

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA MILLAN FACHI



LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO,  
MONITORAMENTO TERAPÊUTICO POR UPLC-QTOF-MS E REVISÃO  
SISTEMÁTICA DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

CURITIBA

2020

MARIANA MILLAN FACHI

LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO,  
MONITORAMENTO TERAPÊUTICO POR UPLC-QTOF-MS E REVISÃO  
SISTEMÁTICA DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2020

Fachi, Mariana Millan

Leucemia mieloide crônica [recurso eletrônico]: estudo epidemiológico, monitoramento terapêutico por UPLC-QTOF-MS e revisão sistemática dos inibidores de tirosina quinase / Mariana Millan Fachi – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

1. Tirosina quinase. 2. Leucemia mieloide crônica. 3. Sobrevida. 4. Revisão sistemática. 5. Monitoramento. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de MARIANA MILLAN FACHI intitulada: LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, MONITORAMENTO TERAPÊUTICO POR UPLC-QTOF-MS E REVISÃO SISTEMÁTICA DOS INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTAROLO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica  
22/12/2020 11:14:49.0  
ROBERTO PONTAROLO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
21/12/2020 18:07:54.0  
FERNANDA STUMPF TONIN  
Avaliador Externo (PÓS-DOC/UFPR)

Assinatura Eletrônica  
08/01/2021 11:28:13.0  
SUZANE VIRTUOSO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
23/12/2020 12:51:15.0  
MICHEL LEANDRO DE CAMPOS  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

A minha família por todo amor.  
Ao meu orientador por possibilitar a realização desta etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que me proporcionou e por ser meu maior amparo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Maria Francisca Millan e Devanir Fachi por serem os meus maiores exemplos e incentivadores e por sempre estarem ao meu lado. Cada conquista da minha vida eu dedico a eles.

A minha irmã Fernanda Millan Fachi, que sempre esteve e estará junto comigo em todas as etapas da minha vida. Sou grata pelo amor, carinho, paciência, compreensão e por aceitar a minha ausência quando necessário.

Ao Rafael Freire Sanfelice que esteve ao meu lado durante esta trajetória, por toda paciência, generosidade, compreensão, amor, incentivo, companheirismo e dedicação.

A toda a minha família e em especial as minhas tias Millan, que sempre nos mostraram a importância de estudar, e que sempre nos incentivaram a correr atrás dos nossos sonhos.

Aos amigos de longa data e aos amigos que fiz durante estes anos na pós-graduação (principalmente os amigos do CEB), por estarem sempre presentes mesmo distantes. Agradeço à disposição e a amizade, as boas recordações e principalmente pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço em especial as minhas super amigas Fernanda Stumpf Tonin (por acreditar tanto em mim e me ensinar tanto), Raquel Oliveira Vilhena e Beatriz Böger que fizeram estes quatro anos serem maravilhosos.

A Capes, pela bolsa de estudo concedida.

Ao meu admirável orientador Roberto Pontarolo. Agradeço por ter me acolhido tão bem, pela confiança e incentivo, pela amizade, pelo aprendizado e pela imensa oportunidade.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar Churchill

## RESUMO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa, caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia. O tratamento da LMC pode ser realizado com os seguintes inibidores de tirosina quinase (ITK): bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe. **Capítulo 1:** Neste trabalho, inicialmente foi conduzido um estudo observacional de coorte retrospectivo para caracterizar a população acometida com LMC a partir da base de dados *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER). As análises de sobrevida foram feitas utilizando os métodos de Kaplan-Meier e regressão de Cox tempo dependente. A avaliação da correlação entre a LMC e outro câncer foi estimada através do risco relativo. Foram incluídos 35.860 pacientes com a doença. Os fatores associados ao prognóstico na LMC foram idade, sexo, ano e teste de diagnóstico, a sequência do tumor e a raça do paciente. Ainda, observou-se que os cânceres tratados principalmente com radioterapia predispõem para a LMC e que a LMC (como doença primária) pode favorecer o aparecimento de outros cânceres devido à sua patologia ou ao tratamento com ITK. **Capítulo 2:** Foi realizada uma revisão sistemática nas bases eletrônicas Pubmed, Web of Science, Scielo e Scopus de ensaios clínicos randomizados que avaliassem a eficácia e segurança dos ITKs. Foram incluídos 24 estudos. A meta-análise em rede evidenciou que o nilotinibe foi a melhor alternativa para o tratamento da LMC, tanto para os desfechos de eficácia (resposta hematológica, citogenética e molecular) e segurança (eventos adversos gerais e hematológicos). **Capítulo 3:** Foi conduzida uma revisão sistemática para abordar os parâmetros farmacocinéticos dos ITKs tanto em pacientes saudáveis quanto em pacientes com LMC. As buscas foram conduzidas no PubMed, Scopus e Web of Science, sendo incluídos 49 estudos (bosutinibe=8, imatinibe=25, nilotinibe=11, ponatinibe=5). As análises estatísticas foram conduzidas por meio de meta-análise e por simulação de monte Carlo, demonstrando a necessidade de cuidado na coadministração dos ITKs com indutores e inibidores enzimáticos hepáticos, inibidores da bomba de próton, antiácidos e antagonistas H<sub>2</sub>, assim como em pacientes com insuficiência hepática. **Capítulo 4:** Com base na importância do monitoramento terapêutico para a eficácia clínica, um novo método por UPLC-HRMS foi desenvolvido para determinação simultânea dos ITKs. Os ITKs foram detectados por fonte *electrospray* no modo positivo de ionização. O padrão interno foi oclacitinibe. O desenvolvimento do método foi realizado através do *Analytical Quality by Design*. O solvente extrator selecionado foi acetato de etila: dietil éter. Para a separação dos analitos foi usada uma coluna ciano e acetonitrila/água (ambas com 0,06% de ácido fórmico e 3,2 mM de formiato de amônio) em modo gradiente. O método foi validado e apresentou-se adequado para todos os parâmetros, podendo ser usado com confiabilidade para a monitorização terapêutica.

Palavras-chave: Inibidor de tirosina quinase. Leucemia mieloide crônica. Sobrevida global.

Revisão sistemática. Monitoramento terapêutico



## ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative pathology, characterized by the presence of the Philadelphia chromosome. For the treatment of CML can be performed with the following tyrosine kinase inhibitors (TKI): bosutinib, dasatinib, imatinib, nilotinib, ponatinib and radotinib. **Chapter 1:** In this work, an observational retrospective cohort study was initially conducted to characterize the population affected with CML from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) database. Survival analyzes were performed using the Kaplan-Meier methods and time-dependent Cox regression. The assessment of the correlation between CML and other cancer was estimated through relative risk. 35,860 patients with CML were included. The factors associated with CML prognosis were age, sex, year and diagnostic test, the tumor sequence and the patient's race. Cancers treated mainly with radiotherapy predispose to CML and CML (as a primary disease) behaved as risk factors for other cancers due to its pathology or treatment with TKI. **Chapter 2:** A systematic review was performed in the electronic databases Pubmed, Web of Science, Scielo and Scopus, for the inclusion of randomized clinical trials evaluating the efficacy and safety of TKI. 24 studies were included. Network meta-analysis demonstrated that nilotinib was the best alternative for the treatment of CML, both for efficacy (hematological, cytogenetic and molecular response) and for safety outcomes (overall and hematological adverse events). **Chapter 3:** A systematic review was conducted to address the pharmacokinetic parameters of ITKs in both healthy and CML patients. The searches were conducted in PubMed, Scopus and Web of Science, including 49 studies (bosutinib=8, imatinib=25, nilotinib=11, ponatinib=5). Statistical analyzes were conducted through meta-analysis and Monte Carlo simulation, and highlighted the need for caution when co-administering ITKs with hepatic enzyme inducers and inhibitors, proton pump inhibitors, antacids and H2 antagonists, as well as in patients with liver failure. **Chapter 4:** Based on the importance of therapeutic drug monitoring (TDM) for clinical effectiveness, a new method by UPLC-HRMS was developed for simultaneous determination of TKI. TKI were detected in the positive ionization mode using electrospray as the source. The internal standard was oclacitinib. The method was developed using Analytical Quality by Design. The extracting solvent selected was ethyl acetate:diethyl ether. For the separation of the analytes, a cyano column was used as a stationary phase and acetonitrile/water (both with 0.06% formic acid and 3.2 mM ammonium formate) in gradient mode as a mobile phase. The method was validated according to the main bioanalytical guidelines. The method was validated and proved to be suitable for all parameters and can be used reliably for therapeutic monitoring.

Keywords: Tyrosine kinase inhibitor. Chronic myeloid leukemia. Overall survival. Systematic review. Therapeutic monitoring

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. TRANSLOCAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMO 9 E 22 .....	25
FIGURA 2. GENE BCR .....	26
FIGURA 3. DECLÍNIO DA RESPOSTA DURANTE O TRATAMENTO .....	36
FIGURA 4. CORRELAÇÃO DO ANO DE DIAGNÓSTICO E ESTADO VITAL. 63	
FIGURA 5. SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM LMC EM MESES64	
FIGURA 6. SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS DOS PACIENTES COM LMC EM MESES.....	64
FIGURA 7. ANÁLISE DE SOBREVIDA POR KAPLAN-MEIER PARA AS VARIÁVEIS BASAIS (A) SEXO, (B) FAIXA ETÁRIA, (C) ORIGEM, (D) RAÇA, (E) QUIMIOTERAPIA, (F), TESTE DE DIAGNÓSTICO, (G) ANO DO DIANÓSTICO, (H) NÚMERO DE REGISTRO DO CÂNCER .....	68
FIGURA 8. FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE RISCO .....	73
FIGURA 9. FLUXOGRAMA DA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	90
FIGURA 10. AVALIAÇÃO GLOBAL DO RISCO DE VIÉS PELA FERRAMENTA COCHRANE.....	94
FIGURA 11. DIAGRAMA DE REDE OBTIDA PARA OS DESFECHOS DE EFICÁCIA.....	95
FIGURA 12. DIAGRAMA DE REDE OBTIDA PARA OS DESFECHOS DE SEGURANÇA.....	97
FIGURA 13. SUCRA FINAL CONSIDERANDO DESFECHO DE EFICÁCIA (MMR) E SEGURANÇA (EVENTOS ADVERSOS SÉRIOS).....	100
FIGURA 14. FLUXOGRAMA DA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	111
FIGURA 15. A PROBABILIDADE DE ALCANCE DA META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 63 NG.ML <sup>-1</sup> .....	121
FIGURA 16. A PROBABILIDADE DE ALCANCE DA META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 1000 NG.ML <sup>-1</sup> PARA IMATINIBE .....	128
FIGURA 17. PROBABILIDADE DE NILOTINIBE DE ATINGIR A META, QUE FOI CALCULADA COM BASE EM CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE 800 NG.ML <sup>-1</sup> COM INTERVALO DE DOSE DE 12 H. ....	133
FIGURA 18. A PROBABILIDADE DE ALCANCE DA META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 23 NG.ML <sup>-1</sup> .....	137

