mesilato de imatinibe 95% de resposta hematológica completa, 60% de melhor resposta citogenética e 95% de sobrevida estimada em 1,5 ano (KANTARJIAN et al., 2002a).

QUADRO 3 – RESULTADOS DA FASE II SOBRE A EFICÁCIA DO MESILATO DE IMATINIBE NO TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

RESPOSTA	FASE CRÔNICA REFRATÁRIA AO ALFA- INF (%)	FASE ACELERADA (%)	CRISE BLÁSTICA (%)
Resposta hematológica completa	95	34	8
Melhor resposta citogenética	60	24	16
Resposta citogenética completa	41	17	7
Progressão da doença	11	40	80

FONTE: CROSSMAN; O'BRIEN, 2004a, p.606.

Com os resultados das Fases I e II, o mesilato de imatinibe foi considerado eficaz no tratamento da LMC e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 10 de maio de 2001.

Entre junho de 2000 e janeiro de 2001, 1 106 indivíduos com pouco tempo de diagnóstico (seis meses) em fase crônica de LMC fizeram parte do protocolo *International Randomized Study of Interferon versus STI571* (IRIS), denominado Fase III. O objetivo do estudo era investigar se o tratamento inicial com mesilato de imatinibe poderia mudar a história natural da doença (cf. STONE, 2004). Os doentes foram randomizados para receber mesilato de imatinibe na dose de 400 mg/dia e para o tratamento padrão com INF- α e citarabina em dose baixa. A migração para o tratamento alternativo era permitida sob critérios rígidos de intolerância ou insucesso no tratamento. Após acompanhamento de 19 meses, o mesilato de imatinibe mostrou significativa superioridade na tolerância e nas respostas citogenética e hematológica. Em 18 meses a resposta citogenética completa e a melhor resposta citogenética foram de 76,2% e 87,1%, respectivamente, para o grupo do mesilato de imatinibe, e de 14,5% e 34,7%, respectivamente, para o grupo do INF- α e citarabina. A progressão da doença foi de 8% no primeiro grupo e de 26% no segundo; e a transformação da doença foi de 3% versus 9%. O índice de sobrevida nos 18 meses não mostrou diferença significativa entre os dois grupos (97% versus 95%; $P=0,16$), entretanto o tratamento de 89% dos pacientes que receberam INF- α +Ara-C já havia sido mudado para o mesilato de imatinibe após oito meses do protocolo (KANTARJIAN et al., 2003b).

Uma revisão do acompanhamento de 30 meses dos pacientes do protocolo IRIS, apresentada na *American Society of Hematology* (ASH) em 2003, confirmou um discreto aumento dos índices de resposta ao mesilato de imatinibe, em relação aos dados anteriores. A melhor resposta citogenética foi de 90% e a resposta citogenética completa foi de 82%, enquanto a sobrevida foi de 95% após acompanhamento de dois anos e meio. Não houve diferença de sobrevida nos dois tratamentos, devido à migração de pacientes para o grupo do mesilato de imatinibe no início do estudo, mas os altos índices de resposta citogenética completa e o retardo na progressão da doença, promovidos por este medicamento, sugerem que haverá aumento na sobrevida de longo termo.

Esses resultados fizeram com que a FDA aprovasse em dezembro de 2002 o mesilato de imatinibe como a primeira linha de tratamento para os portadores de LMC (CROSSMAN; O'BRIEN, 2004a). A dose desse medicamento por ela recomendada atual-

mente para os pacientes em fase crônica é de 400 mg/dia; doses maiores – de 600 a 800 mg – ficam restritas a pacientes em fases mais avançadas da doença.

CORTES et al. (2003a) trataram com duas doses diárias de 400 mg/dia de mesilato de imatinibe 36 pacientes em fase crônica de longa duração (tempo médio de 25 meses pós-diagnóstico) e sem resposta ao tratamento com INF- α . O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia e a tolerância de doses altas do medicamento nesses pacientes. Quatro (11%) deles apresentavam evolução citogenética clonal no início do estudo. Em três meses de tratamento, 85% dos pacientes atingiram a melhor resposta citogenética, comparados com 44% daqueles tratados com a dose diária padrão (400 mg/dia). Excluindo os pacientes com menos que 35% de células Ph+ antes do início do tratamento, 19 (90%) de 21 pacientes avaliados atingiram a melhor resposta citogenética. Verificou-se toxicidade similar à da dose padrão e também um alto índice de remissão molecular. De 32 pacientes analisados, 18 (56%) mostraram índices de BCR-ABL/ABL inferiores a 0,045%.

Num estudo recente (2004), pesquisadores do *M.D. Anderson Cancer Center*, da Universidade do Texas, em Houston, EUA, examinaram 114 indivíduos com pouco tempo de diagnóstico de LMC em primeira fase crônica, com idade superior a 15 anos e considerados em bom estado clínico. Doentes em fase acelerada ou em crise blástica foram excluídos, com exceção dos que apresentavam evolução citogenética clonal, sem outros critérios de fase acelerada. Não foram incluídos aqueles já tratados com mesilato de imatinibe ou INF- α ou citarabina em período superior a 1 mês. O objetivo do estudo foi investigar a eficácia e a toxicidade do mesilato de imatinibe quando aplicado em altas doses (800 mg/dia) nesses pacientes, comparando esses resultados com os obtidos com a aplicação da dose padrão (400 mg/dia) em amostra similar de doentes de LMC. No estudo, 103 (90%) pacientes obtiveram resposta citogenética completa e 109 (96%) tiveram a melhor resposta citogenética. Acompanhados durante um período médio de 15 meses, nenhum paciente progrediu para a fase acelerada e crise blástica. O índice de sobrevida estimado de dois anos foi de 94%. Pelo método de PCR quantitativo, 71 (63%) de 112 pacientes mostraram índices de redução de BCR-ABL/ABL inferiores a 0,05% e 31 (28%) não mostraram níveis detectáveis de transcritos. Comparando os resultados da dose padrão (400 mg/dia) com os de alta dose (800 mg/dia), estes foram associados com a melhor RCC ($P=0,0005$) e melhor resposta molecular. A alta dose do mesilato de imatinibe foi bem tolerada, mas a ocorrência de mielosupressão foi mais freqüente (KANTARJIAN et al., 2004).

Vários estudos foram realizados para avaliar os resultados do tratamento com mesilato de imatinibe na fase avançada da doença. De abril de 1999 a março de 2000, a Fase I do mesilato de imatinibe foi expandida para incluir o escalonamento da dose para pacientes em crise blástica e com LLA Philadelphia positivo. Foram incluídos 58 pacientes, dos quais 10 com LLA, todos submetidos a outros tratamentos e, dos 48 pacientes com LMC, quase a metade tinha recebido tratamento anterior para a crise blástica. A resposta dos pacientes com crise blástica mielóide foi de 55% e de 70% para os outros grupos. Dos 58 pacientes estudados, 12% atingiram a melhor resposta citogenética (cf. CROSSMAN et al., 2004b)

Na Fase II do protocolo, a análise dos pacientes em fase acelerada mostrou que a maioria obteve resposta hematológica. A melhor resposta citogenética foi observada em 24% e a resposta citogenética completa em 17%. Houve uma tendência de índices superiores para a resposta citogenética nos pacientes que haviam recebido 600 mg (28%) em relação aos que haviam recebido 400 mg (16%). A sobrevida livre de doença e a sobrevida total foi significativamente melhor nos pacientes tratados com doses maiores.

Nessa Fase II também foi analisado o efeito do mesilato de imatinibe em 36 pacientes em crise blástica mielóide tratados com doses de 400 mg/dia e em 223 pacientes com doses de 600 mg/dia. A resposta hematológica com duração mínima de quatro semanas foi obtida em 31% deles, 8% dos quais com resposta hematológica completa. Naqueles que persistiram com a resposta hematológica o tempo médio de sobrevida foi de 19 meses, comparado com seis meses dos pacientes em que não houve continuação de resposta e com apenas quatro meses para os que não atingiram resposta (CROSSMAN et al., 2004a).

Conquanto conhecida como fator de mau prognóstico a evolução citogenética clonal, seu papel no tratamento com mesilato de imatinibe não era conhecido. CORTES et al. (2003b) analisaram a evolução clonal como fator prognóstico independente em 498 portadores de LMC em fase crônica ou acelerada, tratados com mesilato de imatinibe, 121 dos quais mostravam evolução clonal. Os pacientes foram analisados em quatro categorias: *fase crônica* (n=295); *evolução clonal isolada* (n=70); *fase acelerada sem evolução clonal* (n=82); *fase acelerada com evolução clonal* (n=51). Nas fases crônica e acelerada, a evolução clonal não foi associada com diferenças significativas na resposta citogenética melhor e completa, mas mostrou ser fator independente de mau prognóstico em ambas as fases. A análise multivariada realizada num prazo de três meses identificou que a ausência de resposta citogenética nesse período é um fator independente de mau prognóstico mais

importante na sobrevivência do que a evolução clonal em ambas as fases da doença (CORTES et al., 2003).

Problemas associados ao tratamento da LMC com mesilato de imatinibe têm sido identificados. Nas fases avançadas da doença muitos pacientes não respondem ao medicamento; outros respondem mas desenvolvem resistência tardia ao tratamento. Na crise blástica, as respostas são de curto prazo, com duração média de três a seis meses, e somente 10% a 15% dos pacientes têm resposta por um período mais longo. Na fase acelerada, após 12 meses de terapia 30% a 60% dos pacientes progridem para a fase blástica ou deixam de apresentar resposta hematológica (CORTES et al., 2004). Os mecanismos de resistência não estão completamente esclarecidos, mas incluem: seleção de células com super-expressão da BCR-ABL (MAHON et al., 2000); seleção das células que expressam níveis normais da BCR-ABL mas com mutações no domínio quinase Abl; e seleção de células que podem ser independentes da expressão BCR-ABL, possivelmente por ativação anormal de outras vias oncogênicas. Na mesma célula podem coexistir mais de um desses mecanismos (MELO et al., 2003).

A resistência ao mesilato de imatinibe pode ser identificada por critérios laboratoriais ou clínicos. É *primária* quando a resistência é identificada em linhagens celulares ou em pacientes que não tiveram exposição anterior ao medicamento; ou *secundária* quando a resistência ocorre após resposta inicial à droga. A resistência pode também ser atribuída à perda de capacidade do mesilato de imatinibe de inibir a BCR-ABL ou à incapacidade de atingir, em concentração suficiente, a oncoproteína no espaço intracelular, por inativação ou degradação. Os mecanismos de resistência podem diferir em pacientes tratados na fase crônica ou na fase avançada da doença (GOLDMAN, 2004).

Os mecanismos de resistência têm sido analisados e o mais comum é a reativação da atividade de quinase da BCR-ABL por mutações de ponto ou por amplificação gênica (GORRE et al., 2001). A mutação de ponto no sítio de ligação da tirosina-quinase pode impedir a ligação do mesilato de imatinibe com a proteína, por interrupção de pontos de contato críticos entre eles ou por induzir uma conformação da proteína à qual o medicamento não se pode ligar (BRANFORD et al., 2003). Dependendo do tipo de mutação presente, o aumento da dose pode ser uma boa estratégia para restaurar a resposta ao mesilato de imatinibe.

A persistência da atividade de quinase da BCR-ABL durante o tratamento pode estar relacionada a superexpressão da proteína, podendo, em alguns casos, ser demonstrada a

amplificação gênica (DEININGER et al., 2003). CAMPBELL et al.(2002) observaram regiões homogeneamente coradas (hsr — *homogeneously staining regions*) em quatro linhagens celulares de crise blástica de LMC que, quando estudadas por FISH, revelaram-se como múltiplas cópias de *BCR/ABL*. Nos casos de amplificação gênica ou de superexpressão da oncoproteína, a mesma estratégia do aumento de dose pode ser usada. Como outras possíveis causas de resistência, cita-se: níveis elevados de proteína 1 de resistência a multidrogas (*multidrug resistance protein 1*); ligação do mesilato de imatinibe com a glicoproteína ácida 1-alfa; e anormalidades moleculares adicionais ao BCR-ABL, que previnem a apoptose do clone maligno apesar da inativação eficiente da quinase pelo mesilato de imatinibe (STONE, 2004).

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar em portadores de LMC a proporção de células Philadelphia positivas em diferentes períodos do tratamento com mesilato de imatinibe;
- 2) comparar esses resultados com os de portadores de LMC submetidos a transplante de medula óssea (TMO);
- 3) identificar o cariótipo, nos casos possíveis de análise completa, dos pacientes submetidos aos dois tipos de tratamentos para avaliar as alterações cromossômicas adicionais e não-adicionais.
- 4) correlacionar as informações citogenéticas com a evolução do quadro clínico dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Aspirados de medula óssea obtidos de pacientes dos ambulatórios de Hematologia, de Leucemia Mielóide Crônica e do Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), diagnosticados como portadores de LMC, foram enviados para a Unidade de Citogenética Humana do Laboratório de Imunogenética do mesmo hospital. O material analisado de pacientes tratados com mesilato de imatinibe e de pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea foi colhido no momento do diagnóstico da doença e após o início do tratamento, em intervalos variados, conforme a necessidade de monitoramento.

Os critérios usados no Hospital de Clínicas para inclusão dos pacientes nos diferentes protocolos são *presença de doador compatível para o sistema HLA e idade abaixo dos 50 anos para o TMO*.

Doentes na fase crônica da doença não incluídos nesse grupo são tratados primeiramente com INF- α ; aqueles intolerantes ou que não obtiverem resposta com INF- α são tratados com mesilato de imatinibe. Só têm indicação imediata desse último os pacientes que estiverem em fase mais avançada da doença.

A inclusão de portadores de LMC no presente estudo obedeceu aos seguintes critérios: citogenética positiva para o cromossomo Philadelphia antes do início do tratamento; existência de informações de prontuários, como sexo, idade, quando e a quais tratamentos já se haviam submetido; e exames citogenéticos viáveis (com boa qualidade das metáfases e com bom índice mitótico). Foram excluídos doentes que não preencheram esses critérios e também alguns que já haviam recebido os dois tipos de tratamento (TMO e mesilato de imatinibe).

4.1.1 Amostra dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe

O protocolo do mesilato de imatinibe foi introduzido no Hospital de Clínicas da UFPR em 2000. Neste estudo, o acompanhamento citogenético, realizado no período de

dezembro de 2000 a novembro de 2004, incluiu 90 indivíduos portadores de LMC: 58 homens e 32 mulheres ($\chi^2_1=1,382$; $P>0,20$) — de acordo com dados da literatura, a proporção de homens para mulheres com LMC é de 1,4:1 — com idade entre 16 e 76 anos (média: $41,18\pm 13,13$), aproximadamente 90% caucasóides. A dose de 400 mg/d, indicada para pacientes em fase crônica, foi administrada desde o início do tratamento em 33 pacientes (37%); 57 (63%) receberam doses variadas e tratamento combinado (mesilato de imatinibe + Ara-C), devido à fase avançada da doença (>400 mg/d) ou por intolerância e mielossupressão (<400 mg/d) (Tabela 1):

TABELA 1 - DOSES DIÁRIAS DE MESILATO DE IMATINIBE E ASSOCIAÇÃO COM OUTRO MEDICAMENTO, ADMINISTRADAS A 57 PACIENTES

DOSE	QUANTIDADE E NÚMERO DOS PACIENTES
200→ 400 mg	1 (21)
300 mg	2 (38 e 83)
300→ 400 mg	1 (24)
400→ 600 mg	6 (7, 16, 25, 74, 77 e 85)
600 mg	31 (8, 11, 15, 18, 20, 23, 27, 28, 29, 32, 34, 36, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 52, 53,54, 60, 61, 63, 66, 72, 75, 76, 78, 79 e 90)
600→ 800 mg	6 (19, 22, 57, 70, 80 e 82)
700 mg	1 (73)
800 mg	8 (3, 6, 10, 13, 35, 37, 44 e 89)
Imatinibe + Ara-C	1 (50)

FONTE: A autora

NOTA: O número dos pacientes, entre parênteses, foi extraído do Apêndice 1 (Resultados).

4.1.2 Amostra dos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea

Neste estudo foram incluídos 56 indivíduos: 29 homens e 27 mulheres ($\chi^2_1=1,007$; $P>0,30$) com idade entre 4 e 49 anos (média: $28,18\pm 9,93$), aproximadamente 80% caucasóides. O período de acompanhamento desses pacientes foi de abril de 1990 a outubro de 2004.

Na quase totalidade (98%) dos pacientes, os transplantes foram feitos com medula óssea de doador aparentado; para o regime de condicionamento usou-se, portanto, ciclofosfamida e bussulfano. No único caso de doador não-aparentado, o paciente foi condicionado

com irradiação corporal total (ICT) e ciclofosfamida. Oito (14%) dos pacientes estavam em fase acelerada da doença; os demais, em fase crônica.

4.2 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

4.2.1 Coleta do material

Cerca de 5 ml de medula óssea foram aspirados da crista ilíaca, em seringa de plástico estéril e heparinizada. Esse procedimento foi realizado pelo médico do ambulatório responsável pelo doente. O material foi identificado com o nome e o registro hospitalar do paciente e encaminhado ao laboratório imediatamente após a coleta.

4.2.2 Cultura celular

Os cromossomos metafásicos foram obtidos pela técnica de RAIMONDI et al. (1998), com modificações. O material foi inoculado em dois frascos de cultura celular, contendo meio RPMI-1640, em ambiente estéril, no fluxo laminar.

A quantidade inoculada depende da celularidade do material: quanto maior a celularidade, menos material é colocado. Assim, nas leucemias agudas e crônicas são colocadas de duas a cinco gotas em cada frasco, uma vez que a celularidade nesses casos é, em geral, alta no diagnóstico. Já nos pacientes em tratamento com mesilato de imatinibe ou com INF- α , por ser baixa a celularidade, são inoculadas de 15 a 25 gotas de medula óssea em cada frasco.

A cultura do material segue o seguinte procedimento:

- a) os frascos de cultura são colocados em estufa a 37°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, é adicionado em cada um 0,1 ml de colchicina (Sigma-16 $\mu\text{g/ml}$);
- b) após 40 minutos, o material é transferido para um tubo cônico de 15 ml e centrifugado por 8 minutos a 1 000 rpm;
- c) o sobrenadante é retirado, o botão celular é ressuspenso em 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) e incubado a 37°C por 20 minutos;

- d) imediatamente depois são colocadas 5 gotas da solução fixadora recém-preparada (três partes de metanol para uma parte de ácido acético glacial) sobre o material, que é novamente centrifugado a 1 000 rpm por 8 minutos;
- e) o sobrenadante é desprezado, as células são ressuspensas em 5 ml da solução fixadora e deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos, quando novamente são centrifugadas e lavadas com solução fixadora mais duas vezes;
- f) o sedimento final é ressuspenso em 1 ml de solução fixadora e transferido para um tubo criogênico de 1,5 ml, o qual é armazenado no *freezer* a -20°C , até o momento da análise.

4.2.3 Preparação citológica

As lâminas de vidro com extremidade fosca são previamente lavadas e mantidas em geladeira em solução de etanol e água destilada. No momento do uso, aproximadamente seis lâminas são preparadas com a suspensão celular armazenada e deixadas envelhecer em estufa a 40°C , no mínimo por duas horas; depois são retiradas e bandeadas pela técnica GTG, segundo SCHERES (1972), com modificações:

- a) as lâminas são incubadas em solução salina duplamente citratada (2xSSC) por 5 minutos;
- b) em seguida são mergulhadas na solução de tripsina (tipo II Sigma) 0,02% diluída em solução salina por 5 a 10 segundos;
- c) e imediatamente lavadas em solução salina e/ou água destilada;
- d) em seguida é feita a coloração com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato 0,006M (14,2 g/l de NaHPO_4 + 8,16 g/l de KH_2PO_4), pH 6,8, na proporção de 1:30, durante 5 minutos;
- e) finalmente, as lâminas são lavadas com água destilada e secadas em temperatura ambiente.

4.2.4 Análise citogenética

O material é observado em microscopia óptica comum, com a objetiva de aumento de 10 vezes para localizar as metáfases. As metáfases viáveis são analisadas em objetiva de imersão, com aumento final de 1 000 vezes; desenhadas, no mínimo, vinte células de cada

caso, e considerado um índice que expresse a presença do cromossomo Ph em função de todas as células analisadas. São anotadas todas as aberrações cromossômicas presentes, tanto numéricas como estruturais.

As anormalidades numéricas são consideradas clonais quando há a presença adicional de um mesmo cromossomo em duas ou mais células ou quando um mesmo cromossomo está ausente em pelo menos três células. As anormalidades estruturais são consideradas clonais quando uma mesma aberração está presente em duas ou mais células (ISCN, 1995). As células com aberrações cromossômicas foram digitalizadas por captura em sistema de imagem *METASYSTEM IKAROS* da Zeiss.

4.2.4.1 Análise citogenética dos pacientes do protocolo mesilato de imatinibe

Neste estudo foram recebidas 317 amostras de medula óssea de 90 pacientes, das quais foram analisadas 292 (92%), o que corresponde a uma média de $3,24 \pm 1,20$ por paciente. As 26 (8%) amostras restantes não puderam ser analisadas por ausência de crescimento celular e, portanto, por ausência de metáfases. O material foi coletado no momento do diagnóstico e nos diversos períodos após o início do tratamento, conforme a necessidade de monitoramento do paciente pela equipe médica. A Tabela 2 apresenta o número de exames realizados em cada período.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS EXAMES DOS PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE, CONFORME O PERÍODO DE COLETA

PERÍODO	Nº DE EXAMES
0 mês	90 (31%)
3-6 meses	66 (23%)
7-12 meses	51 (17%)
13-18 meses	26 (9%)
19-24 meses	20 (7%)
25-30 meses	14 (5%)
31-36 meses	16 (5%)
> 36 meses	9 (3%)
TOTAL	292

FONTE: A autora

A tabela acima mostra o período estabelecido para a realização dos exames, conforme o seguinte critério: 0 mês: antes do tratamento; 6 meses: do 3^o ao 6^o mês; 12 meses: do 7^o ao 12^o mês; 18 meses: do 13^o ao 18^o mês; 24 meses: do 19^o ao 24^o mês; 30 meses: do 25^o ao 30^o mês; 36 meses: do 31^o ao 36^o mês e >36 meses: o máximo foi de 47 meses.

As análises citogenéticas para a LMC são completas quando são investigadas aberrações numéricas e estruturais, adicionais ao cromossomo Philadelphia; ou parciais quando se avalia somente a presença ou ausência desse cromossomo. Esse último tipo tem a vantagem de agilizar o resultado dos exames que requerem urgência; entretanto não possibilita a observação de aberrações adicionais.

Neste estudo, tais procedimentos foram adotados para os exames tanto dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe como dos pacientes submetidos ao TMO, conforme orientação do médico responsável.

4.2.4.1.1 Definição de resposta citogenética

A avaliação da resposta citogenética dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe seguiu os critérios apresentados por SPENCER et al. (1995), ENRIGHT e McGLAVE (1999), KANTARJIAN et al. (2002) e TALPAZ et al. (2002), aplicados em princípio aos pacientes tratados com o INF- α e posteriormente àqueles tratados com mesilato de imatinibe. Como descrito na Introdução deste trabalho, os critérios foram os seguintes:

- *sem resposta*: >95% de metáfases Ph +;
- *resposta citogenética mínima (RCM)*: 35 a 95% de metáfases Ph +;
- *resposta citogenética parcial (RCP)*: 1 a 34% de metáfases Ph +;
- *resposta citogenética completa (RCC)*: sem metáfases Ph +;
- *melhor resposta citogenética (MRC)*: RCP + RCC.

4.2.4.2 Análise citogenética dos pacientes submetidos ao TMO

Das 245 amostras de medula óssea de 56 pacientes submetidos ao TMO, foram analisadas 193 (79%), o que corresponde a uma média de $3,45 \pm 1,58$ por paciente. O material foi coletado no momento do diagnóstico e nos diversos períodos após o início do tratamento, conforme a necessidade de monitoramento do paciente pela equipe médica. Para as análises completas e parciais seguiu-se o mesmo procedimento especificado para os pacientes do

protocolo mesilato de imatinibe (item 4.2.4.1). A Tabela 3 apresenta o número de exames realizados em cada período.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS EXAMES DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA, CONFORME O PERÍODO DE COLETA

PERÍODO	Nº DE AMOSTRAS
0 mês	56 (29%)
3-6 meses	27 (14%)
7-12 meses	20 (10%)
13-18 meses	12 (6%)
19-24 meses	8 (4%)
25-30 meses	15 (8%)
31-36 meses	4 (2%)
> 36 meses	51 (27%)
TOTAL	193

FONTE: A autora

Os períodos apresentados na Tabela 3 foram determinados pelos mesmos critérios considerados para os exames dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe (item 4.2.4.1). O período >36 meses corresponde aos exames realizados do 37^o ao 125^o mês.

Neste estudo, dos 193 exames, 128 (66%) foram analisados somente quanto ao complemento sexual (XX ou XY), para avaliar a pega do transplante quando realizado entre pessoas de sexo diferente, e quanto à presença do cromossomo Philadelphia, para monitorar a evolução da doença. Tanto na análise de quimerismo como na de controle da doença observou-se a proporção de células XX/XY e de células Ph+/Ph-. Nos 65 (34%) exames restantes foram feitas análises citogenéticas completas.

4.2.5 Análise estatística

Foram usados os seguintes recursos estatísticos: o coeficiente de regressão (b) para avaliação do grau de dependência da ocorrência de células Ph positivas em função do tempo após o início dos tratamentos (mesilato de imatinibe e TMO); o teste de Bartlett, para informar sobre a homogeneidade das variâncias; a análise da variância, para comparação das diferenças entre as médias das proporções de células Ph positivas, observadas nos pacientes

submetidos aos dois tipos de tratamento; o teste t (de Student), para comparação entre as médias observadas nos tratamentos dentro de cada período e entre as médias das idades dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe e TMO; o teste do Qui Quadrado, para avaliar a significância das diferenças do número de homens e mulheres em cada tipo de tratamento e para avaliar a homogeneidade da distribuição do número de pacientes com diferentes respostas citogenéticas, nas diferentes fases da doença e nas diferentes doses do mesilato de imatinibe. Essas análises foram feitas de acordo com as fórmulas apresentadas por Beiguelman (1988). O teste de Tukey, para comparação entre as médias de cada período, dentro de cada tratamento, foi usado conforme Pimentel-Gomes (1976).