FIGURA 19. DIAGRAMA DE ESPINHA DE PEIXE DE ISHIKAWA QUE DESCREVE A RELAÇÃO ENTRE CAUSA E EFEITO NOS CQA POTENCIAIS DO MÉTODO BIOANALÍTICO DE ITKS .....	162
FIGURA 20. CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA CADA CONDIÇÃO TESTADA.....	163
FIGURA 21. RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO/PRECIPITAÇÃO .....	165
FIGURA 22. PLANEJAMENTO EM REDE SIMPLEX [3,3] .....	167
FIGURA 23. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA .....	168
FIGURA 24. GRÁFICO DE PARETO DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS.....	170
FIGURA 25. COMBINAÇÕES DE FATORES PARA A MAXIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ITKS .....	173
FIGURA 26. CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 100 NG.ML <sup>-1</sup> DOS ANALITOS BOSUTINIBE, DASATINIBE, IMATINIBE, NILOTINIBE, PONATINIBE, RADOTINIBE E OCLACITINIBE (PI).....	174
FIGURA 27. ESPECTRO OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 100 NG.ML <sup>-1</sup> DOS ANALITOS BOSUTINIBE, DASATINIBE, IMATINIBE, NILOTINIBE, PONATINIBE, RADOTINIBE E OCLACITINIBE (PI).....	175
FIGURA 28. SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM BOSUTINIBE (B), DASATINIBE (C), IMATINIBE (D), NILOTINIBE (E), PONATINIBE (F), RADOTINIBE (G), E OCLACITINIBE (H) .....	177
FIGURA 29. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO BOSUTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	178
FIGURA 30. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO DASATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	179
FIGURA 31. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO IMATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	179
FIGURA 32. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO NILOTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	180

FIGURA 33. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO PONATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	180
FIGURA 34. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO RADOTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML <sup>-1</sup> EM PLASMA .....	181
FIGURA 35. CROMATOGRAMAS EXTRAÍDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL INJETADAS APÓS A AMOSTRA COM CONCENTRAÇÃO DO LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO .....	186

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESPOSTA DO MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE ACORDO COM A ELN/NCCN .....	37
TABELA 2. MONITORAMENTO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE ACORDO COM A ELN E NCCN .....	37
TABELA 3. CARACTERÍSTICAS BASAIS DOS PACIENTES COM LMC (N=35.860) .....	61
TABELA 4. DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM LMC (n=35.860).....	62
TABELA 5. DADOS DE SOBREVIDA POR KAPLAN-MEIER PARA AS VARIÁVEIS BASAIS .....	66
TABELA 6. RESULTADO ANÁLISE DE COX-TEMPO-DEPENDENTE .....	70
TABELA 7. NÚMERO DE CASOS SUBSEQUENTES DE CÂNCER APÓS A LMC E NÃO LMC .....	75
TABELA 8. CÂNCERES SECUNDÁRIOS A LMC RELATADOS NA LITERATURA.....	76
TABELA 9. NÚMERO DE CÂNCERES ANTECEDENTES A LMC E NÃO LMC .....	79
TABELA 10. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A QUIMIOTERAPIA E RADIOTERAPIA ANTES DA LMC .....	80
TABELA 11. ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NAS BASES DE DADOS .....	87
TABELA 12. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS .....	91
TABELA 13. ANÁLISE DE QUALIDADE POR JADAD .....	93
TABELA 14. RESULTADO DA ANÁLISE DE SUCRA PARA EFICÁCIA .....	96
TABELA 15. RESULTADO DA ANÁLISE DE SUCRA PARA CADA FÁRMACO CONSIDERANDO OS DESFECHOS DE SEGURANÇA .....	98
TABELA 16. ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NAS BASES DE DADOS .....	108
TABELA 17. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA BOSUTINIBE.....	113
TABELA 18. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA IMATINIBE .....	114

TABELA 19. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA NILOTINIBE .....	116
TABELA 20. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA PONATINIBE.....	117
TABELA 21. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE BOSUTINIBE.....	119
TABELA 22. META-ANÁLISE DE AUC <sub>0-∞</sub> DO BOSUTINIBE .....	120
TABELA 23. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE BOSUTINIBE.....	121
TABELA 24. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IMATINIBE .....	124
TABELA 25. META-ANÁLISE DE AUC <sub>0-t</sub> E AUC <sub>0-∞</sub> PARA IMATINIBE.....	126
TABELA 26. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IMATINIBE .....	127
TABELA 27. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE NILOTINIBE .....	130
TABELA 28. META-ANÁLISE DE AUC <sub>0-t</sub> E AUC <sub>0-∞</sub> PARA NILOTINIBE.....	131
TABELA 29. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE NILOTINIBE .....	132
TABELA 30. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE PONATINIBE.....	136
TABELA 31. META-ANÁLISE DE AUC <sub>0-t</sub> E AUC <sub>0-∞</sub> PARA PONATINIBE.....	136
TABELA 32. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE PONATINIBE.....	137
TABELA 33. ESTRUTURA QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANALITOS E PADRÃO INTERNO .....	147
TABELA 34. ATP PARA MÉTODO UPLC-HRMS DE ITKS .....	150
TABELA 35. PLANEJAMENTO CENTROIDE SIMPLEX AMPLIADA.....	153
TABELA 36. FATORIAL FRACIONADO PARA AS VARIÁVEIS CONTÍNUAS .....	154
TABELA 37. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX BEHNKEN .....	155
TABELA 38. VARIÁVEIS CATEGÓRICAS TESTADAS E RESULTADOS ....	164
TABELA 39. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA .....	166
TABELA 40. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA .....	168
TABELA 41. VALORES DE P NO FATORIAL FRACIONADO.....	169
TABELA 42. MODELO DE REGRESSÃO DOS EXPERIMENTOS DE BOX-BEHNKEN.....	171
TABELA 43. COEFICIENTES DE REGRESSÃO DOS ITKS EM RELAÇÃO AOS FATORES .....	172
TABELA 44. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CONFIRMAÇÃO .....	173

TABELA 45. RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO .....	182
TABELA 46. RESULTADOS OBTIDOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ITKS	184
TABELA 47. RESULTADOS OBTIDOS PARA O EFEITO MATRIZ.....	185
TABELA 48. RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS ITKS EM PLASMA ..	187
TABELA 49. RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS ITKS EM SOLUÇÃO	187

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	– Agência nacional de vigilância sanitária
AQbD	– <i>Analytical Quality by design</i>
ATP	– <i>Analytical Target Profile</i>
AUC <sub>0-∞</sub>	– Área sob a curva do tempo de zero até o infinito
AUC <sub>0-t</sub>	– Área sob a curva do tempo de zero até o tempo
CCyR	– Resposta citogenética completa
CHR	– Resposta hematológica 13ompleta
Cl/F	– Clearance oral
C <sub>max</sub>	– Concentração plasmática máxima
CMP	– <i>Critical method parameters</i>
CMR	– Resposta molecular completa
CQ	– Controle de qualidade
CQA	– Controle de qualidade de alta concentração
CQA	– <i>Critical Quality Attribute</i>
CQB	– Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	– Controle de qualidade de diluição
CQM	– Controle de qualidade de média concentração
DP	– Desvio padrão
DPR	– Desvio padrão relativo
EAS	– Eventos adversos sérios
ECR	– Ensaio clínico randomizado
ELN	– <i>European Leukemia Net</i>
ESI	– Fonte de ionização <i>electrospray</i>
FA	– Amostra de plasma fortificada antes da extração
FD	– Amostra de plasma fortificada depois da extração
FDA	– <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
IC	– Intervalo de confiança
IQR	– Intervalo interquartil
ITK	– Inibidores de tirosina quinase
K <sub>el</sub>	– Constante de taxa de eliminação
LIQ	– Limite inferior de quantificação
LLA	– Leucemia linfoide aguda



LMC	– Leucemia mieloide crônica
LMC-1 <sup>st</sup>	– Pacientes com LMC como câncer primário com câncer subsequente
LMC -2 <sup>nd</sup>	– Pacientes com LMC como câncer secundário
MCyR	– Resposta citogenética maior
MMR	– Resposta molecular maior
M-VCR	– <i>major breakpoint cluster region</i>
nLMC-1 <sup>st</sup>	– Pacientes com outro tipo de câncer primário seguido por outro câncer secundário
nLMC-2 <sup>nd</sup>	– Pacientes com outro tipo de câncer secundário
NCCN	– <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NMA	– Meta-análise em rede
OMS	– Organização mundial de saúde
OR	– <i>Odds Ratio</i>
PCR	– Resposta citogenética parcial
PCR	– <i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	– <i>Platelet derived growth factor</i>
PFS	– Sobrevida livre de progressão
Ph	– Cromossomo Philadelphia
PI	– Padrão interno
SCF	– <i>Stem cell factor</i>
SEER	– <i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SG	– Sobrevida global
$t_{1/2}$	– Meia vida de eliminação
TDM	– Monitoramento terapêutico de medicamentos
$t_{max}$	– Tempo de concentração máxima observada
Vd/F	– Volume oral de distribuição

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
1.1. Objetivo geral.....	23
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	24
2.1. Leucemia mieloide crônica .....	24
2.1.1. Epidemiologia.....	24
2.1.2. Patogenia .....	25
2.1.3. Clínica .....	30
2.1.4. Diagnóstico .....	32
2.1.5. Tratamento .....	36
2.2. Análise de sobrevivência .....	46
2.2.1. Kaplan-Meier .....	46
2.2.2. Regressão de COX .....	47
2.3. Revisão Sistemática .....	47
2.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas .....	49
2.4.1. Espectrometria de massas.....	49
2.4.2. Cromatografia líquida .....	50
2.5. Método bioanalítico.....	51
2.5.1. Preparação da amostra.....	51
2.5.2. Desenvolvimento analítico por <i>Analytical Quality by Design</i> .....	52
2.5.3. Validação de método bioanalítico.....	53
<b>CAPÍTULO 1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, SOBREVIDA E FATORES DE RISCO DA LMC .....</b>	<b>55</b>
3. INTRODUÇÃO .....	56
4. OBJETIVO.....	57
4.1. Objetivo geral.....	57
4.2. Objetivos específicos .....	57
5.MATERIAL E MÉTODOS .....	58
5.1. Desenho do estudo, fonte de dados e amostras .....	58
5.2. Análise descritiva .....	58
5.3. Análise de sobrevida por Kaplan-Meier e regressão de Cox covariável Tempo dependente.....	59
5.4. Avaliação de fatores de risco .....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61

6.1. Análise descritiva.....	61
6.2. Análise de sobrevida.....	63
6.2.1. Considerações gerais.....	63
6.2.2. Estimacão de tempo de sobrevida: análise de Kaplan-Meier.....	63
6.2.3. Investigao dos fatores prognósticos: análise de regressão de Cox covariável tempo-dependente.....	69
6.3. Avaliao de fator de risco.....	72
6.3.1. LMC como fator de risco para outros cânceres.....	74
6.3.2. Outros cânceres como fator de risco para a LMC.....	78
7. CONCLUSÃO.....	82
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DOS ITKS .....</b>	<b>83</b>
8. INTRODUO .....	84
9. OBJETIVO.....	85
9.1. Objetivo geral.....	85
9.2. Objetivo específico .....	85
10. MATERIAL E MÉTODOS .....	86
10.1. Revisão sistemática .....	86
10.1.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	86
10.1.2. Localizao dos estudos .....	87
10.1.3. Seleo dos estudos .....	88
10.1.4. Coleta dos dados .....	88
10.1.5. Avaliao da qualidade dos estudos .....	88
10.2. Apresentao dos resultados e meta-análises .....	89
11. RESULTADOS .....	89
11.1. Revisão sistemática.....	89
11.2. Avaliao da qualidade metodológica e risco de viés.....	93
11.3. Meta-análises .....	94
11.3.1. Meta-análises de eficácia.....	94
11.3.2. Meta-análises de segurança .....	97
11.4. Correlao dos desfechos de eficácia e segurança .....	99
12. DISCUSSÃO .....	100
13. CONCLUSÃO.....	103