5 RESULTADOS

Como foi referido em Material e Métodos, em cada exame realizado, tanto nos pacientes tratados com mesilato de imatinibe como nos submetidos ao TMO, calculou-se a proporção de células Ph positivas em relação a todas as células analisadas. Os resultados da resposta citogenética ao tratamento com mesilato de imatinibe estão apresentados no Apêndice 1, e os da resposta citogenética ao TMO no Apêndice 2, de acordo com o período do início do tratamento e do dia do transplante, conforme já descrito.

Os 202 e os 137 resultados obtidos (excluindo-se de cada amostra os 90 e os 56 exames iniciais, referentes ao diagnóstico) respectivamente para a primeira e para a segunda amostra foram agrupados em sete diferentes períodos. As variações das proporções de células Ph positivas em função dos meses após o início do tratamento foram avaliadas pelo coeficiente de regressão (b), atribuindo-se os valores 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 para o 6^o, 12^o, 18^o, 24^o, 30^o, 36^o e o >36^o mês, respectivamente.

Para os pacientes tratados com mesilato de imatinibe obteve-se um valor de $b = -0,075 \pm 0,016$; $t = 4,68$; $P < 0,001$, negativo e significativamente diferente de zero. Há, portanto, uma dependência negativa da variação das proporções de células Ph positivas em função do tempo após o tratamento, isto é, à medida que aumenta o tempo de tratamento, a proporção de células Ph positivas diminui significativamente.

Já em idêntica avaliação aplicada aos pacientes submetidos ao TMO obteve-se um valor de $b = 0,02 \pm 0,01$; $t = 1,43$; $P > 0,10$, positivo e não significativamente diferente de zero. Não há, portanto, dependência da variação das proporções de células Ph positivas em função do tempo após o TMO.

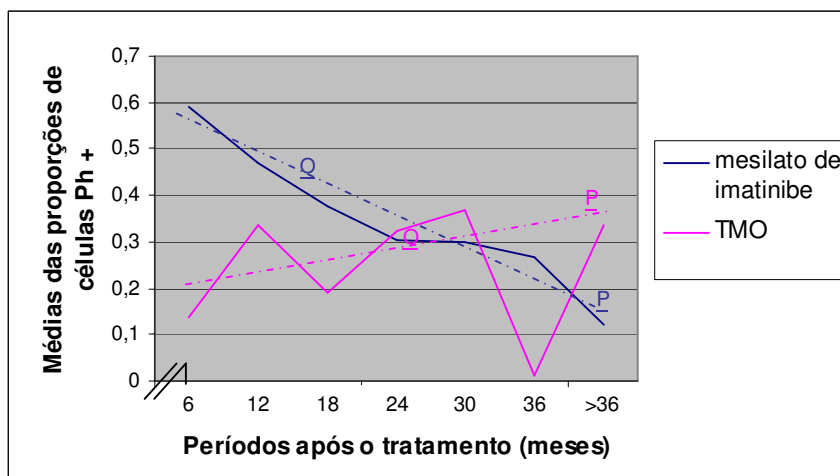
A Figura 5 apresenta as retas de regressão obtidas para cada um dos tratamentos e os diagramas de distribuição das médias de proporções de células Ph positivas nos diversos períodos de cada tratamento, conforme os dados apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 - MÉDIAS DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS SETE PERÍODOS ANALISADOS, ENCONTRADAS NOS PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE E NOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

PERÍODO (meses)	TRATAMENTO			
	Mesilato de Imatinibe		TMO	
	n	$\bar{x} \pm DP$	n	$\bar{x} \pm DP$
6	66	0,591±0,409	27	0,138±0,310
12	51	0,471±0,451	20	0,337±0,409
18	26	0,376±0,412	12	0,192±0,380
24	20	0,302±0,431	8	0,325±0,438
30	14	0,298±0,385	15	0,370±0,476
36	16	0,266±0,443	4	0,013±0,022
>36	9	0,121±0,216	51	0,334±0,437

FONTE: A autora

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS APRESENTADAS NA TABELA 4 (LINHA CONTÍNUA) E RETA DE REGRESSÃO (LINHA INTERROMPIDA) OBTIDA A PARTIR DOS PONTOS Q ($\bar{x}=2,75$; $Y=0,44$); P ($X=7,0$; $Y=0,13$) PARA O MESILATO DE IMATINIBE, E Q ($\bar{x}=4,31$; $Y=0,28$); P ($X=7,0$; $Y=0,33$) PARA O TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

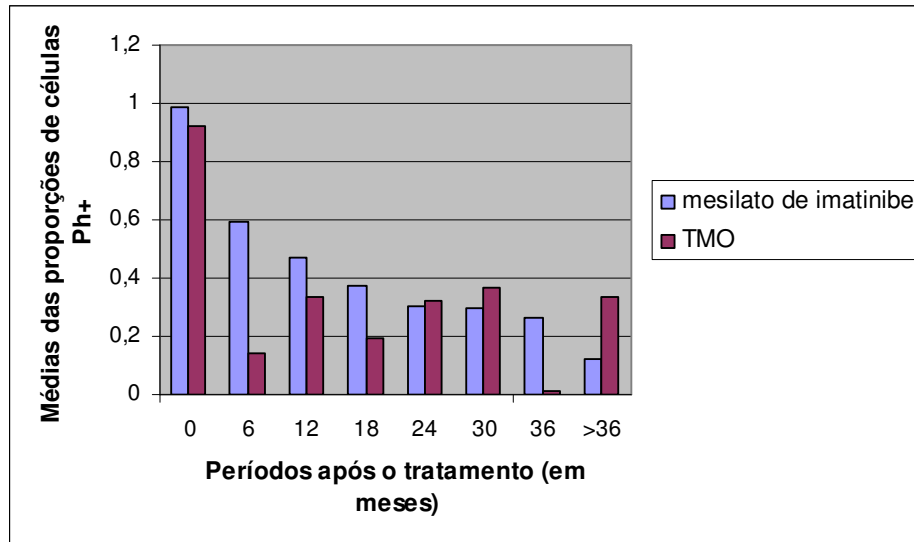


FONTE: A autora

NOTA: Os meses correspondem aos valores 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente, na reta de regressão.

A distribuição das médias dessas proporções em cada período de cada tratamento está também ilustrada na Figura 6, onde foram incluídas as médias obtidas no diagnóstico (mesilato de imatinibe= $\bar{x}=0,99\pm0,11$, $n=90$; TMO= $\bar{x}=0,92\pm0,15$, $n=56$; $t'=3,18 > t_c=2,0$, significativa a 0,05).

FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS MÉDIAS DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE E NOS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ANALISADOS NO INÍCIO E EM PERÍODOS DIFERENTES APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO



Fonte: A autora

As diferenças entre as médias das proporções de células Ph positivas de cada período em cada tratamento foram avaliadas pela análise da variância, conforme os dados da Tabela 5.

TABELA 5 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA DAS PROPORÇÕES DE CÉLULAS PHILADELPHIA POSITIVAS NOS SETE PERÍODOS DOS DOIS TIPOS DE TRATAMENTO

VARIAÇÃO	G.L.	SQ	$s^2(x)$	F	G.L	p
Entre tratamentos	1	2,10	2,10	12,35	1; 325	<0,05
Entre períodos	6	2,03	0,338	1,99	6; 325	>0,05
Interação	6	2,96	0,493	2,90	6; 325	<0,05
Entre tratamentos e entre períodos.	13	7,09	0,545	3,20	13; 325	<0,05
Resíduo	325	55,30	0,170			
TOTAL	338	62,39				

FONTE: A autora

O teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias indicou um valor de $\chi^2_{13}(\text{corr.})=21,885$; $P>0,05$. Verificou-se que os valores de F foram significativos para tratamentos e para interação, mas não para períodos. No entanto a significância observada na

interação fornece importante informação: a de que em um ou mais períodos as médias dos tratamentos diferem significativamente.

Aplicando o teste de Tukey para avaliar a significância das diferenças entre todas as médias dos diferentes períodos de cada tratamento, observou-se diferença significativa para o mesilato de imatinibe entre as médias do 6^o mês e de >36 meses ($\Delta=0,431 <0,470$) e entre as médias do 6^o mês e do 24^o mês ($\Delta=0,270 <0,289$). Para o TMO não se observou diferenças significativas nas comparações entre todas as médias dos diferentes períodos.

As diferenças entre as médias de cada período nos dois tratamentos foram avaliadas pelo teste *t*, que indicou diferença significativa entre as médias do 6^o mês ($t=5,20; P>0,001$), do 36^o mês ($t'=2,3 > t_c=2,16$) e do >36 meses ($t'=2,24 > t_c=2,22$), o que está de acordo com o *F* significativo da interação.

5.1 RESULTADOS DA RESPOSTA CITOGENÉTICA, CARIÓTIPOS E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE

Dos 90 pacientes tratados com o mesilato de imatinibe analisados nos 47 meses de estudo, 38 (42%) obtiveram resposta citogenética completa (RCC), 10 (11%) resposta citogenética parcial (RCP), 12 (13,5%) resposta citogenética mínima (RCM) e 30 (33,5%) não apresentaram resposta. A melhor resposta citogenética (MRC = RCC+RCP) foi verificada em 48 (53%) pacientes.

Quando esses 90 pacientes iniciaram o tratamento, 48 (53%) estavam em fase crônica, 2 dos quais em segunda fase crônica; 36 (40%) estavam em fase acelerada e 6 (7%) estavam em crise blástica. O número de pacientes com as diferentes respostas citogenéticas, de acordo com a fase da doença, é apresentada na Tabela 6.

TABELA 6 - RESPOSTA CITOGENÉTICA AO MESILATO DE IMATINIBE SEGUNDO A FASE DA DOENÇA NO INÍCIO DO TRATAMENTO DOS 90 PACIENTES

FASE	RESPOSTA				
	RCC	RCP	RCM	SEM RESPOSTA	TOTAL
Fase crônica	26 (54%)	6 (13%)	6 (13%)	10 (20%)	48
Fase acelerada	12 (33%)	4 (11%)	5 (14 %)	15 (42%)	36
Crise blástica	0	0	1 (17%)	5 (83%)	6
TOTAL	38	10	12	30	90

FONTE: A autora

A dose de medicamento administrada no início do tratamento e a resposta citogenética dos 90 pacientes são apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7 - DOSES E COMBINAÇÕES INICIAIS DO MESILATO DE IMATINIBE E RESPOSTA CITOGÉNÉTICA DOS 90 PACIENTES AO TRATAMENTO

DOSE \ RESPOSTA	MESILATO DE IMATINIBE				IMATINIBE + AraC	TOTAL
	≤ 400 mg	600 mg	700 mg	800 mg		
RCC	21	15	1	1	0	38
RCP	3	4	0	0	1	8
RCM	7	6	0	1	0	14
Sem resposta	12	12	0	6	0	30
TOTAL	43	37	1	8	1	90

FONTE: A autora

O teste do χ^2 aplicado aos dados das Tabela 6 e 7 apresentou valores iguais a $\chi^2_6 = 9,96$; $P > 0,05$ e $\chi^2_{12} = 19,49$; $P > 0,05$, respectivamente, indicando que as diferentes respostas citogenéticas estão igualmente distribuídas nas diferentes fases da doença e nas diferentes doses administradas, respectivamente.

Dos 292 exames realizados, 200 (68%) foram completos e 92 (32%) limitaram-se a verificar a presença do cromossomo Philadelphia.

Foram observadas aberrações adicionais (com a presença do cromossomo Philadelphia) e não-adicionais (sem o cromossomo Philadelphia) em 61 (21%) dos 292 exames, alguns dos quais com mais do que uma aberração. Dos 36 pacientes nos quais essas aberrações foram identificadas, 4 (11%) apresentaram-nas somente antes do tratamento; 12 (33%) antes e depois do tratamento e 20 (56%) somente depois do tratamento.

Quanto à resposta citogenética ao tratamento dos 36 pacientes, 10 (28%) tiveram RCC; 5 (14%) RCP; 6 (16,5%) RCM e 15 (41,5%) não obtiveram resposta. As aberrações cromossômicas mais freqüentemente observadas estão apresentadas no Tabela 8, com exceção das observadas em somente um paciente.

TABELA 8 - ABERRAÇÕES CITOGENÉTICAS ADICIONAIS E NÃO-ADICIONAIS MAIS FREQUENTEMENTE OBSERVADAS NOS PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE

ABERRAÇÃO	Nº DE PACIENTES
+8	10
duplo Ph	9
i(17)(q10)	5
del(11)(q23)	3
-13	3
-Y	2
add(6)(p25)	2
del(12)(p12)	2

FONTE: A autora

A trissomia do cromossomo 8 e o duplo Philadelphia estiveram presentes antes e durante o tratamento em 3 pacientes cada., o mesmo ocorreu com o -Y em 1 paciente. Durante o tratamento, o +8 apareceu como aberração não-adicional em 5 pacientes. O tipo de resposta citogenética e o tipo de aberração cromossômica adicional e não-adicional ao cromossomo Philadelphia são apresentados no Quadro 4.

Em quatro pacientes que já tinham obtido resposta citogenética completa com o tratamento, o cromossomo Philadelphia reapareceu em exames posteriores. Os tempos de recidiva citogenética foram os seguintes: três meses (paciente 88); sete meses (paciente 15) e >36 meses (pacientes 40 e 62). No início do tratamento estavam em fase acelerada da doença os pacientes 15 e 40, e em fase crônica os pacientes 62 e 88. O paciente 40 apresentou aberrações adicionais antes e durante o tratamento, já o paciente 62 apresentou-as somente depois de iniciado o tratamento; os demais não apresentaram aberração. Atualmente, três (pacientes 40, 62 e 88) obtiveram resposta citogenética parcial e um (paciente 15), com doença avançada no início do tratamento, atingiu RCC. Os cariótipos dos pacientes que apresentaram aberrações adicionais e não-adicionais são apresentados no Quadro 5.

QUADRO 4 - RESPOSTA CITOGENÉTICA E TIPO DE ABERRAÇÃO ADICIONAL OU NÃO-ADICIONAL AO CROMOSSOMO PHILADELPHIA OBSERVADOS NOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE ANTES E DURANTE O TRATAMENTO

continua

TIPO DE ABERRAÇÃO	Nº DO PACIENTE						Ph
	PERÍODO		TIPO DE RESPOSTA				
	Antes	Durante	RCC	RCP	RCM	S/Resposta	
-X		81			81		+
-Y	3					3	+
	19	19			19		+
+Y		29			29		-
+2		24	24				-
del(2)(p21)		42		42			-
del(3)(p14?)	66		66				+
del(5)(q15)		31			31		+
del(6)(q2?)		83			83		
add(6)(p25)		7				7	+
	11		11				+
-7		29			29		-
add(7)(p?)	27			27			+
8+	19	19			19		+
		27		27			-
	37					37	+
	46					46	+
		62		62			-
	72						+
		72	72				-
		75	75				-
	76						+
		76	76				-
	78				78	+	
	82				82	+	
del(9)(p12)		1				1	+
add(10)(p15)		44				44	+
del(11)(p12)		50		50			+
del(11)(q23)		1				1	+
		14				14	+
		56				56	+
+11	27			27			+
add(12)(q24)	87	87				87	+
del(12)(p12)		7				7	+
		47	47				-
-13		40		40			+
	76		76				+
		77	77				+
-15		71	71				-

QUADRO 4 - RESPOSTA CITOGENÉTICA E TIPO DE ABERRAÇÃO ADICIONAL OU NÃO-ADICIONAL AO CROMOSSOMO PHILADELPHIA OBSERVADOS NOS PACIENTES TRATADOS COM O MESILATO DE IMATINIBE ANTES E DURANTE O TRATAMENTO

TIPO DE ABERRAÇÃO	Nº DO PACIENTE						Ph
	PERÍODO		TIPO DE RESPOSTA				
	Antes	Durante	RCC	RCP	RCM	S/Resposta	
i(17)(q10)		14				14	+
	42			42			+
	46					46	+
		85				85	+
		87				87	+
t(18;18)(p11;q12)		45				45	+
del(20)(q12)		45				45	+
-21		87				87	+
+21		22	22				-
-22		40		40			+
duplo Ph	22		22				+
		32				32	+
		34				34	+
	35	35				35	+
	40			40			+
	45	45				45	+
		46				46	+
	78	78				78	+
	82			82		+	
t(15;17)(p11;q11)		78				78	+

FONTE: A autora

NOTA: Os números que aparecem nas colunas Período e Tipo de resposta referem-se aos relacionados no Apêndice 1. Alguns pacientes apresentaram mais de um tipo de aberração, por essa razão seus números são encontrados mais do que uma vez.

O único paciente da amostra do mesilato de imatinibe que apresentou uma translocação variante, a t(5;9;22;9)(q31q32;q34;q11;q22), não obteve resposta citogenética com o tratamento.

QUADRO 5 - CARIÓTIPO DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM ABERRAÇÕES ADICIONAIS E NÃO-ADICIONAIS ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE

continua

Nº DO PACIENTE	PERÍODO (meses)	CARIÓTIPO
1	3 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[14]/46,XY,idem,del(9)(p12)[3]/46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11),del(11)(q23)[3]
3	antes	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11)[10]
7	7 m depois	46,XX,t(9 ;22)(q34 ;q11)[7]/46,XX,add(6)(p25) ;t(9 ;22)(q34 ;q11) ;del(12)(p12)[8]
11	antes	46,XX,add(6)(p25),t(9;22)(q34;q11)[17]
14	6 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[17]/46,XY,idem,del(11)(q23)[2]/46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11),i(17)(q10)[2][cp21]
19	antes	46,X,-Y,+8,t(9 ;22)[14]
	7 m depois	46,X,-Y,+8,t(9 ;22)(q34 ;q11)[7]
22	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11),+der(22)t(9 ;22)(q34 ;q11)[10]
	13 m depois	47,XY,+21[4]/46,XY[17]
24	27 m depois	47,XY,+2[2]/46,XY[17]
27	antes	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XY,idem,add(7p?) [8]/47,XY,idem,+11[2]
	10 m depois	47,XY,+8[2]/ 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/ 46,XY[16]
29	16 m depois	46,XY,+Y,-7[13]/46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[5]/46,XY[2].
31	28 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[4],del(5)(q15)[3][cp6] /46,XY[18]
32	6 m depois	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/47,XY,idem,+der(22)t(9;22)[9]
34	3 m depois	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2] / 47,XX,idem,+der(22)t(9;22)[4]
35	antes	46,XX,t(9 ;22)(q34 ;q11)[5]/47,idem, del(17)(p10),+der(22)t(9 ;22)[20]
	5 m depois	47,XX,t(9;22)(q34;q11), + der(22)t(9;22)[8]
37	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[16]/47,XY,+8,idem[2]
40	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[33]/47,XY,idem,+der(22)t(9 ;22)[2]
	8 m depois	44~45,XY,t(9;22)(q34;q11)[2],-13[4],-22[3][cp5]/46,XY[15]
42	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[4]/46,XY,idem,i(17)(q10)[2].
	30 m depois	46,XY, ?del(2)(p21)[2]/46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[2]/46,XY[2]
44	3 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[12]/ 46,XY,idem,add(10)(p15)[7]
	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[12]/47,XY,idem,+der(22)t(9 ;22)[5]
45	6 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[9]/47,XY,idem,+der(22)t(9 ;22)[2]/46,XY,idem,+i(17)(q10),-18,-18[11]
	26 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[17]/46,XY,idem,t(18 ;18)(p11 ;q12),del(20)(q12)[4]
46	antes	47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10) [2]
	19 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[15]/47,XY,idem,+der(22)t(9 ;22)[2]
47	16 m depois	46,XX,del(12)(p12)[2]/46,XX[14]
50	12 m depois	46,XX,t(9 ;22)(q34 ;q11)[16]/46,XX,idem,del(11)(p12)[4]
56	6 m depois	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[15]/46,XY,idem,del(11)(q23)[5]
62	> 36 m depois	47,XX,+8[3] / 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2] / 46,XX[18]
66	antes	46,XX,del(3)(p14?),t(9;22)(q34;q11)[8]/46,XX[10]
71	34 m depois	45,XY,-15[3] /46,XY[17]
72	antes	47,XX,+8[2]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XX[16]
	6 m depois	47,XX,+8[5]/46,XX[15]
75	6 m depois	47,XX,+8[8]/46,XX[12]
76	antes	46,XY,t(9 ;22)(q34 ;q11)[5]/46,XY,idem,+8,-13[5]
	12 m depois	47,XY,+8[5]/46,XY[4]

QUADRO 5 - CARIÓTIPO DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM ABERRAÇÕES ADICIONAIS E NÃO-ADICIONAIS ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE

Nº DO PACIENTE	PERÍODO (meses)	CARIÓTIPO	conclusão
77	6 m depois	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[2]/45,XY,idem,-13[3]/46,XY[15]	
78	antes	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[4]/47,XY,idem,+der(22)t(9;22)[5]	
	30 m depois	48,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)[9]/48,XY,idem,t(15;17)(p11;q11)[3]	
81	8 m depois	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[5]/45,X,-X,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XX[12]	
82	6 m depois	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/47,XY,+8, idem [8]/48,XY,idem,+der(22)t(9;22)[2]	
83	12 m depois	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XX,del(6)(q2?1)[5]/46,XX[2]	
85	23 m depois	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[17]/46,XX,idem,i(17)(q10)[3]	
87	antes	46,XX,t(9;22)(q34;q11),add(12)(q24)[20]	
	8 m depois	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10]/46,XX,idem[4],add(12)(q24)[2],i(17)(q10)[3][cp4]/45,XX,t(9;22),-21[6]	

FONTE: A autora

NOTA: O número de kariótipos descritos na tabela acima é inferior ao apresentado no Quadro 4 (67), uma vez que num mesmo kariótipo se observaram diferentes aberrações cromossômicas.

Dos 90 pacientes estudados, 10 (11%) foram a óbito (Quadro 6): 6 (60%) por causa da LMC; 1 (10%), que estava em remissão citogenética, morreu de adenocarcinoma metastático e 3 (30%) morreram de infecção. Quanto à resposta citogenética, foram a óbito 6 (60%) pacientes que não responderam ao tratamento, 3 (30%) com RCM e 1 (10%) com RCC.

QUADRO 6 - EVOLUÇÃO DO QUADRO CLÍNICO DOS 10 PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE QUE FORAM A ÓBITO

P	INÍCIO DO TRATAMENTO	ÚLTIMO CONTATO	ÓBITO	CAUSA DO ÓBITO	SOBREVIDA (meses)	RESPOSTA CITOGENÉTICA		
						a	b	c
1	31/10/2003		26/07/2004	CB linfóide	9	6 m	1	S / R
10	13/11/2000		30/04/2001	crise blástica	5	6 m	1	S / R
13	20/10/2003		19/02/2004	crise blástica	4	6 m	0,85	RCM
34	13/11/2000		09/04/2001	infecção pulmonar	5	6 m	1	S / R
44	28/11/2000		01/03/2001	crise blástica	3	6 m	1	S / R
51	26/12/2000	18/8/2003	?	adenocarcinoma metastático	32	12 m	0	RCC
61	20/11/2000		09/03/2002	infecção fúngica	16	6 m	0,85	RCM
63	30/10/2000		20/12/2003	LMC	37	18 e 24m	1	S / R
78	30/01/2001	03/05/2004	?	Infecção?	39	30 m	1	S / R
87	01/08/2001	27/12/2002	?	LMC	16	12 m	0,83	RCM

FONTE: A autora

NOTA: P= paciente; a= período da análise citogenética; b= proporção das células Ph+ em relação a todas células analisadas; c= tipo de resposta citogenética; S/R= sem resposta; RCM= resposta citogenética mínima; RCC= resposta citogenética completa; m= meses.

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE CARIOTÍPICA E EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO TMO

Foram realizados 193 exames, dos quais 65 (34%) com análise completa. Aberrações cromossômicas adicionais foram observadas nos exames completamente analisados de 6 pacientes, 2 dos quais (33%) não entraram em remissão, 3 (50%) recidivaram e 1 (17%) obteve remissão citogenética e hematológica (Quadro 7).

QUADRO 7 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS ADICIONAIS E EVOLUÇÃO CLÍNICA APRESENTADAS POR 6 PACIENTES ANTES E DEPOIS DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

N.º DO PACIENTE	CARIÓTIPO	PERÍODO (meses)	EVOLUÇÃO
5	46,XY,add(1)(p35),t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)[15]	3 m depois	Persistência
20	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[18] / 47,XX,+8,t(9;22)(q34;q11)[2]	Antes	Recidiva
30	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[16]/46,XX,t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)[3]	3 meses depois	Persistência
31	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[16],46,XX,idem,i(17)(q10)[2]/46,XX[3]	Antes	Remissão
40	46,XX,t(9;22)(q34;q11),-17,+ mar[23]	>36 m depois	Recidiva
51	38~46,XX,-2[4],-5[3],-7[3],t(9;22)(q34;q11)[19],-12[3],-14[3][cp19]	> 36 m depois	Recidiva

FONTE: A autora

NOTA: Os números dos pacientes referem-se aos relacionados no Apêndice 2.

Dos 56 pacientes submetidos ao transplante, 28 (50%) obtiveram remissão completa; 3 (5%) obtiveram remissão hematológica, mas não citogenética; 22 (40%) apresentaram recidiva citogenética, 20 (91%) dos quais apresentaram também recidiva hematológica; e 3 (5%) não responderam ao tratamento (persistência da doença). O tempo de recidiva está resumido na tabela 9.

TABELA 9 - PERÍODOS EM QUE HOUVE RECIDIVA CITOGENÉTICA NOS 22 PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

TEMPO DE RECIDIVA CITOGENÉTICA (meses)	Nº DE PACIENTES
7	4 (18%)
13	3 (14%)
19	2 (9%)
25	3 (14%)
>36	10 (45%)

FONTE: A autora

Para efeito deste estudo, os 56 pacientes que receberam transplante foram assim agrupados de acordo com a fase da doença em que se encontravam antes do TMO: 47 (84%) estavam em fase crônica e 6 (11%) em fase acelerada; sobre os 3 restantes (5%), não houve confirmação da fase da doença.