<b>CAPÍTULO 3. REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS .....</b>	<b>104</b>
14. INTRODUÇÃO .....	105
15. OBJETIVO.....	106
15.1. Objetivo geral.....	106
15.2. Objetivo específico .....	106
16. MATERIAL E MÉTODOS .....	107
16.1. Triagem, elegibilidade e extração .....	108
16.2. Análises estatísticas .....	109
16.2.1. Meta-análise.....	109
16.2.2. Simulação de Monte Carlo .....	110
17.RESULTADOS .....	110
17.1. Estudos incluídos.....	110
17.2. Bosutinibe .....	118
17.2.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do bosutinibe.....	118
17.2.2. Simulação de Monte-Carlo para bosutinibe .....	120
17.3. Imatinibe .....	122
17.3.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do imatinibe.....	122
17.3.2. Simulação de Monte-Carlo para imatinibe .....	127
17.4. Nilotinibe .....	129
17.4.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do nilotinibe .....	129
17.4.2. Simulação de Monte-Carlo para nilotinibe.....	132
17.5. Ponatinibe.....	134
17.5.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do ponatinibe .....	134
17.5.2. Simulação de Monte-Carlo para ponatinibe .....	137
18. DISCUSSÃO .....	138
19. CONCLUSÃO.....	141
<b>CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO .....</b>	<b>142</b>
20. INTRODUÇÃO .....	143
21. OBJETIVO.....	145
21.1. Objetivo geral.....	145
21.2. Objetivos específicos .....	145
22. MATERIAL E MÉTODOS .....	146

22.1. Padrões analíticos .....	146
22.2. Solventes e reagentes .....	148
22.3. Preparo da solução estoque .....	148
22.4. Preparo da solução de trabalho .....	148
22.5. Otimização dos parâmetros espectrométricos .....	148
22.6. <i>Analytical Quality by design</i> (AQbD) .....	149
22.6.1. Definindo o ATP e CQA .....	149
22.6.2. Análise de risco .....	150
22.7. Desenvolvimento cromatográfico através de AQbD .....	151
22.7.1. Seleção das variáveis categóricas .....	151
22.7.2. Otimização do preparo de amostra utilizando o planejamento experimental de mistura centroide simplex .....	152
22.7.3. Variáveis contínuas .....	153
22.8. Preparação das amostras para validação do método .....	156
22.8.1. Amostras fortificadas antes da extração .....	156
22.8.2. Amostras fortificadas depois da extração .....	156
22.8.3. Amostras de controle de qualidade .....	157
22.9. Validação do método bioanalítico .....	157
22.9.1. Limite inferior de quantificação .....	158
22.9.2. Seletividade .....	158
22.9.3. Curva de calibração .....	158
22.9.4. Precisão e exatidão .....	159
22.9.5. Recuperação .....	159
22.9.6. Efeito matriz .....	159
22.9.7. <i>Carryover</i> (efeito residual) .....	160
22.9.8. Estabilidade .....	160
23. RESULTADOS .....	161
23.1. Otimização dos parâmetros espectrométricos .....	161
23.2. <i>Analytical Quality-by-Design</i> .....	162
23.1.1. Análise de risco .....	162
23.2. Desenvolvimento cromatográfico através de AQbD .....	162
23.2.1. Seleção das variáveis categóricas .....	162
23.2.2. Otimização do preparo de amostra utilizando o planejamento experimental de mistura centroide simplex .....	165

23.2.3. Variáveis contínuas .....	169
23.3. Validação do método bioanalítico .....	176
23.3.1. Limite inferior de quantificação.....	176
23.3.2. Seletividade.....	176
23.3.3. Curva de calibração .....	178
23.3.4. Precisão e exatidão.....	181
23.3.5. Recuperação .....	184
23.3.6. Efeito matriz .....	184
23.3.7. <i>Carryover</i> (efeito residual).....	185
23.3.8. Estabilidade.....	186
24. CONCLUSÃO.....	188
REFERÊNCIAS .....	189

## 1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma patologia mieloproliferativa (*i.e.*, que tem origem na medula óssea), resultante da expansão clonal de células hematopoiéticas. Essa doença está relacionada com a presença do cromossomo Philadelphia, formado pela translocação entre o proto-oncogene ABL (do inglês, *Abelson murine leukemia*) encontrado no braço longo do cromossomo 9 (região 34 - 9q34) com o gene BCR (do inglês, *breakpoint cluster region*), localizado no braço longo do cromossomo 22 (região 11 - 22q11) [1-3].

Apesar de a LMC ser uma doença rara, com incidência mundial anual de 1-2 casos por 100.000 habitantes, representa aproximadamente 15% do total de casos de leucemias em adultos [4, 5]. No Brasil, no ano de 2014, o número de novos casos foi de aproximadamente 1.500, e a prevalência anual da LMC foi estimada em 10.125 casos [6].

Atualmente, os inibidores de tirosina quinase (ITK) são considerados os tratamentos medicamentosos padrões para a LMC, havendo os seguintes medicamentos comercialmente disponíveis: bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe. O objetivo deste arsenal terapêutico é obter respostas hematológicas, citogenéticas e moleculares completas. Contudo, para o sucesso terapêutico, é imprescindível que haja a seleção do medicamento e do regime posológico de forma adequada para cada paciente, considerando os perfis de eficácia e segurança das terapias disponíveis, seu acesso e custos [7].

Além disso, fatores como a não adesão medicamentosa, ou possíveis alterações farmacocinéticas podem comprometer a concentração adequada do fármaco na circulação sanguínea, e conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica. Os métodos bioanalíticos possibilitam a realização do monitoramento terapêutico e de estudos farmacocinéticos [8-10].

Considerando esse cenário de diversos fármacos disponíveis para a LMC, aliado à crescente divulgação na literatura científica de evidências, e a importância da obtenção dos níveis plasmáticos adequados das terapias utilizadas, torna-se de suma importância analisar criticamente as informações disponíveis, desenvolver um método bioanalítico a fim de embasar decisões em saúde e políticas públicas e possibilitar o monitoramento terapêutico, respectivamente. Para isso, o presente trabalho foi separado em quatro

capítulos, com os seguintes temas: 1) condução de um estudo epidemiológico para caracterizar a população com LMC e avaliar possíveis fatores de risco relacionados à sobrevida da LMC, 2) condução de uma revisão sistemática visando a avaliar a eficácia e segurança dos ITKs; 3) condução de uma revisão sistemática para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos destes medicamentos; e 4) desenvolvimento de um método bioanalítico para a quantificação em plasma humano.



## 1.1. Objetivo geral

Avaliar a LMC com relação a aspecto epidemiológico e medicamentoso.

Capítulo 1: Avaliar a sobrevida global da população acometida pela LMC e identificar cânceres que podem ser fatores de risco para causar a LMC, ou ainda, doenças em que a LMC é considerada fator de risco

Capítulo 2: Comparar a evidência do perfil de eficácia e segurança dos inibidores de tirosina quinase utilizados para LMC e ponderar seus riscos e benefícios.

Capítulo 3: Reunir sistematicamente evidências sobre os parâmetros farmacocinéticos dos inibidores de tirosina quinase

Capítulo 4: Desenvolver e validar um método bioanalítico utilizando o *Quality by design* através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução para a quantificação simultânea destes fármacos em plasma humano.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leucemia mieloide crônica

A leucemia mieloide crônica (LMC) consiste em uma patologia mieloproliferativa, resultante da expansão clonal de uma célula hematopoiética pluripotente. Essa doença é associada a translocação entre o braço longo do cromossomo 9 e o braço longo do cromossomo 22, denominado de cromossomo Philadelphia (Ph). Nessa patologia, há excessiva proliferação da linhagem mieloide, seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular e terminando num quadro de leucemia aguda [11, 12].

Dentre os fatores de riscos que podem aumentar a probabilidade da ocorrência dessa patologia, destaca-se principalmente a exposição à radiação, evidenciado pela alta incidência da doença em sobreviventes à bomba atômica em Hiroshima e Nagasaki, ou pela demonstração *in vitro* da fusão BCR-ABL em células hematopoiéticas irradiadas [13-17]. Soma-se a este fator de risco ambiental, à exposição ocupacional ao benzeno, e evidências epidemiológicas comprovando que o estilo de vida e o aumento da idade contribui para o aparecimento da patologia [13, 18, 19].

#### 2.1.1. Epidemiologia

A LMC, apesar de ser uma doença rara com incidência de 1-2 casos por 100.000 habitantes, representa aproximadamente 15% dos casos de leucemias em adultos [4]. Há uma discreta predominância no sexo masculino, na proporção de 3:2, contudo o desenvolvimento da LMC é similar em ambos os sexos [20-22]. Acomete diferentes faixas etárias, sendo que a nível internacional é frequentemente diagnosticado entre 60 e 65 anos, enquanto no Brasil a mediana de idade ao diagnóstico é entre 40 e 45 anos [20, 23].

Não existem predileções étnicas ou geográficas deste câncer, todavia, devido a disponibilidade de fármacos e tecnologias de diagnóstico a evolução da doença tende a variar entre um país e outro [4, 21, 22, 24].

Em 2016, aproximadamente 8.220 pessoas foram diagnosticadas nos Estados Unidos com LMC, e ainda, 1.070 pessoas tiveram mortes vinculadas a esta enfermidade [24, 25]. Com relação ao Brasil, o número de novos casos em

2014 foi de aproximadamente 1.500 [26]. Em 2012 foram registrados no sistema de informações ambulatoriais do Sistema Único de Saúde – SUS (SIA-SUS) 81.001 procedimentos quimioterápicos de LMC em adultos, tendo uma prevalência anual de 10.125 casos [23].

### 2.1.2. Patogenia

A LMC caracteriza-se pela translocação entre o cromossomo 9 e 22 t(9;22) (q34;q11). Este é formado pela associação entre o proto-oncogene ABL (*Abelson murine leukemia*, vírus de leucemia murina de Abelson) presente no braço longo do cromossomo 9, na região 34 (9q34); para o gene BCR (*breakpoint cluster region*) localizado no braço longo do cromossomo 22 na região 11 (22q11) [1-3] Essa translocação é mostrada na FIGURA 1.

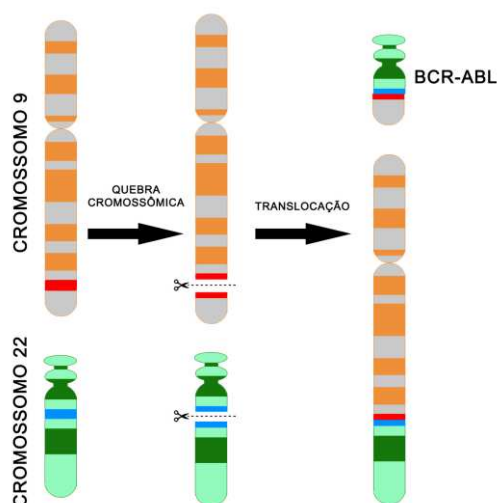


FIGURA 1. TRANSLOCAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMO 9 E 22

FONTE: Adaptado de Vieira (2016) [27]

#### 2.1.2.1. Gene BCR

O gene BCR, apresenta 130 kb de comprimento e 23 éxons, além do primeiro (e1') e segundo (e2') éxons alternativos. É responsável pela codificação de duas proteínas citoplasmáticas a p130<sup>bcr</sup> (4,5 kb) e p160<sup>bcr</sup> (7,0 kb). Estas são expressas em maior concentração nos estágios iniciais da diferenciação da linhagem mieloide e estão vinculadas ao processo de transdução de sinal, especialmente por aqueles regulados por proteína G [28, 29].

O gene BCR é composto por pseudogenes: BCR1, BCR2, BCR3 e BCR4. O pseudogene BCR1 é o principal envolvido na translocação 9;22, apesar dos demais já terem sido relatados no cromossomo híbrido 22q11. Além disso, o gene BCR contém três possíveis regiões de quebra sendo estas *major breakpoint cluster region* (M-BCR), *minor breakpoint cluster region* (m-BCR) e *micro breakpoint cluster region* ( $\mu$ -BCR), demonstradas na FIGURA 2 [28-30].