Analisando a evolução dos pacientes de cada um desses grupos depois do transplante, os resultados mostraram que, dos 47 pacientes em fase crônica, 26 (56%) apresentaram remissão completa, 3 (6%) apresentaram remissão hematológica mas não citogenética e 18 (36%) recidivaram – 2 dos quais só tiveram recidiva citogenética. Dos 6 pacientes em fase acelerada, 1 (17%) entrou em remissão, 2 (33%) recidivaram e 3 (50%) não responderam ao tratamento. Quanto aos 3 restantes, 1 (33%) obteve remissão completa e 2 (67%) recidivaram.

Assim, dos 56 pacientes submetidos ao TMO, 7 (13%) foram a óbito, todos por recidiva da doença (Quadro 8). Relacionando esses óbitos a eventual existência de aberração adicional, verificou-se o seguinte: 2 (29%) que estavam em fase crônica da doença antes do TMO não apresentaram aberração adicional; dos 3 (42%) que estavam em fase acelerada, só 2 (pacientes 5 e 30) apresentaram aberrações adicionais após o transplante; e 2 (29%), em fase não especificada, não apresentaram aberração adicional.

QUADRO 8 - SETE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA QUE FORAM A ÓBITO

P	FASE DA DOENÇA ANTES DO TMO	TMO	ÚLTIMO CONTATO	ÓBITO	CAUSA DO ÓBITO	SOBREVIDA (meses)
2	Não especificada	18/03/1998		07/04/1999	Recidiva	12
5	Fase acelerada	14/05/1998		27/09/2002	Persistência	>36
16	Não especificada	02/02/2001		02/04/2004	Recidiva	>36
30	Fase acelerada	10/08/1998		01/03/1999	Persistência	7
41	Fase crônica	17/04/1996		12/08/1997	Recidiva	16
47	Fase crônica	12/04/1995	25/04/2000	?	Recidiva	>36
49	Fase acelerada	21/10/1997		1/1/2001	Recidiva	>36

FONTE: A autora

NOTA: P = número do paciente referente ao Apêndice 2.

6 DISCUSSÃO

É procedimento de rotina que em cada exame citogenético sejam analisadas no mínimo 20 células, isso porque, de acordo com Beiguelman (1982), com esse número é de 85% a probabilidade de detectar uma célula pertencente a uma população com ocorrência inferior a 10% de quimerismo ou mosaicismo, e de 15% a probabilidade de não detectar. Nesta pesquisa, em 73 dos 202 exames realizados após o tratamento com mesilato de imatinibe não foi detectada nenhuma célula Ph positiva. A probabilidade de detectar ou não uma célula Ph+ em tais exames – supondo que no material sob análise houvesse mosaicismo inferior a 10% de células Ph+ – segue a distribuição do binômio $(p+q)^{73}$, onde $p=0,15$ e $q=0,85$. O desenvolvimento desse binômio indica que a probabilidade de não detectar uma única célula Ph+ nos 73 exames é igual a $(0,15)^{73}$ – que é, praticamente, igual a zero –, enquanto a probabilidade de detectá-la em pelo menos um dos exames é igual a $1-(0,15)^{73}$ – que é, praticamente, igual a 1 (100%). Como isso não ocorreu nesta pesquisa, concluiu-se pela confiabilidade dos resultados nela obtidos, isto é, de que os 73 exames não apresentavam células Ph+, constituindo um clone inferior a 10%. Portanto a análise de no mínimo 20 células fornece resultados confiáveis, considerando as limitações resultantes do método usado.

6.1 PACIENTES TRATADOS COM MESILATO DE IMATINIBE

A análise do coeficiente de regressão apresentou um valor de b igual a $-0,075 \pm 0,016$; $t=4,68$; $P < 0,001$, negativo e significativamente diferente de zero, indicando que há dependência na proporção de células Ph positivas em relação ao tempo de tratamento com o mesilato de imatinibe. Portanto, à medida que o tempo de tratamento aumenta, diminui significativamente a proporção de células Ph positivas. Realmente, como se observa na Tabela 4 e nas Figuras 5 e 6, os valores das médias das proporções de células Ph positivas diminuíram sistematicamente desde o primeiro período (6^o mês) até o último período (>36 meses) de tratamento. A diferença é também significativa entre as médias do diagnóstico ($0,99 \pm 0,11$) e do primeiro período ($0,59 \pm 0,41$; $t=8,0$; G.L.=154; $P < 0,001$), indicando o efeito terapêutico do mesilato de imatinibe já no início do tratamento.

Embora a análise da variância não tenha detectado valor significativo para períodos (porque na avaliação desse parâmetro são também consideradas as médias das proporções de

células Ph positivas dos exames dos pacientes submetidos ao TMO), o teste de Tukey detectou diferenças significativas entre as médias do 6º mês e de >36 meses ($\Delta=0,431<0,470$) e entre as médias do 6º mês e do 24º mês ($\Delta=0,270<0,289$), observando-se que há um decréscimo significativo na proporção das médias do primeiro (6º mês) e do último (>36 meses) período de tratamento, corroborando o valor observado do coeficiente de regressão, negativo e significativamente diferente de zero. Analisando as médias das proporções de células Philadelphia positivas nos sete períodos (Tabela 4) em adição aos dados acima e na mesma direção, verifica-se também que nos três primeiros (6º, 12º e 18º meses de tratamento) a resposta citogenética ao tratamento foi superior a 35%, correspondendo a RCM (35% a 95% de células Ph positivas). A partir do quarto período (24º meses) as médias foram inferiores a 35%, o que significa uma RCP (1% a 34% de células Ph positivas) aproximando-se da RCC (0% de células Ph positivas) no último período (>36 meses), quando a média das proporções de células Ph positivas foi de 12%, aproximadamente dez pontos percentuais acima da RCC.

Considerando essas informações e o valor do coeficiente de regressão, foi de interesse estimar o tempo para que o tratamento com mesilato de imatinibe proporcione RCC. De acordo com a equação $y = a + b(x-x_0)$ (BEIGUELMAN, 1988) e usando os dados desta amostra, tem-se: $y=0,44+(-0,075)(8,67-2,75)=0,44(-0,65)+0,21=0,65-0,65=y=zero$. Portanto obteve-se uma RCC num período correspondente a 8,67. Considerando que o período 7 (>36) incluiu exames de 37 a 47 meses, isto é, abrangendo 11 meses, e admitindo que um suposto período 8 incluísse também 11 meses, em 65,4 meses de tratamento – aproximadamente 5 anos e 5 meses (que corresponde ao valor 8,67) – não mais se encontrariam células Ph positivas, o que indicaria ausência do principal marcador genético da doença.

Este estudo mostrou os seguintes resultados no que respeita à resposta citogenética dos 90 pacientes: 38 (42%) tiveram RCC, 10 (11%) RCP, 12 (13,5%) RCM e 30 (33,5%) não responderam. Admitindo, para efeito de obter um parâmetro de comparação, que o número de pacientes com cada tipo de resposta seja igual ($90/4=22,5$) e aplicando aos dados o teste do Qui Quadrado, obtemos um valor igual a 25,02; G.L.=3; $P<0,001$. Os Qui Quadrados parciais para RCC (10,68) e para RCP (6,94) foram responsáveis por 70% do valor do Qui Quadrado total, indicando que nessas duas respostas (para mais no RCC e para menos no RCP) é que ocorreram as maiores diferenças entre o observado e o esperado.

A freqüência observada (42%) para RCC na amostra aqui estudada nos 47 meses de tratamento está muito abaixo dos 81% (187 pacientes analisados) descritos por Kantarjian et

al. (2003). Deve-se considerar, no entanto, que esses autores estudaram somente pacientes com LMC em fase crônica no início do tratamento, enquanto na presente pesquisa 36 (40%) pacientes estavam em fase acelerada e 6 (7%) em crise blástica no início do tratamento. Nas análises citogenéticas foram observadas aberrações adicionais ao cromossomo Ph em 16 pacientes no início do tratamento e em 20 depois de iniciado o tratamento. Considerando a resposta citogenética à dose inicial de mesilato de imatinibe (Tabela 7), verificou-se que o número de pacientes esteve homogeneamente distribuído quanto ao tipo de resposta às diferentes doses administradas ($\chi^2_{12}=19,40$; $P>0,05$), embora o maior número de pacientes [43+37=80 (89%)] tenha apresentado respostas nas doses mais baixas (400 mg/dia e 600 mg/dia) e a maior frequência (36/80=45%) de respostas com estas doses tenha sido a RCC.

A análise citogenética dos 90 pacientes tratados com mesilato de imatinibe foi completa em 83 (92%). Aberrações cromossômicas adicionais e não-adicionais foram verificadas em 36 (40%) pacientes: 32 (89%) após o início do tratamento, dos quais 12 também no início do tratamento e 4 (11%) somente antes do tratamento. Os dados da literatura indicam que, quando ocorre evolução clínica dos pacientes para a fase acelerada ou para a crise blástica, 75% a 80% deles desenvolvem aberrações cromossômicas adicionais ao cromossomo Philadelphia (HEIM; MITELMAN, 1995). Os dados da presente pesquisa (40%) não podem ser comparados com os da literatura porque alguns dos pacientes já se encontravam em fase acelerada ou em crise blástica no início do tratamento e 16 já apresentavam aberrações cromossômicas adicionais. Deve-se considerar também a possibilidade de que os pacientes tratados com mesilato de imatinibe tenham evolução clínica mais favorável do que os submetidos a outros tipos de tratamento e que, portanto, a frequência dos que desenvolvem aberrações cromossômicas secundárias seja menor.

Quanto ao tipo de aberração cromossômica observada após o início do tratamento, os dados desta pesquisa (Tabela 8) estão de acordo com os descritos na literatura (HEIM; MITELMAN, 1995) os quais indicam que a trissomia do 8, o duplo Ph e i(17)(q10) são as mais frequentes, o mesmo ocorrendo em relação aos cariótipos mais complexos, nos quais a trissomia do 8 e o duplo Ph constituem as aberrações mais comuns.

Dois achados devem ser salientados quanto aos dados por último referidos: (a) 3 dos 10 pacientes com trissomia do 8 apresentaram-na tanto no início como durante o tratamento, o mesmo ocorrendo com 3 dos 9 pacientes com duplo Ph e com 1 dos 2 pacientes com -Y. A presença de aberrações denominadas secundárias antes do início do tratamento com mesilato

de imatinibe é justificável, considerando que muitos pacientes iniciaram o tratamento em fase acelerada e em crise blástica ; (b) em 6 dos 36 pacientes registrados – 5 com trissomia do 8 e 1 com del(12)(p12) (Quadro 4) – as aberrações observadas não tinham a presença do cromossomo Ph, daí serem denominadas não-adicionais. Tampouco tinham a presença de Ph outros 6 pacientes com outros tipos de aberrações verificadas após o início do tratamento, e, como era de esperar, o mesmo não se verificou com nenhum dos 16 pacientes que tinham aberrações antes do início do tratamento. Desde que na LMC o mesilato de imatinibe é uma droga com atuação específica na p210, resultante, em geral, da translocação t(9;22)(q11;q34), é possível que nesses cariótipos o clone Ph+ seja eliminado, permanecendo as aberrações secundárias.

Segundo MEDINA et al. (2003), a presença dessas aberrações nas células Ph-negativas de pacientes em fase crônica durante o tratamento com interferon ou com mesilato de imatinibe tem significado diferente da verdadeira evolução clonal. Esses autores analisaram 342 pacientes em fase crônica tratados com mesilato de imatinibe durante aproximadamente 30 meses, para investigar a frequência e o significado das aberrações em células Ph-negativas e observaram que 21 (6%) pacientes desenvolveram 25 aberrações cromossômicas. O tempo médio do aparecimento das aberrações, após o início do tratamento, foi de 6 meses e a aberração mais frequente (33%) foi a trissomia do 8. Vinte (95%) dos pacientes apresentaram MRC e 13 (62%) deles tiveram RCC. Após um acompanhamento aproximado de 22 meses, todos os pacientes permaneciam vivos, 95% dos quais em fase crônica e com resposta hematológica completa. Portanto, embora o tipo de aberração cromossômica seja o mesmo, a evolução clínica desses pacientes é diferente do que a frequentemente observada em pacientes com evolução clonal clássica.

Quanto à evolução clínica dos pacientes da nossa amostra, 10 (11%) foram a óbito durante o tratamento (Quadro 6): 4 (40%) no primeiro período, 1 (10%) no segundo, 2 (20%) no terceiro, 1 (10%) no sexto e 2 (20%) no sétimo. Desses, seis pacientes (60%) não obtiveram resposta citogenética: 4 (67%) no primeiro período e 2 (33%) no sétimo; 3 (30%) obtiveram resposta citogenética mínima: 2 (67%) no primeiro período e 1 (33%) no segundo. O paciente 51, o único que apresentou RCC, foi a óbito por outro tipo de câncer (adenocarcinoma metastático). No início do tratamento, 5 (50%) desses pacientes estavam em fase acelerada (pacientes 34, 61, 53, 78 e 87); 3 (30%) em crise blástica (pacientes 10, 13 e 44) e 2 (20%) em fase crônica (pacientes 1 e 51). Três (30%) apresentaram aberrações adicionais (pacientes 34, 78 e 87); 1(10%) apresentou uma translocação variante (paciente

63); 3 (30%) apresentaram cariótipo normal (pacientes 1, 13 e 61) e em 3 (30%) não foi feita análise completa (pacientes 10, 44 e 51). As aberrações observadas no início do tratamento em quatro pacientes persistiram até o óbito, e em dois (pacientes 78 e 87) foram detectadas outras aberrações além das iniciais. Fica evidente que a frequência de óbitos está relacionada com a fase da doença (80% dos pacientes estavam em fase acelerada ou em crise blástica), com a ausência de resposta citogenética e com o menor (6^o mês) período após o tratamento, onde também foi maior a proporção de células Ph+, conforme descrito nos Resultados e registrado no início desta Discussão.