O primeiro éxon do BCR apresenta papel significativo na ação do gene híbrido, por estar sempre incluso neste gene independentemente da localização da quebra. Contém um domínio com atividade serina e treonina quinase, domínios que se ligam à SH-2, além de uma região helicoidal de oligomerização (*coiled-coil domain*) [16, 28-30].

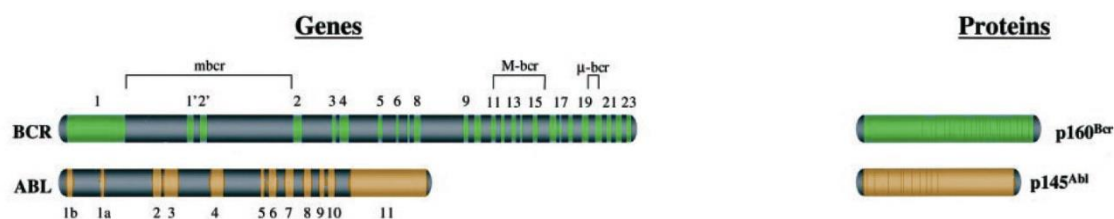


FIGURA 2. GENE BCR

FONTE: Adaptado de Quintas-Cardama (2019) [16]

#### 2.1.2.2. Gene ABL

Consiste em um proto-oncogene humano homólogo ao oncogene v-ABL, encontrado no vírus da leucemia murina de Abelson, apresentando 11 éxons e 230 kb de comprimento. Codifica uma proteína nuclear de 145 kDa (p145), majoritariamente presente no núcleo, com atividade de tirosina quinase e sobre a modulação celular. Todavia, a atividade de tirosina quinase é controlada por um mecanismo de auto-regulação envolvendo interações intramoleculares entre o domínio com o sítio catalítico da quinase (SH1) com os domínios SH2 e SH3, assim como, com o grupo miristoil presente na porção amino-terminal [30-32].

#### 2.1.2.3. BCR-ABL

Em situações na qual ocorreu a translocação dos cromossomos 9 e 22, há a fusão de BCR e ABL formando o gene BCR-ABL. Nesta fusão, o gene ABL perde sua conformação inativa, resultando em alta atividade quinase

constitutiva, enquanto o gene BCR apresenta os domínios de oligomerização que permite o agrupamento de proteínas quiméricas com consequente ativação da molécula ABL [30-32].

Este gene híbrido transcreve um RNA mensageiro quimérico, com consequente tradução em uma proteína quimérica de peso molecular variável de acordo com a localização de quebra no gene BCR do cromossomo 22, visto que no gene ABL a região de quebra é constante no éxon a2 [33, 34]. Assim, podem ser formadas as seguintes proteínas citoplasmáticas:

- p190: com 190 kDa, formada quando há quebra na região *minor breakpoint cluster region* (m-BCR), ao nível de e1, produzindo o transcrito e1a2. Presente principalmente em casos de leucemia linfóide aguda (LLA). Uma minoria de pacientes com LMC apresentam este transcrito.
- p210: com 210 kDa, associada a quebra na região *major breakpoint cluster region* (M-BCR), entre os éxons 13 e 14 (b2), ou 14 e 15 (b3), produzindo as isoformas b2a2, e b3a2, respectivamente. Esta proteína está presente em 90% dos casos de LMC.
- p230: com 230 kDa, sintetizada a partir da clivagem na região *micro breakpoint cluster region* (u-BCR), formando o transcrito e19a2, relatada em paciente com leucemia neutrofílica crônica e raramente em LMC [35-37].

Todas essas proteínas quiméricas, localizadas a nível citoplasmático, estão associadas a atividade tirosina quinase intrínseca, com consequente descontrole na divisão celular e evolução da patologia. Durante este processo, há o comprometimento em diversas vias de sinalização, que levam as seguintes alterações fisiológicas:

#### *Adesão celular*

Em situações normais as células progenitoras hematopoiéticas se associam ao estroma da medula óssea por meio de receptores  $\beta 1$  integrinas. Contudo, durante o desenvolvimento desta leucemia, observa-se que a adesão encontra-se comprometida, de forma que as células progenitoras não recebem os estímulos que inibem a proliferação, assim como, são liberadas para a corrente sanguínea na forma prematura [38-40]. Uma das possíveis causas desta falha de adesão consiste em alterações relacionadas aos receptores de

integrina das células progenitoras, assim como, a aquisição de interações adesivas a outras proteínas presentes na matriz extracelular, tais como, colágeno do tipo IV e laminina [38-40].

### *Proliferação celular*

Diversas vias de sinalização são afetadas pelo oncogene BCR-ABL, incluindo as seguintes vias:

- Via Ras: Ras (*Rat Sarcoma*) é uma proteína de baixo peso molecular, presente na superfície interna da membrana plasmática e responsável pela transdução de sinais que conduzem estímulos de diferentes receptores celulares para fatores de transcrição. Apresenta-se na forma ativa associada ao GTP e na forma inativa ao GDP [38, 41-45]. Na presença da proteína BCR-ABL, a via de Ras encontra-se constitutivamente ativa, em que o mecanismo molecular de ativação de Ras envolve proteínas GRB-2, CRKL e SHC. O principal alvo da via RAS ativada são proteínas serinas-treoninas quinases, denominadas de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês, *mitogen activated protein kinase*) que ao serem ativadas culminam na desregulação de fatores de transcrição associados a diversos processos celulares, tais como, proliferação, diferenciação e transformação celular [38, 41-45].
- Via de JAK/STAT: as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs) são consideradas fatores de transcrição citoplasmáticos que são fosforilados após a interação entre seu receptor presente na superfície da célula com fatores de crescimento ou citocinas [30, 46-50]. Essa fosforilação é mediada por proteínas Janus quinase (Jak), ou também por quinases da família SRC [30, 46-50]. Ao serem ativadas, as proteínas STATs se dimerizam, e migram para o núcleo, induzindo alterações na expressão gênica [30, 46-50]. Dentre os membros da família STAT, destacam-se a STAT3 e STAT5, que são vinculados a LMC, por serem ativadas pelas oncoproteína BCR-ABL [30, 46-50]. A STAT3 ao ser ativada constitutivamente inibe a diferenciação celular, enquanto a STAT5 apresenta papel fundamental na proliferação celular e na apoptose de células blásticas, por aumentar a expressão de ciclina

- dl, fundamental no ciclo celular, e também, a expressão dos membros da família das proteínas antiapoptóticas BCL2, MCL-1 e BCLXL [30, 46-50].
- Via de PI3-K: a enzima fosfoinositídeo-3-quinase (PI3-K), composta por uma subunidade regulatória (p85) e uma subunidade catalítica (p210), age fosforilando o grupamento 3'hidroxila do anel inositol [51-57]. A ativação desta proteína por BCR-ABL ocorre pela associação do gene híbrido com o complexo GRB2-GAB2, fosforilando GAB2, ou ainda, a ativação de PI3-K é relacionado ao substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), considerado mediador de ativação de PI3-K após estímulos de insulina, fator de crescimento e citocinas [51-57]. Com isso, ao ativar PI3-K há o aumento da síntese de fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP3) e a diminuição de sua degradação, levando ao acúmulo deste nas células, que promovem a ativação de proteínas efetoras como proteína quinase B (AKT) [51-57]. A via de sinalização PI3-K/AKT resulta na inibição de moléculas envolvidas na sinalização pró-apoptótica, como Bad e a caspase-9, assim como, desencadeia o aumento da expressão de moléculas inibidoras da apoptose [51-57].

### *Apoptose*

A habilidade de expansão da LMC está relacionada ao desequilíbrio na homeostasia tecidual, desencadeado tanto pelo descontrole na proliferação celular quanto pela inibição de apoptose mediada pela oncoproteína BCR-ABL [58-62].

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo organizado e regulado molecularmente, havendo modificações morfológicas características, tais como, a condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, colapso do citoesqueleto, formação de pregas citoplasmáticas e perda de volume com aumento da granulosidade celular [58-62].

A ativação da apoptose pode ser iniciada por meio de duas vias: extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) [58-62]. A via extrínseca é induzida pela ligação de grupos específicos a receptores presentes na membrana, denominados receptores de fator de necrose tumoral [58-62]. Já a via intrínseca é iniciada pela transdução de danos em sinais de estresse para a

via mitocondrial, culminando em alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo-c para o citosol, formando o complexo apoptossomo, juntamente com dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9 [58-62]. Ambas as vias culminam na ativação de uma cascata bioquímica, que envolve a ativação de caspases [58-62]. Essas proteases são responsáveis pela hidrólise de proteínas estruturais e funcionais, levando a alterações morfológicas e bioquímicas que favorecem no reconhecimento e eliminação dessas células pelos fagócitos [58-62].

A apoptose é regulada por diferentes fatores inibidores e ativadores. Entre os inibidores estão presentes proteínas inibidoras da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), e entre as proteínas ativadoras estão o Fas [58-62].

O descontrole no processo apoptótico presente na doença hematológica LMC é justificado pelas proteínas codificadas pelo oncogene BCR-ABL inibirem a ação da caspase-3, prolongarem o período G2/M do ciclo celular, aumentarem a expressão de proteínas antiapoptóticas, como BCL-2 e por inibirem proteínas apoptóticas, havendo comprometimento do sistema Fas e da proteína Bad [58-64].

### 2.1.3. Clínica

A evolução clínica da LMC apresenta três fases distintas, baseadas em características clínicas e laboratoriais denominadas como fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e crise blástica (CB) [65-67].

#### *2.1.3.1. Fase crônica*

Representa a primeira fase dessa patologia, em que o número de células imaturas (blastos) são inferiores a 10% das células sanguíneas [23, 24, 65, 67-71]. Em geral, consiste numa fase assintomática, entretanto, alguns pacientes relatam fadiga, cefaleia, febre e perda de peso, e um achado frequente no exame físico é a esplenomegalia [23, 24, 65, 67-71].

O diagnóstico de LMC é comumente realizado nesta fase, sendo baseado nos achados clínicos, citogenéticos e hematológicos tanto do sangue periférico, quanto da medula óssea [72, 73]. Assim, além do número de blastos inferior a



10%, comumente há basofilia inferior a 20% e a trombocitose, com número de plaquetas superior ou igual a 100.000 plaquetas/ $\mu$ L [72, 73].

A progressão nessa fase é lenta, podendo durar de meses a anos antes de evoluir para a próxima fase, denominada fase acelerada [23, 24, 65, 67-71]. Além disso, o tratamento nessa fase inicial apresenta melhores respostas, podendo prevenir a progressão da doença e prolongar a sobrevivência do paciente [23, 24, 65, 67-71].

### *2.1.3.2. Fase acelerada ou avançada*

Considerada uma etapa de transição gradual para a fase blástica, a fase acelerada dura em média de três a dezoito meses [67, 74, 75]. A progressão da LMC para esta fase é relacionada à instabilidade genética, predispondo a manifestação de outras anormalidades moleculares [75-78]. Com isso, os clones leucêmicos nesta fase apresentam menor resposta aos tratamentos disponíveis devido às mutações no sítio de ligação do ATP de BCR-ABL [67, 74, 75].

Os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a caracterização dessa fase incluem parâmetros hematológicos, morfológicos e citogenéticos. Assim, caracteriza-se pelo número de blastos na medula óssea e no sangue periférico entre 10 e 19% além de quadros de leucocitose, basofilia superior a 20%, anemia, trombocitopenia (<100.000 plaquetas/ $\mu$ L) ou trombocitose (>1.000.000 plaquetas/ $\mu$ L) e a persistência ou aumento da esplenomegalia [3, 72, 73].