6.2 PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

A aplicação terapêutica dos transplantes de medula óssea em pacientes com doenças hematopoéticas baseia-se num preparo adequado do paciente nos dias que antecedem a infusão, conhecido como “condicionamento”, cujo objetivo é erradicar os clones neoplásicos, criando assim espaço na medula óssea para permitir a proliferação das células-tronco transplantadas e o restabelecimento do funcionamento normal do tecido. Apesar de serem esses os objetivos dos regimes de condicionamento, vários trabalhos mostram que, não raramente, após o TMO são encontradas células do receptor, que podem ser normais ou neoplásicas. O monitoramento da DRM após o transplante, através da técnica RT-PCR e, mais recentemente, da técnica do PCR em tempo real, fornece informações do risco de recidiva. Pacientes com exames positivos para o rearranjo BCR/ABL seis a doze meses após o transplante e aqueles com persistência ou aumento do número de transcritos têm um aumento significativo do risco de subsequente recidiva citogenética e hematológica (PICHERT et al.,1994). A positividade precoce ou transitória desse exame pode não estar associada com o aumento do risco de recidiva quando comparada com os pacientes PCR-negativos (RADICH et al.,1995). Portanto, as células neoplásicas residuais, freqüentemente mas não obrigatoriamente, são indicativas de recidiva; as normais, por sua vez, quando presentes, podem atuar rejeitando ou não as células do doador, contribuindo, no último caso, para o estabelecimento de um quimerismo celular.

É evidente, portanto, a importância clínica e científica da análise das células do doador e do receptor no organismo do receptor após o TMO. Marcadores genéticos que permitem tal observação podem fornecer informações sobre a recidiva, a rejeição e o sucesso do transplante. Os marcadores genéticos mais usados são os antígenos eritrocitários e

leucocitários, os alótipos de imunoglobulinas, as enzimas eritrocitárias e leucocitárias, os marcadores citogenéticos, os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), os microssatélites (MION, 2000). Entre os marcadores citogenéticos, a presença de células Ph-positivas pode ser avaliada tanto por análise citogenética clássica como por análises moleculares para detectar o rearranjo BCR/ABL, através da RT-PCR ou da PCR em tempo real, o mais recente método quantitativo que usa oligonucleotídeos iniciadores marcados.

O uso de marcadores genéticos para o acompanhamento dos transplantes de medula óssea foi mais freqüente nas décadas de 80 e 90. Nos trabalhos iniciais, quando se aplicou a análise citogenética, admitia-se que a eliminação das células do receptor era essencial para o sucesso do transplante (BOYD et al., 1982). Somente uns poucos dados da literatura indicavam a persistência de células do receptor e completa remissão (SINGER et al., 1983). A partir do trabalho de LAWLER et al. (1984) já se evidenciava que a simples presença de células do receptor após o TMO não indicava obrigatoriamente um prognóstico desfavorável. Pelo contrário, estudos feitos no homem (HILL et al., 1986) e em murinos (ILDSTAD et al. 1986) indicavam que a persistência de células do receptor é até desejada, por reduzir significativamente a ocorrência da DECH. A ausência de células do receptor pode ser atribuída a questões metodológicas, como o pequeno número de células analisadas. No entanto é mais provável que o regime de condicionamento seja o principal responsável pela freqüência de células do receptor. Um regime menos agressivo – que dispense a aplicação de radiação ou que a use em doses fracionadas – possibilita a persistência de maior freqüência de células do receptor (WALKER et al., 1989). Segundo RIBEIRO (1993) e RIBEIRO et al. (1996), a presença de células do receptor em altas proporções em um ou mais períodos após o TMO e não a sua presença em freqüências baixas é que determina, em geral, um prognóstico desfavorável. Esses autores, usando as variantes polimórficas das bandas C, analisaram 15 pacientes com LMC por quatro períodos (30°, 90°, 180° e 360° dias) após o TMO. Verificaram, como acima referido, que uma baixa proporção de células do receptor (em torno de 10%) após o TMO apresenta bom prognóstico, não se observando rejeição ou recidiva e registrando-se 20% (2/10) de óbitos. Já os pacientes com alta proporção (acima de 30%) de células do receptor em um ou mais períodos após o TMO apresentaram prognóstico desfavorável: dois (40%) desses cinco pacientes apresentaram rejeição ou recidiva e quatro (80%) foram a óbito. Alguns trabalhos indicam que a persistência do cromossomo Ph está

associada a um prognóstico desfavorável, sem que ela determine obrigatoriamente o insucesso do transplante (SANDBERG, 1990).

No presente trabalho, a análise do coeficiente de regressão incluindo 137 informações obtidas após o TMO de 56 pacientes apresentou um valor de b igual a $0,02 \pm 0,01$; $t=1,43$; $P>0,10$, positivo e não significativamente diferente de zero. Não há, portanto, uma dependência das variações das proporções de células Ph positivas em função do tempo após o TMO. Resultado muito semelhante ($b=0,02 \pm 0,02$; $t=1,1$; $P>0,20$) foi descrito por RIBEIRO (1993) e RIBEIRO et al. (1996). Verificou-se também (Tabela 4 e Figuras 5 e 6) que os valores das médias das proporções de células Ph positivas variaram para mais ou para menos ao longo dos sete períodos analisados, sem tendência importante de aumento ou diminuição. A análise da variância não detectou significância para períodos, o que foi confirmado pelo teste de Tukey, que apresentou valores não significativos na comparação das diferenças das médias das proporções em todos os períodos após o tratamento, concordando com o valor do coeficiente de regressão. No entanto, a diferença do pré-TMO ($0,92 \pm 0,15$) e do primeiro período (6º mês) após o TMO ($0,138 \pm 0,310$) foi estatisticamente significativa. Este resultado era esperado devido à alta proporção de células Ph+ antes do tratamento e à sua importante redução logo após o transplante resultante do condicionamento, conforme acima referido.

Embora os critérios usados para a avaliação da resposta citogenética tenham sido inicialmente introduzidos somente para pacientes tratados com mesilato de imatinibe e INF- α (KANTARJIAN et al., 2003), é de crer que sua aplicação possa ser estendida para pacientes submetidos ao TMO, desde que não se façam comparações com o quadro clínico do paciente. Assim, verificou-se (Tabela 4) que, embora as médias das proporções de células Ph+ em quatro períodos (12º, 24º, 30º e >36 meses) apresentassem valores compatíveis com RCP (1% a 35% de células Ph+), elas estão muito próximas do limite inferior da RCM (35% a 95% de células Ph+). As médias do 6º mês (0,138) e do 18º (0,192) é que são consistentes com a RCP, enquanto a do 36º mês (0,013) provavelmente não reflete o real comportamento citogenético dos pacientes neste período, uma vez que somente quatro exames de diferentes pacientes foram realizados.

Apresentaram recidiva 23 (41%) dos 56 pacientes, 2 dos quais (8,7%) no primeiro período, 6 (26%) no segundo, 2 (8,7%) no terceiro, 1 (4%) no quarto, 4 (17%) no quinto e 8 (35%) no último período. Esses resultados são compatíveis com as médias das proporções de células Ph+, já que quanto menores foram os valores destas, menor foi a frequência de

recidivas (6^o e 18^o mês), e quanto mais altas, maior foi a frequência de pacientes com recidiva (12^o, 30^o e >36 meses). A única exceção foi observada no 24^o mês, quando a frequência de pacientes que recidivaram foi de 4% e a média das proporções de células Ph+ foi igual a 0,325. Os resultados do 6^o período (36^o mês) – quando não houve recidiva de pacientes, embora a proporção de células Ph+ fosse baixa (0,013) – não podem ser interpretados com segurança, já que, como se viu, nesse período foram analisados somente quatro exames de diferentes pacientes, o que constitui uma amostra inconsistente.

Foram a óbito 7 (12,5%) dos 56 pacientes, 4 (57,1%) dos quais no 7^o período (>36 meses), quando se observou uma média de proporções de células Ph+ de 0,334. Cinco (71,4%) dos 7 pacientes que foram a óbito recidivaram e 2 (28,4%), que não responderam ao tratamento, apresentaram aberrações cromossômicas adicionais (pacientes 5 e 30). Dos 6 pacientes que apresentaram aberrações cromossômicas adicionais, 3 (50%) recidivaram; 2 (33%) não responderam ao tratamento e 1 (17%) entrou em remissão. O i(17)(q10) foi o tipo de aberração mais frequente, tendo sido observado em 3 (50%) dos 6 cariótipos analisados, o que está de acordo com os dados da literatura (HEIM; MITELMAN, 1995) que indicam que esta é uma das mais frequentes aberrações secundárias na LMC.

7 CONCLUSÕES

1) A média das idades dos 90 pacientes tratados com mesilato de imatinibe foi de $41,18 \pm 13,13$ e a dos pacientes submetidos ao TMO de $28,18 \pm 9,93$. A diferença foi estatisticamente significativa ao nível de 0,05 ($t'=6,77 > t_c=1,98$). Esse resultado é compatível com um dos critérios para que o paciente seja submetido ao TMO, isto é, que a idade não seja superior a 50 anos, o que demonstra que o tratamento com mesilato de imatinibe proporciona maior oportunidade terapêutica para os pacientes com idade mais avançada do que o TMO.

2) O coeficiente de regressão das proporções de células Ph+ em função do tempo de tratamento com mesilato de imatinibe foi de $-0,075 \pm 0,016$; $t=4,68$; $P < 0,001$, negativo e significativamente diferente de zero, indicando que a proporção de células Ph+ diminui consistentemente em função do período após o tratamento. O mesmo coeficiente para os pacientes submetidos ao TMO foi de $0,02 \pm 0,01$; $t=1,43$; $P > 0,10$, positivo e não significativamente diferente de zero, indicando que as variações das proporções de células Ph+ independem do período após o TMO. Considerando que o cromossomo Philadelphia é o principal marcador genético da LMC e que a sua presença é um dos indicadores da evolução clínica do paciente, é coerente admitir que o mesilato de imatinibe é terapeuticamente mais eficiente do que o TMO. O valor do coeficiente de regressão na primeira amostra permite estimar, até mesmo, que em aproximadamente cinco anos os pacientes tratados com mesilato de imatinibe não mais apresentem células Ph+.

3) Nas duas amostras as diferenças entre as médias das proporções de células Ph+ do diagnóstico e do primeiro período (6^o mês) de tratamento foram significativas a 0,05, enquanto tanto no diagnóstico como no primeiro período as médias dos pacientes submetidos ao TMO foram menores.

4) O teste de Tukey demonstrou diferenças significativas nas médias das proporções de células Ph+ nos pacientes tratados com mesilato de imatinibe entre o 6^o mês e o 24^o mês e entre o 6^o mês e >36 meses. Essa última diferença deve ser mais valorizada, pois é ela que mais corrobora o resultado do coeficiente de regressão. Por outro lado, as médias das proporções de células Ph+ dos diferentes períodos após o TMO não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que justifica o resultado não significativo entre períodos na análise da variância. No entanto nesta mesma análise detectou-se diferença significativa para a interação, o que é indicativo de que os dois tipos de tratamento apresentassem diferenças significativas entre as médias das proporções de células Ph+ num mesmo período. Realmente,

o teste t demonstrou diferenças significativas entre as médias do primeiro período (0,591 e 0,138, respectivamente para o mesilato de imatinibe e para o TMO; $t=5,195$; $P<0,001$), do sexto período (0,266 e 0,013, respectivamente; $t'=2,30 > tc=2,16$) e do sétimo período (0,121 e 0,334, respectivamente para o mesilato de imatinibe e para o TMO; $t'=2,24 > tc=2,22$). Observa-se que, se nas duas primeiras comparações as médias do mesilato de imatinibe foram significativamente maiores do que as do TMO, na última (>36 meses) ocorreu o contrário, justificando plenamente o resultado significativo obtido na interação na análise da variância.

5) A RCP, avaliada pelas médias das proporções de células Ph+ nos diferentes períodos, foi mais freqüente ($4/7=0,57$) nos quatro últimos nos pacientes tratados com mesilato de imatinibe. Nos pacientes submetidos ao TMO essas médias estiveram muito próximas do limite inferior da RCP, caracterizando-se, praticamente, como RCM, e foram as mais freqüentes ($4/7=0,57$), distribuindo-se ao longo dos sete períodos (12°, 24°, 30° e > 36 meses). Portanto o tipo de resposta citogenética foi mais efetivo nos pacientes tratados com mesilato de imatinibe do que nos submetidos ao TMO. Saliente-se que as diferentes classificações para a resposta citogenética foram também usadas para os pacientes submetidos ao TMO, mas sem correlacioná-las com o quadro clínico.

6) As aberrações cromossômicas secundárias mais freqüentes foram +8, duplo Ph e $i(17)(q10)$ nos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe, e $i(17)(q10)$ nos submetidos ao TMO, o que está de acordo com o esperado (HEIM; MILTELMAN, 1995).