### *2.1.3.3. Crise blástica*

A terceira fase é considerada a fase terminal da LMC, denominada de crise blástica. Essa fase é semelhante, clinicamente, à leucemia aguda, uma vez que os clones leucêmicos perdem a capacidade de diferenciação, resultando em um número elevado de células imaturas (blastos >20%) no sangue e na medula óssea [36, 59, 77]. Nesta fase são observadas mutações genéticas secundárias, alterações citogenéticas e deleções de genes supressores de tumor [36, 59, 77]. Dura em média de três a seis meses, sendo que, ao entrar na crise blástica, raramente os pacientes alcançam remissão, evoluindo em muitos casos para o óbito [24, 65].

#### 2.1.4. Diagnóstico

A LMC geralmente é diagnosticada na fase crônica, apresentando sintomas inespecíficos, ou em muitos casos, a patologia é assintomática, sendo somente diagnosticada através de exames de rotina [3, 79]. Diferentes métodos são utilizados para o diagnóstico da LMC, com destaque para o exame microscópico de sangue periférico e medula óssea, exame citogenético e biologia molecular [3, 24, 79].

##### *2.1.4.1. Hemograma e mielograma*

O diagnóstico da LMC pode ser realizado inicialmente através do exame microscópico do sangue periférico, e é considerado fundamental para o cálculo de risco de prognóstico e para a distinção das fases clínicas [4, 80]. Pacientes com LMC apresentam alterações características no hemograma, relacionadas a contagem de células e a observações no esfregaço [36, 74, 81]. Os achados hematológicos específicos incluem leucocitose, com valores superiores a 25.000/ $\mu$ L; granulocitose com desvio à esquerda, destacando a presença de blastos leucêmicos; basofilia e eosinofilia [3, 24, 82, 83]. Ainda, é comum quadros de anemia discreta e comprometimento plaquetário, resultando em trombocitose ou trombocitopenia [3, 83].

O mielograma apresenta hiperplasia, levando a um desequilíbrio na relação de granulocitose-eritropoiese (com relação de 10:1 e 30:1), e predominando células imaturas. Ainda, a medula óssea é marcada por hiperplasia no setor megacariocítico [3, 74, 82-85]. O exame de biópsia de medula óssea demonstra hiperplasia, devido a proliferação elevada de granulócitos e megacariócitos, e há ampliação de fibras de reticulina [74, 83-85].

##### *2.1.4.2. Citogenética*

Considerada um teste confirmatório para a leucemia, a análise citogenética visa avaliar as anormalidades cromossômicas presentes, podendo ser alterações estruturais ou numéricas [86-88]. Além disso, as análises citogenéticas podem ser divididas nas técnicas clássicas, envolvendo cultivo celular, e citomolecular, com o uso de sondas específicas [88, 89].

Na LMC, as células leucêmicas apresentam o cromossomo translocado Ph (t9;22) (q34.1; q11.2) em 90% dos casos [5, 81, 82, 89-91]. Assim, para o diagnóstico de LMC, a metodologia clássica por banda G empregando preferencialmente amostras de aspirado medular, é considerada o exame de escolha para identificar essa anormalidade cromossômica [81, 86, 88, 90, 92]. Para a realização deste ensaio, inicialmente, a amostra é submetida a lavagem com meio específico e a incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, e em seguida é adicionado colchicina para a inibição mitótica. Com isso, é realizada a hipotonização, permitindo a entrada de água nas células por osmose, a separação dos cromossomos e a eliminação de restos citoplasmáticos; e a fixação com ácido acético e metanol, 1:3. Por fim, o material é espalhado em lâmina e corado com corante convencional — Giemsa [88, 92].

Além da detecção do cromossomo Ph clássico, é possível com base na técnica citogenética clássica, o diagnóstico do cromossomo Ph variante, que pode estar relacionado a formas mais agressivas da doença, devido a alterações adicionais em outros genes ou a fenômenos de instabilidade genômica [81, 86, 90, 92, 93].

A metodologia clássica, embora de baixo custo e de grande importância no diagnóstico e na avaliação prognóstica da doença, tem como limitação o tempo de análise, a dependência de amostras de metáfases em boas condições e a preferência por amostras de medula óssea, tornando o método invasivo [5, 86]. Além disso, a ausência do cromossomo Ph favorece a busca da presença do rearranjo BCR/ABL pela técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (Fish) para a confirmação da doença [87].

A técnica de Fish permite a detecção de alterações cromossômicas com base em sondas marcadas com corantes fluorescentes, sendo uma sequência de bases complementares ao alvo [86, 92-94]. Para a LMC, emprega-se principalmente a sonda *Locus Specific Identifier*, que representa uma mistura de sondas, em que o gene BCR apresenta coloração verde, o cromossomo 22 a cor vermelha, e a presença do gene híbrido desencadeia a coloração amarela em microscopia de fluorescência [92, 93].

A avaliação das células neoplásicas através da metodologia de Fish, apesar de permitir a análise de cromossomos em metáfase e intérfase, e a capacidade de detecção de alterações estruturais inviáveis pela citogenética

convencional, consiste em um método com sensibilidade relativamente baixa e oneroso e que tem como requisito fundamental a disponibilidade de sondas específicas para as alterações e um sistema de microscópio de fluorescência com captura de imagem [79, 95].

#### 2.1.4.3. *Molecular*

Entre os métodos moleculares, a reação de polimerase em cadeia (do inglês, *polymerase chain reaction* - PCR) destaca-se pela sensibilidade (detectando uma célula leucêmica a cada 100.000 células normais) e pela capacidade de amplificação do material genético (DNA ou RNA) através de amostras de medula ou sangue periférico. A reação tem como princípio os *primers*, par de oligonucleotídeos considerados iniciadores da reação de amplificação. Estes atuam identificando o local do material a ser amplificado, visto serem complementares a esta fita [79, 96].

A técnica de PCR envolve três etapas, havendo inicialmente a desnaturação, que rompe pontes de hidrogênio através da elevação na temperatura; em seguida há o anelamento, que consiste na ligação dos *primers* à região específica, e por fim, há a polimerização da nova fita de DNA. A reação de transcriptase reversa - PCR (RT-PCR) tem como diferencial uma etapa anterior, que consiste na utilização de RNA como molde, sendo este transcrito para cDNA (DNA complementar) e posteriormente submetido à amplificação. RT-PCR consiste no método de escolha para a caracterização molecular da LMC [97-99].

Uma variante do método PCR é o *nested* PCR, em que a reação envolve dois pares de primers diferentes, sendo que o segundo par reconhece uma porção mais interna, aumentando a sensibilidade e especificidade do método. Além disso, esta técnica permite a identificação das transcrições frequentes e13a2 e e14a2 (que podem influenciar na resposta ao tratamento); além da identificação do transcrito atípico e1a2 [79, 96].

Além da análise qualitativa, avaliando a presença ou não dos transcritos BCR-ABL, o PCR pode ser quantitativo, estimando a concentração de DNA ou o número de sequências transcritas [100]. Dentre as técnicas quantitativas, destaca-se o PCR em tempo real, que tem sido uma ferramenta amplamente

aplicada, possibilitando monitorar ciclo a ciclo, permitindo assim, a análise precisa dos produtos durante a fase exponencial de amplificação [100]. Ainda, é baseada no uso de sondas fluorescentes com sequências específicas, na qual a intensidade do sinal é proporcional a concentração do produto. Existem dois tipos de sistemas principais de fluorescências, o SYBR Green e o Taq Man. Os resultados são expressos pela razão BCR-ABL/ABL. A quantificação dos transcritos deve ser feita a cada três meses [79, 100, 101].

Como apresentado na FIGURA 3, durante o tratamento há o declínio de células tumorais, desencadeando inicialmente a redução no número de leucócitos contados no sangue periférico, alcançando assim a resposta hematológica completa. Em seguida, ocorre a redução na análise da medula por meio de Fish e, por fim, nota-se a diminuição dos transcritos BCR-ABL no sangue periférico e medula óssea, comprovando desta forma a maior sensibilidade deste método. Entretanto, ao alcançar a resposta molecular completa (CMR) o paciente pode apresentar uma carga leucêmica residual, e, conseqüentemente, desencadear o reaparecimento da doença em caso de descontinuação ou ineficácia do tratamento [24, 101].

Essa técnica molecular tem sido utilizada principalmente em casos de fibrose medular ou em situações em que o cariótipo não apresenta alterações compatíveis com a doença, entretanto a suspeita de LMC persiste. Entretanto, o PCR tem como limitação a necessidade de apropriado aparato laboratorial, pessoal técnico treinado, o alto custo e a capacidade de identificar somente sequências já conhecidas para as quais hajam primers disponíveis [100].



FIGURA 3. DECLÍNIO DA RESPOSTA DURANTE O TRATAMENTO

FONTE: Adaptado de Luu (2013) [101]

### 2.1.5. Tratamento

O tratamento da LMC varia de acordo com a fase em que se encontra a doença ao ser diagnosticada [24].

O monitoramento da resposta terapêutica deve ser realizado visando a detecção precoce de ineficácia e alteração terapêutica. De acordo com a *European Leukemia Net* (ELN) e a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), o tratamento e monitoramento do paciente deve ser baseado nas respostas hematológica, citogenética e molecular (TABELA 1) [24, 102, 103]. Ainda, estas metas devem ser contempladas em um período de 3, 6 e 12 meses, conforme orientado pela ELN e a NCCN, como demonstrado na TABELA 2 [24, 101-103].

TABELA 1. RESPOSTA DO MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DE ACORDO COM A ELN/NCCN

RESPOSTA	ELN	NCCN
Hematológica	<u>Completa</u> (CHR): Leucócitos $<10 \times 10^9.L^{-1}$ ; Basófilos $<5\%$ ; Ausência de granulócitos imaturos no sangue periférico; Contagem de plaquetas $< 450 \times 10^9.L^{-1}$ ; Baço não palpável	<u>Completa</u> (CHR): Ausência de blastos ou células imaturas; • Ausência de sinais e sintomas, incluindo aumento do baço
Citogenética	<u>Completa</u> (CCyR): ausência de cromossomo Ph; <u>Parcial</u> (PCR): Ph $\rightarrow$ 1-35%; <u>Menor</u> : Ph $\rightarrow$ 36-65%; <u>Mínima</u> : Ph $\rightarrow$ 66-95%; <u>Nenhuma</u> : Ph $> 95\%$	<u>Completa</u> (CCyR): ausência de cromossomo Ph; <u>Parcial</u> (PCR): Ph $\rightarrow$ 1-35%; <u>Maior</u> (MCyR): Ph $\rightarrow$ 0-35%; <u>Menor</u> : Ph $> 35\%$
Molecular	<u>Completa</u> (CMR): transcritos de BCR/ABL indetectáveis; <u>Maior</u> (MMR): razão BCR-ABL/ABL $\leq 0,1\%$	<u>Início</u> : BCR/ABL $<10\%$ ; <u>Maior</u> (MMR): No mínimo uma redução de 3-log dos níveis de BCR/ABL; <u>Completa</u> (CMR): BCR/ABL indetectáveis

Nota: ELN, *European Leukemia Net*; NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*; FONTE: [24, 103]

TABELA 2. MONITORAMENTO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE ACORDO COM A ELN E NCCN

Tempo	ELN			NCCN
	Ótima (continuar o tratamento)	Intermediário (monitorar atenciosamente)	Falência (mudar o tratamento)	
3 meses	BCR/ABL $<10\%$ e/ou Ph+ $\leq 95\%$		BCR/ABL $>10\%$ e/ou Ph+ $>95\%$	BCR/ABL $\leq 10\%$
6 meses	BCR/ABL $<10\%$ e/ou Ph+ $\leq 35\%$	Ph+ $\rightarrow$ 35-65%	BCR/ABL $>10\%$ e/ou Ph+ $>65\%$	BCR/ABL $\leq 10\%$
12 meses	BCR/ABL $\leq 1\%$ e/ou Ph+ $\rightarrow 0$		BCR/ABL $>1\%$ e/ou Ph+ $\geq 1\%$	BCR/ABL $\leq 1\%$
Após 12 meses	BCR/ABL $\leq 1\%$ e/ou Ph+ $\rightarrow 0$	Perda da resposta molecular maior	Perda de resposta hematológica e citogenética completa, e mutações	BCR/ABL $\leq 0,1\%$

Nota: ELN, *European Leukemia Net*; NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*; FONTE: [24, 103]

#### 2.1.5.1. Inibidores da tirosina quinase (ITK)

Atualmente, os ITK são considerados tratamento de primeira escolha durante a abordagem terapêutica da LMC [104]. A importância dessas terapias

está relacionada ao fato das proteínas com atividade de tirosina quinase, como a BCR-ABL, catalisarem a transferência de adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de tirosina, que ao serem fosforiladas resultam em alterações fenotípicas presentes na doença [33]. Como as proteína quinases necessitam de ATP para a fosforilação, essa classe terapêutica atua impedindo esta etapa, desencadeando a inibição da atividade quinase, e conseqüentemente, a reversão das alterações ou a apoptose dessas células [105].

### *Mesilato de imatinibe*

Aprovada em 2001 pela agência norte-americana U.S. *Food and Drug Administration* (FDA), o mesilato de imatinibe (Gleevec®) representa o tratamento de primeira linha dentre os ITK para LMC tanto a nível internacional quanto nacional [23, 106, 107]. Esse fármaco apresenta como mecanismo de ação o bloqueio competitivo do sítio de ligação do ATP no domínio quinase de BCR-ABL, fazendo com que a porção ABL da tirosina quinase permaneça na sua forma inativa, ou seja, sem ação catalítica [108, 109]. Ainda, o imatinibe tem ação antagonista em outros receptores de tirosina quinase, como o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas/*platelet derived growth factor*) e o SCF (fator da célula tronco/*stem cell factor*). Estes estão associados a excessiva proliferação celular presente em diversas patologias [110].

Na fase crônica da LMC recomenda-se o uso deste fármaco em monoterapia como primeira abordagem, na dose de 400 mg/dia. Além disso, este fármaco é recomendado na fase acelerada (600 mg/dia) e na crise blástica (600mg/dia) [23, 24]. A eficácia do imatinibe é baseada nas respostas hematológica, citogenética e molecular, como demonstrado na TABELA 1 [102]. Apesar da alta percentagem de resposta frente ao tratamento, estima-se que um percentual desses pacientes apresente falha terapêutica. Essa falha pode estar relacionada à falta de adesão terapêutica, favorecendo assim, ao mau prognóstico da LMC [111-115].

Outro fator que contribui para a ineficácia do tratamento é a resistência a este fármaco [108]. A resistência pode ser classificada em primária, quando o paciente não apresenta resposta desde o início do tratamento, ou secundária ou adquirida, em que há perda de resposta [96, 116]. Dentre os mecanismos são



subdivididos em mecanismos independentes de BCR-ABL, e dependentes de BCR-ABL, sendo estes responsáveis pelas resistências primárias e secundárias, respectivamente [96, 116]. Dentre os mecanismos independentes de BCR-ABL há o aumento da proteína  $\alpha$ 1-glicoproteína, proteína de fase aguda presente em processos patológicos como inflamação crônica e cânceres. Este interage com fármacos neutros e básicos, como o imatinibe, comprometendo as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas deste [117, 118]. Além disso, podem ocorrer alterações nos mecanismos de transporte do fármaco, relacionados ao aumento da expressão da P-glicoproteína, codificada pelo gene MDR1 (*Multidrug Resistance 1*), ou ainda, pelo aumento da proteína BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), codificada pelo gene ABCG2 (*ATP-binding cassette transporter G2*). Estas proteínas atuam aumentando o efluxo do fármaco, resultando em concentrações sub-terapêuticas em nível celular [116, 119].

Com relação aos mecanismos dependentes de BCR-ABL, destacam-se as mutações pontuais no domínio da tirosina quinase BCR-ABL que representam o principal mecanismo de resistência secundária [120, 121]. Tais mutações podem ser subdivididas entre as que se situam no sítio de ligação ao ATP, alterações no domínio catalítico, as do *loop* de ativação, impedindo a mudança conformacional da quinase, e as que não permitem a ligação direta do medicamento [107, 122]. Outro mecanismo é a amplificação do gene BCR-ABL. Esta amplificação desencadeia o aumento da proteína codificada por este gene, assim, há um aumento do alvo terapêutico sendo necessário o aumento da dose terapêutica do imatinibe [122, 123].

### *Dasatinibe*

Considerado fármaco de segunda geração, o dasatinibe (Sprycel®) foi aprovado pela FDA em 2006 para o tratamento de LMC [124] e é considerado tratamento de segunda linha no Brasil de acordo com o PCDT de LMC [23]. Possui propriedade inibitória sobre as famílias quinases SRC e ABL, apresentando ação tanto nas formas inativas quanto ativas do ABL [5, 107, 125, 126]. Além disso, é ativo contra c-kit, PDGF e EPHA2 [124].

De acordo com a NCCN, o dasatinibe pode ser usado como opção de tratamento de primeira escolha na fase crônica e acelerada, na dose de 100

mg/dia e 140 mg/dia, respectivamente [24, 125]. Além disso, pode ser utilizado em casos de leucemia linfoblástica aguda Ph positivo [126].

Comparado ao imatinibe, apresenta-se 325 vezes mais potente do que este, sendo orientado seu uso principalmente para pacientes que apresentam resistência a outros tratamentos [107, 124, 125, 127, 128]. A atividade do dasatinibe frente a diversas mutações deve-se a este fármaco não interagir com alguns resíduos do ABL envolvidos com as mutações [124]. Entretanto, ele é ineficaz no tratamento de pacientes com resistência adquirida pela mutação T315I, em que há a troca do aminoácido treonina (ACT) pela isoleucina (ATT) [5, 124, 126, 128].

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que dasatinibe apresenta ação inibitória sobre Stat5 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*). Este é ativado pela atividade tirosina-quinase de BCR-ABL e desempenha um papel importante sobre a expressão de genes vinculados a proliferação celular na LMC. Deste modo, a inibição de Stat5 é acompanhada da inibição da proliferação celular e indução de apoptose [125, 129, 130].

### *Nilotinibe*

O nilotinibe (Tasygna®) é um derivado da fenilaminopirimidina que demonstra ser 30 vezes mais potente que o imatinibe por apresentar maior seletividade e afinidade a quinase ABL [107, 119, 126, 131, 132]. Ele foi aprovado pela FDA em 2007, sendo recomendado como opção de primeira escolha na fase crônica e acelerada de acordo com os protocolos internacionais, nas doses de 300 mg/dia e 400 mg/dia, respectivamente [24, 106, 107]. Contudo de acordo com o PCDT da LMC no Brasil, o nilotinibe deve ser utilizado como tratamento de segunda linha, sendo empregado em casos de falha terapêutica ou intolerância ao mesilato de imatinibe, após escolonamento de dose [23].

Nilotinibe interage com Glu286 e Asp381 formando uma molécula AMN107, que é um inibidor ATP competitivo da ativação da proteína tirosina quinase BCR-ABL prevenindo a ativação das vias mitogênica e antipoptótica dependentes do BCR-ABL [126, 133].

Apresenta atividade contra quinase ABL, c-Kit e PDGF, todavia, não demonstra ação significativa sobre a família SRC [119, 132, 134]. Ainda,

apresenta-se efetivo contra diversas formas mutantes de BCR-ABL, exceto a T315I [131, 134, 135]. Essa efetividade frente a mutações e o maior potencial comparado ao imatinibe está relacionada ao fato de nilotinibe fazer menos ligações de hidrogênio com a quinase, do que imatinibe [116, 133].

### *Bosutinibe*

O bosutinibe (Bosulif®) consiste em um composto 4 anilino-3-quinolino-carbonitrila que foi aprovado em 2012 pelo FDA, sendo um fármaco de segunda geração recomendado pela NCCN como tratamento de segunda escolha para a fase acelerada, na dose de 500 mg/dia [24, 107, 126].

O bosutinibe é um potente agente antiproliferativo e pró-apoptótico, sendo 200 vezes mais eficiente e potente que o imatinibe, e apresentando ação em casos de resistência adquirida ao imatinibe, com exceção da mutação T315I [24, 107, 126]. Atua sobre as quinases da família ABL e SRC, apresentando com isso, ação frente a outras neoplasias associadas as quinases da família SRC [136, 137]. Além disso, demonstra maior especificidade que o imatinibe e o dasatinibe, por não inibir significativamente a atividade das quinase c-kit e PDGF, desta forma, há redução dos efeitos colaterais comparado aos fármacos menos específicos [5, 116, 136, 137].

### *Ponatinibe*

Ponatinibe (Iclusig®) é um representante de ITK de terceira geração aprovado em 2012 pelo FDA para pacientes com LMC em fase acelerada e leucemia linfoblástica aguda cromosso Philadelphia positivo [24, 138].

Este fármaco é um potente inibidor BCR-ABL que em sua estrutura inclui uma ligação tripla carbono-carbono, permitindo a ligação com alta afinidade ao domínio quinase ABL, independentemente da existência da mutação T315I, visto que a tripla ligação evita o impedimento estérico provocado pela presença da isoleucina na posição 315 [139, 140].

Além disso, o ponatinibe inibe outras quinases, incluindo FLT3 (do inglês, *Fms-related tyrosine kinase 3*), c-Kit, Ret (do inglês, *Rearranged during transfection*) e membros das famílias FGFR (do inglês, *fibroblast growth factor receptor 1*), PDGF (do inglês, *platelet-derived growth factor receptor*), SRC e

VEGFR-2/KDR (do inglês, *vascular endothelial growth factor receptor-2/kinase insert domain receptor*). Entretanto não inibe membros da família Aurora quinase [56, 139, 141, 142].

### *Radotinibe*

O radotinibe (Supect®) é um inibidor oral do BCR-ABL1 de alta afinidade, com forte semelhança estrutural com o imatinibe e especialmente com o nilotinibe. Tem ação efetiva frente a algumas mutações como V299L, F311I, F317L, M315T, V299L, F317L, com exceção do T315I. Atualmente é aprovado somente pela agência reguladora coreana como tratamento de primeira linha quanto de segunda linha da LMC [143].

### *2.1.5.2. Imunomodulador*

#### *Interferon alfa (IFN- $\alpha$ )*

O Interferon alfa não é recomendado como tratamento inicial para LMC, entretanto é considerado uma opção em casos de pacientes que apresentam intolerância aos efeitos colaterais dos ITK [144, 145].

A dose orientada é de 5.000.000 UI/m<sup>2</sup>/dia, via subcutânea, contínuo. Podem ser usadas doses menores visando a aumentar a tolerância sem prejudicar a eficácia do tratamento. A dose máxima diária é de 9.000.000 UI/dia [23, 146].

O uso isolado ou associado do IFN- $\alpha$  a um tratamento de quimioterapia pode culminar em resposta citogenética completa de 5 a 15% e taxa de sobrevida em 5 anos dos 50-59% dos grupos tratados, comparado com 29-44% dos pacientes que recebem busulfan e hidroxiureia [23, 145, 147].