7) Nos dois tipos de tratamento os óbitos coincidiram com os períodos de maior proporção de células Ph+.

8) Finalmente, observou-se que, na maioria dos parâmetros analisados, a resposta dos pacientes tratados com mesilato de imatinibe foi melhor do que a dos submetidos ao TMO. Entretanto, nos dois tratamentos a freqüência de óbitos (11% de pacientes tratados com mesilato de imatinibe e 12,5% nos submetidos ao TMO) foi semelhante. Deve-se considerar, porém, a maior freqüência de pacientes em fase acelerada e crise blástica entre os tratados com mesilato de imatinibe.

8 REFERÊNCIAS

APPERLEY, J.F.; JONES, L.; HALE, G.C. et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. **Bone Marrow Transplant**, v. 1, p. 53-66, 1986.

BACCARANI, M.; RUSSO, D.; ROSTI, G. et al. Alfa- INF for chronic myeloid leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 40, n. 1, p. 22-33, 2003.

BARRETT, A.J.; GORDON, M.Y. Treatment strategies in bone marrow disorders. In: _____. **Bone marrow disorders: the biological basis of treatment**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993.

BEDI, A.; BARBER, J.P.; BEDI, G.C. et al. BCR-ABL mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. **Blood**, v. 86, p. 1148-1158, 1995.

BEHM, F.G. Malignancies of the bone marrow. In: PARHAM, D. M. (Ed.) **Pediatric neoplasia: morphology and biology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 465-488.

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1988.

BEN NERIAH, Y.; DALEY, G.Q.; MES MASSON, A.M. et al The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science**, v. 233, p. 212-214, 1986.

BERGER, R. Differences between blastic chronic myeloid leukemia and Ph- positive acute leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v.11 (suppl 1), p. 235-237, 1993.

BERNSTEIN, R.; GALE, R.P. Do chromosome abnormalities determine the type of acute leukemia that develops in CML? **Leukemia**, v. 4, n. 1, p. 65-68, 1990.

BOYD, C.N.; RAMBERG, R.C.; THOMAS, E.D. The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Leukemia Research**, v. 6, n. 6, p. 833-837, 1982.

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

BRINCKER, H. Population-based age- and sex-specific incidence rates in the 4 main types of leukemia. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 29, p. 241-249, 1982.

CAMPBELL, L.J.; PATSOURIS, C.; RAYEROUX, K.C. et al. *BCR/ABL* amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 139, p. 30-33, 2002.

- CANELLOS, G.P.; GRIFFIN, J.D. Chronic granulocytic leukemia: the heterogeneity of stem cell differentiation within a single disease entity. **Seminars in Oncology**, v. 12, n. 3, p. 281-283, 1985.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosome. **Experimental Cell Research**, v. 60, p. 315-319, 1970a.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C. Analysis of the human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. **Experimental Cell Research**, v. 62, p. 490-492, 1970b.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C. Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4,5e X. **Experimental Cell Research**, v. 61, p. 474-476, 1970c.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C. et al. Identification of the human chromosome by DNA-binding fluorescent agents. **Chromosoma**, v. 60, p. 215-227, 1970d.
- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSON, C. et al. Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei. **Experimental Cell Research**, v. 61, p. 472-474, 1970e.
- CERVANTES, F.; COLOMER, D.; VIVES-CORRONS, J.L. et al. Chronic myeloid leukemia of thrombocytemic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features? **Leukemia**, v. 10, p. 1241, 1996.
- CHAMPLIN, R.E.; GOLDE, D.W. Chronic myelogenous leukemia: recent advances. **Blood**, v. 65, n. 5, p. 1039-1047, 1985.
- CHASE, A.; PICKARD, J.; SZYDLO, R. et al. Non-random involvement of chromosome 13 in patients with persistent or relapsed disease after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 27, p. 278-284, 2000.
- CHOPRA, R.; PU, Q.Q.; ELEFANTY, A.G. Biology of BCR-ABL. **Blood Reviews**, v. 13, p. 211-229, 1999.
- CLARKSON, B.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D. et al. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p. 1211-1262, 2003.
- COHEN, G.B.; REN, R.; BALTIMORE, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. **Cell**, v. 80, p. 237-248, 1995.
- COLEMAN, M.; SILVER, R.T.; PAJAK, T.F. et al. Combination chemotherapy for terminal-phase chronic granulocytic leukemia: cancer and leukemia group B studies. **Blood**, v. 55, n. 1, p. 29-36, 1980.
- COLLINS, S.; COLEMAN, H.; GROUDINE, M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. **Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 8, p. 2870-2876, 1987.

COLLINS, S.J.; GROUDINE, M.T. Chronic myelogenous leukemia: amplification of a rearranged c-abl oncogene in both chronic phase and blast crisis. **Blood**, v. 69, n. 3, p. 893-898, 1987.

CORTES, J.; GILES, F.; O'BRIEN, S. Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α . **Blood**, v. 102, n. 1, p. 83-86, 2003.

CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; GILES, F. 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, 2003b.

CORTES, J.E.; O'BRIEN, S.M.; GILES, M. et al. Investigational strategies in chronic myelogenous leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 619-639, 2004.

CREMER, T.; LANDEGENT, J.; BRUCKNER, A. et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and nonradioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1-84. **Human Genetics**, v. 74, p. 346-352, 1986.

CROSSMAN, L.C.; O'BRIEN, S.G. Imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 605-617, 2004a.

CROSSMAN, L.C.; O'BRIEN, S.G. Clinical results with imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Leukemia research**, v. 28S1, p. S3-S9, 2004b.

DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 824-830, 1990.

DAZZI, F.; SZYDLO, R.M.; CROSS, N.C. et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 8, p. 2712-2718, 2000.

DIEKMANN, D.; BRILL, S.; GARRET, M.D. et al. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21 rac. **Nature**, v. 351, p. 400-402, 1991.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N. et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3691-3698, 1997.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3354, 2000.

DEININGER, M.W.N.; DRUKER, B.J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 401-423, 2003.

DERDERIAN, P.M.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. et al. Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. **American Journal of Medicine**, v. 94, p. 69-74, 1993.

DEUTSCH, E.; JARROUSSE, S.; BUET, D. et al. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4583-4588, 2003.

DOWNWARD, J. Regulation of p21 ras by GTPase activating proteins and guanine nucleotide exchange proteins. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, p. 13-18, 1992.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E. et al. Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 5, p. 561-566, 1996.

DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

ENRIGHT, H.; MCGLAVE, P. Chronic myelogenous leukemia. In: EDWARD, J.J.B.; COHEN, H.J.; FURIE, B.; HOFFMAN, R.; MCGLAVE, P.; SHATTIL, S.J.; SILBERSTEIN, L.E.; STRAUSS, M. (Ed.). **Hematology: basic principles and practice**. Great Britain: Churchill Livingstone, 1999. p.1155-1171.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. **Oncology**, v. 13, n. 2, p. 169-184, 1999.

FADERL, S.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.18(3), p.657-70, 2004.

FIALKOW, P.J.; JACOBSON, R.J.; PAPAYANNOPOULOU, T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. **American Journal of Medicine**, v. 63, n. 1, p. 125-130, 1977.

FRANKLIN, I.M.; MILLS, K. Chronic myeloid leukemia. In: PROVAV, D.; GRIBBEN, J. (Ed.) **Molecular Haematology**, Oxford : Blackwell Science, 2000. p. 61-74.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; Le COUTRE, P.; MOLOGNI, L et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL⁺ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 23, n. 19, p. 380-394, 1997.

GIANNONE, L.; WHITLOCK, J.A.; KINNEY, M.C. et al. Use of the BCR probe to demonstrate extramedullary recurrence of CGL with a T cell lymphoid phenotype following bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 3, n. 6, p. 631-635, 1988.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia: still a few questions. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 2-10, 2004.

GOLDMAN, J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. **Current Opinion in Hematology**, v.12(1), p. 33-9, 2005.

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1084-1086, 2001.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v. 293, p. 876-880, 2001.

GRATWOHL, A.; HERMANS, J. The working party chronic leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. **Bone Marrow Transplant**, v. 179 (suppl. 3), p. S7-S9, 1996.

GRIESSHAMMER, M.; HEINZE, B.; HELLMANN, A. et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis: retrospective analysis of prognostic factors in 90 patients. **Annals of Hematology**, v. 73, p. 225-230, 1996.

GUILHOT, F.; CHASTANG, C.; MICHALLET, M. et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 4, p. 223-229, 1997.

GUILHOT, F.; ROY, L.; GUILHOT, J. et al. Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, p. 585-603, 2004.

GUTIERREZ, M. I.; TIMSON, G.; SIRAJ, A. K. et al. Single monochrome Real-Time RT-PCR Assay for Identification, Quantification, and Breakpoint Cluster Region Determination of t(9;22) Transcripts. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.7(1), p. 40-47, 2005.

HAGEMEIJER, A.; BARTRAM, C.R.; SMIT, E.M. et al. Is the chromosomal region 9q34 always involved in variants of the Ph translocation? **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 13, n. 1, p.1-16, 1984.

HEIM, S.; MITELMAN, F. Chronic myeloid leukemia. In: _____ **Cancer cytogenetics**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1995. p.33-68.

HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R. et al. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. **Nature**, v. 299, p. 747-749, 1982.

HEISTERKAMP, N.; STAM, K.; GROFFEN, J. et al. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. **Nature**, v. 315, p. 758-761, 1985.

HELMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J. et al. Randomized comparison of bulsufan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. **Blood**, v. 82, p. 398,1993.

HELMANN, R.; ANSARI, H., H.; HASFORD, J. et al. Comparative analysis of the impact of risk profile and of drug therapy on survival in CML using Sokal's index and a new score. **British Journal of Haematology**, v. 97, p. 76-85, 1997.

HEMATOLOGY. **American Society of Hematology Educational Program**, p. 91, 2000.

HILL, R.S.; PETERSEN, F.B.; STORB, R. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 67, n. 3, p. 811-816, 1986.

HOROWITZ, M.M.; ROWLINGS, P.A.; PASSWEG, J.R. Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. **Bone Marrow Transplant**, v. 17 (suppl. 3), p. S5-S6, 1996.

HSU, T.C. Mammalian chromosomes "in vitro". The karyotype of man. **Journal Hereditas**, v. 43, p. 167-172, 1952.

HUNTLY, B.J.P.; GUILHOT, F.; ALISTAIR, G.; REID, A.G. et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. 2205. **Blood**, v. 102, p. 2205-2212, 2003.

IBMTR (International Bone Marrow Transplantation Registry) - **Form095-CML(2/97)**, p.1-7.

IBMTR (International Bone Marrow Transplantation Registry). **State in the art in transplantation**. 2002. 1 CD-ROM.

ILDSTAD, S.T.; WREN, S.M.; BLUESTONE, J.A. et al. Effect of selective T cell depletion of host and/or donor bone marrow on lymphopoietic repopulation, tolerance, and graft-vs-host disease in mixed allogeneic chimeras (B10 + B10.D2---B. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 1, p. 28-33, 1986.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetics and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta Haematologica**, v. 107, p. 76-94, 2002.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; GUTTERMAN, J. Biologic therapy of chronic myelogenous leukemia. **Oncology (Huntingt)**, v. 1, n. 7, p. 35-40, 48-49, 52, 1987.

KANTARJIAN, H.; DIXON, D.; KEATING, M.J. et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 61, p. 1441-1446, 1988.

KANTARJIAN, H.; KEATING, M.; SMITH, T. et al. Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia. **The American Journal of Medicine**, v. 88, p. 1-8, 1990.

KANTARJIAN, H.M.; DEISSEROTH, A.; KURZROCK, R. et al. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**, v. 82, n. 3, p. 691-703, 1993.

KANTARJIAN, H.M.; SMITH, T.L.; O'BRIEN, S. et al. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, p. 254-261, 1995.

KANTARJIAN, H.; MELO, J.V.; TURA, S.; GIRALT, S.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies. **Hematology** (American Society of Hematology Educational Program), p. 90-109, 2000.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 2177-2187, 2002a.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E. et al. Imatinib mesylate therapy for relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1590-1595, 2002b.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E. et al. Treatment of Philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 2167–2176, 2002c.

KANTARJIAN, H.M.; CORTES, J.; O'BRIEN, S. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3547-3553, 2002d.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E. et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. **Cancer**, v. 97, n. 4, p. 1033-1041, 2003a.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E. et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 12, p. 2636-2642, 2003b.

KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. et al. Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 97, n. 9, p. 2225-2228, 2003c.

KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. et al. High dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 103, n. 8, p. 2873-2878, 2004.

KOLIBABA, K.S.; DRUKER, B.J. **Medscape Oncology**, v. 3, n. 2, 2000. Disponível em: <<http://www.medscape.com/Medscape/oncology/journal/2000/v03.n02/mo4283.druk/mo4283.druk-01.html>>.

KURZROCK, R.; SHTALRID, M.; ROMERO, P. et al. A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. **Nature**, v. 325, p. 631-635, 1987.

LAWLER, S.D.; BAKER, M.C.; HARRIS, H. et al. Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. **British Journal of Haematology**, v. 56, n. 3, p. 431-443, 1984.

Le COUTRE, P.; MOLOGNI, L.; CLERIS, L. et al. In vivo eradication of human BCR/ABL positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, p.163-168, 1999.