IFN- $\alpha$  atua modulando a expressão gênica de aproximadamente 300 genes, por ligar a receptores (IFNAR-1 e IFNAR-2) que conduzem a ativação das JAKs (Janus quinases) [148]. Estas tirosina-quinases citoplasmáticas ao serem ativadas fosforilam e ativam as STATs (transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição/ *signal transducers and activators of transcription*), as quais migram para o núcleo, onde estimulam a transcrição de genes-alvos específicos [147-149]. Assim, o IFN- $\alpha$  influencia na diferenciação celular e apoptose, por

apresentar ação sobre genes responsáveis pela codificação de proteínas apoptóticas, como TRAIL, FAS, caspase-4, caspase-8 e XAF-1 proteínas antivirais, como PKR, 2050A oligoadenilato sintetase, proteínas Mx [149]. Ainda, age sobre genes relacionados a proteínas que regulam o ciclo celular como pRb (proteína do retinoblastoma), cdc25A (do inglês, *cell division cycle 25 homolog A*), ciclinas D3, E, A e ciclinas dependentes de quinase (cdk4, cdk6) e também IFN- $\alpha$  inibe diretamente o crescimento celular e a proliferação por desencadear a supressão na produção de citocina estimulatórias como GM-CSF (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) IL-1b (interleucina-1b), e a estimulação da síntese de citocinas inibitórias como IL-1 [145, 147-150]

Outra ação do IFN- $\alpha$  é o efeito imunomodulador relacionado a ação sobre genes vinculados a proteínas imunomoduladoras (por exemplo, MHC I e II, LMP-2, o inibidor de C1), proteínas de defesa do hospedeiro (por exemplo, PKR, 1-9 IRF, IL-15, IL-6), e fatores de transcrição (por exemplo, STAT1, STAT2, ISGF3 - g, IRF1-7) [149, 151]. Além disso, modula a ativação de células imunológicas do hospedeiro incluindo linfócitos B e T, células NK (do inglês, *natural killer*) e células apresentadoras de antígeno - células dendríticas [144, 151, 152].

Destacam-se como efeitos colaterais agudos a anorexia, febre, mialgia e dores de cabeça, e como efeitos crônicos a fadiga, perda de peso, mialgia, artralgia, depressão e complicações imunológicas como anemia hemolítica, trombocitopenia, hipotireoidismo [145]. Sintomas característicos de toxicidade são quadros de neutropenia ou úlceras orais persistentes [23, 147].

### 2.1.5.3. Quimioterapia

Os quimioterápicos afetam o funcionamento celular tanto de células neoplásicas como normais. Esta é recomendada em casos de pacientes que não respondam adequadamente aos ITK [24].

#### *Hidroxiureia*

Hidroxiureia consiste em um tratamento quimioterápico indicado para diversos tipos de câncer e doenças sanguíneas [153]. Atualmente, só é empregada no tratamento de LMC visando a citorredução inicial ou palição. Seu mecanismo de ação está vinculado ao controle de proliferação celular por inibir

a ribonucleotídio redutase e, conseqüentemente, levar a apoptose celular através do estresse celular e da ativação da via intrínseca [59], isso porque não produz resposta citogenética ou molecular [23, 154].

Pode ser usada para controle hematológico em todas as fases. A dose inicial recomendada é de 2g/dia por via oral, com exceção de paciente com contagem de leucócitos elevada, em que a dose inicial é de 3-4 g/dia. A dose de manutenção deve ser corrigida de acordo com a contagem leucocitária, entretanto, deve ser interrompido o tratamento quando o número de leucócitos e plaquetas são inferiores a 2.500/mm<sup>3</sup> e 100.000/mm<sup>3</sup>, respectivamente [23].

Sintomas gastrointestinais e dermatológicos são os principais eventos adversos relacionados a este tratamento [155].

### *Omacetaxina*

Administrado por injeção subcutânea, mepesuccinato de omacetaxina foi isolada da planta *Cephalotaxus harringtonia* e aprovado em 2012 pelo FDA para o tratamento de pacientes adultos em fase crônica ou acelerada com resistência ou intolerância a dois ou mais ITK [156-158]. Entende-se por resistência quando o paciente não responde mais ao tratamento, e por intolerância quando há a necessidade de romper o tratamento pela severidade dos efeitos colaterais [24]. Estudos evidenciam que a omacetaxina é ativa contra mutações de ITK, como T315I, pois não interage com domínios quinases de BCR-ABL [157, 159].

Este quimioterápico impede a síntese de proteína, por inibir a fase de alongamento da tradução ao bloquear a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A na subunidade ribossomal 60-S [156, 159]. O efeito antileucêmico da omacetaxina é principalmente associado a indução de apoptose em células leucêmicas pela ativação de proteínas apoptóticas, como caspase-9, caspase-8 e caspase-3, e pela liberação de citocromo c, diminuindo o potencial da membrana mitocondrial [157, 158].

Os principais efeitos colaterais relacionados ao uso deste tratamento são hematológicos que seria a granulocitopenia e trombocitopenia. Como efeitos não hematológicos destacam-se diarreia, fadiga, febre, náusea, dores de cabeça, anorexia, hiperglicemia e taquicardia [157].

#### 2.1.5.4. Transplante de células hematopoiéticas (TCTH)

O transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas representa o único tratamento curativo para LMC, não sendo indicado o transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas [23, 160].

Somente um terço dos pacientes com LMC são aptos para este procedimento, associado a limitação do número de doadores [161]. Recomenda-se a realização da tipagem HLA (do inglês, *human leukocyte antigen*) dos pacientes para a procura de possíveis doadores, podendo ser doadores aparentados (familiares) ou doadores do registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea (Redome) [162].

Antes do TCTH, o receptor passa por regime de condicionamento denominado mieloablativo, em que são administradas altas doses de agentes citotóxicos para a destruição completa das células malignas e normais da medula óssea do receptor. Em seguida, é realizada a infusão de células-tronco hematopoiéticas provenientes do doador, sendo substituídas as células destruídas por células novas [24, 162].

Para o transplante devem ser levados em consideração o tipo de doador, estágio da patologia, idade do receptor, combinação de sexo entre o receptor e o doador e o intervalo entre o diagnóstico da doença e o transplante. Assim, quando há doador HLA compatível, a chance de sobrevida por mais 5 anos após o TCTH no estágio inicial da doença (fase crônica) é próxima de 70%, enquanto na fase blástica a chance de sobrevida de 3 a 5 anos é de 10 a 20%. O risco no transplante é reduzido no casos em que a idade do receptor é menor de 40 anos e o receptor e doador são do mesmo sexo [161, 163].

O transplante é recomendado principalmente em casos de falha terapêutica dos ITK e nos casos de LMC em fases avançadas. Entretanto, neste último caso, antes do TCTH é orientado o uso de ITK para retornar a fase crônica, para então realizar o transplante [160, 163].

Após o transplante pode ocorrer recidiva clínica, que consiste no reaparecimento de manifestações hematológicas, ou recidiva citogenética, neste caso há o reaparecimento de metáfases na medula óssea ou no sangue periférico que contém o cromossomo Ph [163].

## 2.2. Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência, comumente relatada em estudos oncológicos, é um conjunto de abordagens estatísticas aplicada em estudos longitudinais (estudo de coorte ou ensaio clínicos randomizados) que visam investigar os fatores associados ao tempo (variável dependente) desde um ponto de partida estabelecido até a ocorrência de um evento de interesse binário, como o sucesso ou falha de um tratamento, ou morte ou recuperação de uma doença) [164-167]. Este evento de interesse pode ser único (ex: sobrevida global) ou recorrente (ex: sobrevida livre de recidiva) [168].

A análise de sobrevivência difere-se da análise estatística “clássica”, uma vez que na estatística “clássica” a variável dependente é a ocorrência ou não de determinado evento e por também não permitir a análise na presença de dados censurados (dados onde o desfecho não foi observado até o final do tempo de seguimento), sendo portanto inadequado para estudos longitudinais com tempo de seguimento diferente entre os indivíduos e perdas de *follow-up* [168-170].

Os resultados de um estudo de análise de sobrevida, permitem embasar o planejamento da conduta terapêutica na prática clínica [166, 171, 172]. E desta forma, permite estimar as funções de sobrevivência e a função de risco instantâneo (função de incidência ou função *Hazard*), além da comparação entre diferentes grupos e a avaliação da relação entre as variáveis preditoras e o tempo de sobrevivência [165-167, 169]

### 2.2.1. Kaplan-Meier

Os dados de sobrevivência são geralmente descritos e modelados em termos de duas funções relacionadas: a função de sobrevivência  $S(t)$  e a função de risco instantâneo. A primeira é a probabilidade de não ocorrência do evento de interesse dentro do tempo de seguimento, enquanto a segunda é o potencial de ocorrer um evento por vez, dada a sobrevivência até aquele momento. A probabilidade de sobrevivência pode ser estabelecida de forma não paramétrica, através dos tempos de sobrevivência observados, tanto censurados quanto não-censurados, usando o método Kaplan-Meier (KM). Neste, os intervalos de tempos são definidos conforme o aparecimento do evento [168, 173, 174].



Para a análise estatística, pode ser utilizado os seguintes testes: teste de log-rank – que é o método mais usado para comparar duas ou mais curvas de sobrevivência, teste Breslow – que permite a comparação estatística no início da curva de KM e o Tarone-Ware – que compara no final das curvas do *follow-up*. Todos estes testes consideram como hipótese nula ( $H_0$ ) que não há diferença entre as curvas de sobrevivência [168, 173-175]

### 2.2.2. Regressão de COX

Quando o objetivo é a associação do tempo de sobrevivência com fatores prognósticos, o modelo comumente utilizado é a regressão de Cox, que se baseia em uma abordagem semi-paramétrica, uma vez que o efeito dos preditores sobre a taxa de risco é parametricamente especificado, enquanto o risco de linha de base função não é especificada [172].

O modelo de Cox é a análise multivariada de regressão que descreve a relação entre a incidência do evento, expressa pela função de risco e um conjunto de covariáveis (variáveis independentes). Dentre os modelos de regressão, há o modelo de COX tempo risco-proporcional e a de COX tempo-dependente, sendo que a escolha entre estes é com base na alteração ou não da variável durante o tempo de seguimento, e se o evento de interesse é ou não recorrente ou se há variáveis competitivas [164, 172, 173, 176, 177].

Ainda a medida do efeito, não ajustada ou ajustada para covariáveis, é demonstrada como uma razão de risco (HR, do inglês, *Hazard Ratio*), que é expressa como um expoente de um coeficiente de regressão no modelo [164, 172, 173, 176, 177]. Um valor de HR maior que um, indica que a covariável está diretamente relacionada à probabilidade do evento, e portanto, é inversamente associado ao tempo de sobrevivência [164].

## **2.3. Revisão Sistemática**

Saúde baseada em evidências baseia-se na integração das melhores evidências da literatura, com experiência clínica e valores do paciente. Assim, para a saúde baseada em evidências é fundamental que as tomadas de decisões sejam embasadas em informações atualizadas e completas das evidências

atualmente disponíveis. Desta forma, destacam-se as revisões sistemáticas que são consideradas como padrão-ouro como fonte de evidência [178-181].

A revisão sistemática consiste em um estudo retrospectivo secundário, em que é realizada uma revisão planejada sobre certo tema, reunindo estudos primários. A RS sintetiza os resultados destes estudos primários, usando estratégias que reduzem vieses e são caracterizados por serem explícitas e reproduzíveis. Ainda, os resultados podem coincidir ou podem ser conflitante, possibilitando demonstrar lacunas de conhecimento que há ainda na literatura, de forma a orientar pesquisas futuras [178, 179, 181, 182].

Diferem-se das revisões narrativas, por estas revisões narrativas serem principalmente descritiva, discutindo de forma abrangente um assunto, por incluir estudos com base na disponibilidade ou seleção de autores (não incluem toda a literatura relevante do tema) e por não abordarem a qualidade dos estudos [183, 184].