LEE, S.J. Review: chronic myelogenous leukemia. **British Journal of Haematology**, v. 111, p. 993-1009, 2000.

LEHNINGER. **Understand! Biochemistry**. Lehninger principles of biochemistry. 3/e version. Copyright 2000 The Mona Group LLC. CD.ROM.

LICHTMAN, M.A. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: BUETLER, M.A.; LICHTMAN, B.S.; COLLIER, T.J.; KIPPS (Ed.). **Williams hematology**. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 298–324.

MAHON, F.X.; DEININGER, M.W.; SCHULTHEIS, B. et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. **Blood**, v. 96, p. 1070-1079, 2000.

MAJLIS, A.; SMITH, T.L.; TALPAZ, M. et al. Significance of cytonetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, p. 196-203, 1996.

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.

MEDINA, J.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome-negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. **Cancer**, v. 98(9), p.1905-11, 2003.

MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 10, p. 751, 1996.

MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic myeloid leukemia. **Hematology** (American Society of Hematology Educational Program), p. 132-152, 2003.

MITELMAN, F. **ISCN: An international system for human cytogenetics nomenclature**. Basel: S. Karger [s.d.], 1995

MION, A.L.V. **Avaliação, através da análise de regiões hipervariáveis do genoma humano, da recuperação autóloga, alogênica ou quimérica em pacientes com anemia aplástica severa, submetidos ao transplante de medula óssea**. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MITELMAN, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 11 (suppl. 1), p. 11-15, 1993.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. **Recurrent chromosome aberrations in cancer**. 2001. Disponível em: <[http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Recurrent Aberrations](http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Recurrent%20Aberrations)>.

NISHII, K.; KABAROWSKI, J.H.; GIBBONS, D.L. et al. Ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell block. **Oncogene**, v. 13, p. 2225-2234, 1996.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497-1498, 1960.

NOWELL, P.; ROWLEY, J.; KNUDSON, A. Cancer genetics, cytogenetics-defining the enemy within. **Nature Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1107-1111, 1998.

PASSWEG, J.R.; ROWLINGS, P.A.; HOROWITZ, M.M. Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 12, n. 1, p. 81-92, 1998.

PICHERT, G.; ALYEA, E.P.; SOIFFER, R.J. et al. Persistence of myeloid progenitor cells expressing BCR/ABL mRNA after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v.84, p.2109-14, 1994.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", 1976.

RADICH, J.P.; GEHLY, G.; GOOLEY, T. et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. **Blood**, v. 85, p. 2632-2638, 1995.

RAIMONDI, S.C.; MATHEW, S.; PUI, C.H. Cytogenetics as a diagnostic aid for childhood hematologic disorders. In: HANAUSEK, M.; WALASZEK, Z. (Ed.). **Methods in molecular medicine, tumor markers protocols**. Totowa, NJ: Human Press, 1998. v. 14, p.209-227.

RIBEIRO, E.M.S.F. **Estudos citogenéticos em pacientes submetidos a transplante de medula óssea**. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RIBEIRO, E.M.S.F; CAVALLI, J.I; SCHMID, A.T.L. et al. Cytogenetic analysis in human bone marrow transplantation. **Cancer Genetic Cytogenetic**, v. 89, p. 21-26, 1996.

ROWLEY, J.D. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. **Annales de Génétique**, v. 16, p. 109-112, 1973a.

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

ROWLEY, J.D. Chromosomes in leukemia and lymphoma. **Seminars in Hematology**, v. 15, n. 3, p. 301-319, 1978.

ROWLEY, J.D. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. **Seminars in Hematology**, v. 36 (suppl. 7), p. 59-72, 1999.

SAGLIO, G.; GUERRASIO, A.; ROSSO, C. et al. New type of BCR/ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 76, p. 1819-1823, 1990.

SAGLIO, G.; PANE, F.; GOTTARDI, E. et al. Consistent amounts of acute leukemia-associated p190 BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patient at diagnosis. **Blood**, v. 87, p. 1075, 1996.

SANDBERG, A.A. **The chromosomes in human cancer and leukemia**. New York: Elsevier, 1990.

SAWYERS, C.L.; HOCHHAUS, A.; FELDMAN, E. et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3530-3539, 2002.

SCHERES, V.M.J.C. Identification of two Robertsonian translocation with a Giemsa banding technique. **Humangenetik**, v. 15, p. 253-256, 1972.

SCHUH, A.C.; SUTHERLAND, D.R.; HORSFALL, W. et al. Chronic myeloid leukemia arising in a progenitor common to T cells and myeloid cells. **Leukemia**, v. 4, n. 9, p. 631-636, 1990.

SHIMONI, A.; KRÖGER, N.; ZANDER, A.R. et al. Imatinib mesylate (STI571) in preparation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and donor lymphocyte

infusions in patients with Philadelphia-positive acute leukemias. **Leukemia**, v. 17, p. 290-297, 2003.

SHTIVELMAN, E.; LIFSHITZ, B.; GALE, R.P. et al. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. **Nature**, v. 315, p. 550-554, 1985.

SHTIVELMAN, E.; LIFSHITZ, B.; GALE, R.P. et al. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. **Cell**, v. 47, p.277-284, 1986.

SILVER, R.T.; WOOLF, S.H.; HELLMANN, R. et al. An evidence – based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1517-1536, 1999.

SINCLAIR, P.B; NACHEVA, E.P.; LEVERSHA, M. et al. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 738-743, Feb. 1, 2000.

SINGER, J.W.; KEATING, A.; RAMBERG, R. et al. Long-term stable hematopoietic chimerism following marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: a case report with in vitro marrow culture studies. **Blood**, v. 62, n. 4, p.869-72, 1983.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARANI, M. et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 789-99,1984.

SPENCER, A.; O'BRIEN, S.G.; GOLDMAN, J.M. Options for therapy in chronic myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**, v. 91, p. 2-7, 1995.

STANGLMAIER, M.; WARMUTH, M.; KLEINLEIN, I. et al. The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains. **Leukemia**, v. 17, p. 283-289, 2003.

STONE, R.M. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. **The Oncologist**, v. 9, p. 259-270, 2004.

STRYCKMANS, P.; BIERNAUX, C.; SELS, A. et al. Very low levels of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. **Blood**, v. 86, p. 3118–22,1995.

TALPAZ, M.; McCREDIE, K.B.; MAVLIGIT, G.M. et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cyto reduction in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 62, p. 689-692, 1983.

TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.M.; McCREDIE, K.B et al. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leucemia. **Blood**, v. 69, p. 1280-1288, 1987.

TALPAZ, M.; SILVER, R.T.; DRUKER, B.J. et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. **Blood**, v. 99, p. 1928-1937, 2002.

TJIO, J.H.; LEVAN, H. The chromosome number of man. **Hereditas**, v. 42, p. 1-6, 1956.

TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP. Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 21, p. 1616-1620, 1997.

VAN DER FELTZ, M.J.; SHIVJI, M.K.; GROSVELD, G. et al. Molecular analysis of the translocation breakpoint in a Philadelphia-positive, bcr-negative ALL patient. **Haematology Blood Transfusion**, v. 32, p. 331-334, 1989.

YEE, K.; ANGLIN, P.; KEATING, A. Molecular approaches to the detection and monitoring of chronic myeloid leukemia: theory and practice. **Blood Reviews**, v. 13, p. 105-126, 1999.

VAN-ETTEN, R.A.; JACKSON, P.; BALTIMORE, D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. **Cell**, v. 58, p. 669-678, 1989.

VIAL, T.; DESCOTES, J. Clinical toxicity of the interferons. **Drug Safety**, v. 10, n. 2, p. 115-150, 1994.

WALKER, H.; SINGER, C.R.; PATTERSON, J. et al. The significance of host haemopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. **British Journal of Haematology**, v. 62, n. 2, p.385-391, 1986.

WITTE, O.N. Closely related BCR/ABL oncogenes are associated with the distinctive clinical biologies of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous and acute lymphocytic leukemia. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 141, p. 42-49, 1988.

WONG, S.; WITTE, O.N. The bcr-abl story: bench to bedside and back. **Annuals Reviews of Immunology**, v. 22, p. 247-306, 2004.

YEE, K.; ANGLIN, P.; KEATING, A. Molecular approaches to the detection and monitoring of chronic myeloid leukemia: theory and practice. **Blood reviews**, v. 13, p. 105-126, 1999.

APÊNDICES

Apêndice 1: Tratamento com mesilato de imatinibe

Apêndice 2: Transplante de medula óssea (TMO)

Legendas das tabelas abaixo:

P= paciente

S= sexo

I= idade

So= sobrevida

Períodos após o tratamento (mesilato de imatinibe)																												
P	S	I (anos)	So (meses)	0 meses			6 meses			12 meses			18 meses			24 meses			30 meses			36 meses			>36 meses			
				a	b	c	a	b		a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	
1	M	32	9	17	20	0,85	20	20	1																			
2	M	55	44	20	20	1	0	20	0				0	20	0				0	20	0	0	20	0				
3	M	53	5	20	20	1	20	20	1																			
4	M	44	15	20	20	1	11	20	0,55	10	23	0,43																
5	M	47	33	16	20	0,8	0	20	0							0	20	0							0	20	0	
6	M	45	36	20	20	1	3	20	0,15							0	20	0				0	20	0				
7	F	65	34	20	20	1				20	20	1				20	20	1				20	20	1				
8	M	26	9	20	20	1	0	20	0	0	21	0																
9	M	34	12	20	20	1	20	20	1	20	20	1																
10	M	53	5	20	20	1	20	20	1																			
11	F	56	15	20	20	1	0	20	0																			
12	M	43	13	20	20	1	20	20	1				29	30	0,97													
13	M	48	4	20	20	1	17	20	0,85																			
14	M	54	9	20	20	1	21	21	1	20	20	1																
15	M	32	22	20	20	1	0	20	0	2	20	0,1				0	20	0										
16	M	19	30	20	20	1				19	23	0,83	10	20	0,5				2	20	0,1							
17	M	36	43	20	20	1	11	20	0,55				20	20	1				17	20	0,85							
18	M	29	36	30	30	1				0	20	0										0	20	0				
19	M	59	13	16	20	0,8	18	20	0,9																			
20	M	69	2	20	20	1	17	20	0,85																			
21	F	30	21	20	20	1				2	24	0,08	0	20	0	0	20	0										
22	M	27	15	20	20	1							0	20	0													
23	F	31		21	21	1				20	20	1																
			17							20	20	1																
24	M	32	35	20	20	1	19	20	0,95				6	20	0,3				0	20	0	0	20	0				

Períodos após o tratamento (mesilato de imatinibe)																											
P	S	I	So	0 meses			6 meses			12 meses			18 meses			24 meses			30 meses			36 meses			>36 meses		
				a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
25	M	34		20	20	1	15	20	0,75																		
			39				0	20	0									0	20	0				0	20	0	
26	M	36	14	20	20	1				0	20	0	0	20	0												
27	M	28	10	20	20	1				2	20	0,1															
28	M	24	10	20	20	1	12	20	0,6	0	20	0															
29	M	45		20	20	1	15	20	0,75																		
							12	20	0,6	10	20	0,5	5	20	0,25				8	20	0,4	5	20	0,25	4	20	0,2
			44																					13	20	0,65	
30	F	55	9	20	20	1	10	20	0,5																		
31	M	26	26	20	20	1				26	28	0,93	10	20	0,5	10	20	0,5	4	25	0,17						
32	M	19	8	20	20	1	20	20	1																		
33	F	44	9	20	20	1	0	20	0																		
34	F	34		20	20	1	20	20	1																		
			5				20	20	1																		
35	F	36	5	41	41	1	20	20	1																		
36	M	38	12	20	20	1				5	25	0,2	9	20	0,45												
37	M	29	3	20	20	1	20	20	1																		
38	F	47	15	20	20	1	8	20	0,4	1	20	0,05	0	20	0												
39	M	45	8	20	20	1	23	24	0,96																		
40	M	51	37	35	35	1				1	20	0,05					2	20	0,1	0	20	0			4	20	0,2
41	M	51	40	20	20	1				0	20	0				0	20	0				0	20	0			
42	M	30		20	20	1	13	20	0,65																		
			51				14	20	0,7									4	20	0,2							
43	M	39	8	20	20	1	5	20	0,25																		
44	M	42	2	20	20	1	32	32	1																		
45	M	38	38	20	20	1	22	22	1	20	20	1											20	20	1		

Períodos após o tratamento																															
P	S.	I (anos)	So (meses)	0 meses			6 meses			12 meses			18 meses			24 meses			30 meses			36 meses			> 36 meses						
				a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c				
48	M	38	>47	20	20	1				0	20	0																			
49	F	20	39	20	20	1				21	21	1	21	21	1																
50	F	7a	6	20	20	1	20	20	1																						
51	M	30	>47	16	20	0,8				5	29	0,2				0	22	0	0	20	0				0	20	0				
																											22	22	1		
																													0	20	0
																													20	20	1
52	M	42	20	20	20	1				19	21	0,9																			
53	M	22	>47	10	20	0,5																				20	20	1			
																												25	25	1	
54	M	26	32	20	20	1	0	20	0									20	20	1											
55	M	34	>47	20	20	1	3	20	0,15									0	20	0						0	20	0			
56	F	18	42	20	20	1	0	20	0						1	20	0,05	0	20	0						0	20	0			
																													0	20	0