A Colaboração Cochrane é uma organização sem fins lucrativos, formada por profissionais de saúde que orienta como a revisão sistemática pode ser efetuada. As etapas básicas na realização de uma revisão sistemática são as seguintes: o primeiro estágio é a definição da questão norteadora da revisão, sendo esta etapa crítica e fundamental para as etapas seguintes. Sua formulação pode ser realizada com o auxílio do acrônimo PICOS (P=pacientes, I=intervenção, C=comparador, O=*outcome* ou desfechos e S=desenho de estudo) (1). Com base nisso, é estabelecido os critérios de inclusão e os critérios de exclusão (2). Assim, visando a responder à pergunta norteadora, uma estratégia de busca é criteriosamente desenvolvida, para minimizar erros que podem comprometer os resultados, e as buscas são realizadas em bases de dados (3). Após a recuperação dos estudos, de acordo com os critérios de elegibilidade, é realizado a etapa de triagem (leitura título e resumo) e leitura na íntegra dos estudos (4), para então ser realizado a avaliação da qualidade dos estudos (5) e a extração dos dados de interesse (6). Todas essas etapas são feitas por pelo menos dois revisores, garantindo a confiabilidade e evitando erros. Por fim, é feito a apresentação e síntese dos resultados, podendo ser descritiva, ou numérica através das meta-análises (7) [178, 179, 182, 185, 186].

Com relação a meta-análise, esta é a análise estatística que combina os dados dos estudos primários independentes para produzir uma estimativa única

como o efeito do tratamento ou fator de risco. É uma análise quantitativa, que permitir reduzir a quantidade de dados em um único resultado resumido, facilitando a compreensão dos resultados. Além disso, permite verificar a consistência das relações, explicando a inconsistência dos dados e quantificando os dados. Isso ajuda a melhorar a precisão na estimativa do risco usando métodos explícitos [180, 185].

## **2.4. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas**

Para os métodos quantitativos comumente é utilizadas técnicas instrumentais, em que são usados equipamentos sofisticados como a espectroscopia e a cromatografia.

### 2.4.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas se tornou uma ferramenta analítica indispensável, amplamente utilizada tanto para a quantificação quanto para a identificação de compostos. Esta técnica é usada para mensurar a razão massa-carga de íons ( $m/z$ ), sendo que seus resultados são apresentados através de um espectro de massa (gráfico de intensidade em função da  $m/z$ ) [187, 188].

Um espectrômetro de massas é subdividido em quatro principais componentes: a fonte de ionização, o analisador, o detector e o sistema de aquisição de dados [189].

#### *2.4.1.1. Fonte de ionização*

São componentes que visam a formar íons a partir de moléculas presentes na amostra. As fontes de ionização mais brandas e compatíveis com amostras líquidas são a Ionização por Electrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), que podem levar a formação de moléculas carregadas positivamente ( $[M+H]^+$  – massa molecular mais um hidrogênio ou algum aduto) ou negativamente ( $[M-H]^-$  – massa molecular menos um hidrogênio ou outros adutos) [190-192].

#### 2.4.1.2. Analisadores de massa e detectores

Após a formação dos íons, há a determinação da relação massa carga ( $m/z$ ) [193]. Dentre os analisadores, destaca-se o quadrupolo-tempo de voo (QTOF). O QTOF é um analisador híbrido que combina a alta eficiência de fragmentação do quadrupolo (Q) com a rápida velocidade de análise e alta resolução de massa do tempo de voo (TOF). Este analisador destaca-se quando comparado ao triplo quadrupolo (QqQ), por permitir a identificação de compostos com alta resolução (erro de massa < 5ppm), permitindo diferenciar até quatro casas decimais após a vírgula, e por corrigir saturações de picos. Além disso, há estudos na literatura demonstrando ser uma técnica adequada para o desenvolvimento de métodos quantitativos [194-196].

Na etapa seguinte, os compostos serão detectados através dos detectores, sendo que estes são definidos conforme a compatibilidade com o analisador. Assim, o prato microcanal (MCP, do inglês *microchannel plate detector*) é o detector compatível com o analisador QTOF [192].

#### 2.4.2. Cromatografia líquida

Apesar da possibilidade de injeção direta da amostra no espectrômetro de massas, para matrizes complexas comumente é utilizado para a introdução da amostra a técnica cromatográfica. Essa combinação permite relacionar as vantagens da cromatografia (eficiência de separação, redução de efeito matriz, separação de isômeros, alta seletividade e o fornecimento de informações adicionais), com as vantagens da espectrometria de massas, (informação da massa molar e da estrutura dos compostos e aumento da seletividade) [188].

A cromatografia líquida é uma das técnicas mais amplamente utilizadas atualmente, que permite a separação de interesse através da migração diferencial realizada conforme as interações que ocorrem com a fase móvel e a fase estacionária [197].

Visando a melhorar a sensibilidade, resolução e velocidade de análise, surgiu a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês ). Esta possui instrumentação que pode operar em pressão mais alta e usa partículas menores (menos de 2,0  $\mu\text{m}$ ), que possibilitam a redução do consumo

de solvente e de tempo, além da melhora na simetria do pico, maior resolução e detectabilidade [198-201].

## **2.5. Método bioanalítico**

Os métodos bioanalíticos podem ser qualitativos, em que o objetivo é identificar os compostos presentes na amostra, ou podem ser quantitativos, que visa a determinar a concentração analítica de compostos de interesse presentes na amostra.

As etapas para a obtenção de um método bioanalítico, consistem em: obtenção e preparo da amostra (1), desenvolvimento analítico (2) e validação de método (3).

### 2.5.1. Preparação da amostra

Amostras biológicas como soro e plasma são consideradas matrizes relevantes e amplamente utilizadas em estudos de diagnóstico, saúde e monitoramento de medicamentos [202-206]. Contudo, estas não são diretamente compatíveis aos sistemas cromatográficos, portanto o preparo das amostras é uma etapa crucial para remover interferências da matriz da amostra e melhorar o desempenho do sistema analítico [207, 208]. O preparo ideal é quando o procedimento realizado é reprodutível, requer poucas etapas e tempo gasto, e é seletivo, havendo mínima perda e degradação dos compostos de interesse [203, 209, 210].

Para adequar as amostras ao método analítico, convencionalmente é realizado um processo de extração, destacando-se a extração líquido-líquido (LL), a extração em fase sólida (EFS) e a extração por precipitação de proteínas (PP) [207, 208].

A extração LL é uma técnica clássica e simples, com altas taxas de recuperação. Fundamenta-se no particionamento da amostra entre duas fases imiscíveis. Desta forma, permite a separação de compostos de interesse e a remoção de interferentes, assim como, possibilita a pré-concentração da amostra, através da extração dos analitos de um grande volume de solução de

amostra para um pequeno volume de extrator. Contudo, limita-se pelo consumo elevado de solventes, e por requerer solventes de alta pureza [211]

Já a extração em fase sólida é o comumente utilizando nos ensaios bioanalíticos, apresentando amplo campo de aplicação. Baseia-se na adsorção dos compostos de interesse entre uma fase líquida (com a amostra) e uma estacionária. Apesar da EFS obter alta recuperação e minimizar o uso de solventes orgânicos, apresenta como desvantagem o custo elevado de análise, a dificuldade no controle da velocidade de eluição da amostra e a complexidade no desenvolvimento do método [212, 213].

Já a técnica de precipitação de proteínas (PP) é rápida, simples, de baixo custo e amplamente utilizada em amostras biológicas, contudo, limita-se pela baixa sensibilidade quando comparado a demais técnicas [214, 215].

#### 2.5.2. Desenvolvimento analítico por *Analytical Quality by Design*

Para o desenvolvimento analítico, pode ser utilizado as seguintes abordagens: tradicional e a ferramenta de *Analytical Quality by Design* (AQbD). Na primeira abordagem, uma variável é alterada sequencialmente até que um método adequado seja alcançado, porém, pode haver uma limitação na compreensão e na robustez do método. Já o AQbD, de acordo com a definição da *International Conference on Harmonization* (ICH) Q8 (R1) é uma abordagem sistemática e abrangente, que é baseada em risco para o desenvolvimento do método. Nessa abordagem, começa com objetivos predefinidos e simultaneamente muitas variáveis são selecionadas, fornecendo uma compreensão mais racional, um método mais robusto e resultados mais confiáveis do procedimento [216-221]. A AQbD envolve as seguintes etapas:

1. **Definição do perfil de alvo analítico (ATP):** inclui a seleção de requisitos essenciais do método, incluindo os analitos alvo, aspectos da técnica analítica e os requisitos do método [216-223]
2. **Atributos críticos de qualidade (CQA):** inclui atributos de método e parâmetros de método. Como exemplo de CQA no desenvolvimento cromatográfico temos a cauda do pico, resolução e pureza de pico [216-223]

3. **Avaliação de risco:** etapa essencial do processo de gerenciamento de riscos, visa a aumentar a qualidade do processo de desenvolvimento analítico. Nesta fase, são observados os atributos críticos que podem perturbar a qualidade do produto final, comprometendo o CQA [216-223]
4. **Planejamento experimental ou *Design of experiments (DoE)*:** consiste em um método estruturado para avaliar a relação entre os fatores e os resultados desse processo. Ainda, possibilita avaliar vários fatores de entrada com um número reduzido experimentos. Os experimentos podem ser de triagem, como os experimentos fatoriais completos e os experimentos fatoriais fracionados, ou de otimização como o projeto de Box-Behnken e o projeto de composição central [216-223]
5. **Delineamento espacial ou *Design Space*:** é uma interação multidimensional de fatores e parâmetros de processo que garantem a qualidade do resultado analítico. O *design of space* fornece flexibilidade em uma zona de robustez, em que pequenas alterações no método não comprometem os resultados [216-223]
6. ***Analytical control strategy*:** garante que o desempenho atende aos pré-requisitos do ATP [219, 220]
7. **Monitoramento contínuo do método:** visando a assegurar que o método está de acordo com os critérios pré-definidor, o desempenho do método deve ser monitorado [219, 220].

### 2.5.3. Validação de método bioanalítico

A validação do método bioanalítico é realizado para garantir que um método é adequado para a finalidade pretendida. Essa confiabilidade é obtida a partir de experimentos de validação e da obtenção de resultados satisfatórios [224].

Os parâmetros avaliados na etapa de validação de métodos bioanalíticos, apresentados pela resolução nacional RDC nº 27/ 2012 da ANVISA e pelo guia internacional de ensaios bioanalíticos da FDA de 2018 [225, 226], são:

- **Seletividade:** primeiro parâmetro testado na validação, avalia a capacidade do método de medir e diferenciar o analito na presença de componentes que podem estar presentes na matriz;

- **Limite inferior de quantificação:** é a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com precisão e exatidão satisfatória;
- **Curva de calibração:** capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito na amostra dentro do intervalo da curva. Este intervalo deve abranger, concentrações que se esperam serem medidas nas amostras do estudo;
- **Precisão:** medida dos erros aleatórios. Avalia a proximidade dos resultados obtidos a partir de múltiplas mensurações da amostra;
- **Exatidão:** está relacionado a concordância entre o resultado obtido de uma medição com o valor considerado como referência;
- **Recuperação:** avalia a eficiência do processo de extração, sendo reportada como porcentagem;
- **Efeito matriz:** é o efeito que outros compostos presentes na matriz podem gerar sobre a quantificação do composto de interesse;
- **Efeito residual ou carryover:** é o efeito desencadeado pela existência de um sinal de analito na amostra branco devido a contaminação de análises anteriores;
- **Estabilidade:** visa a detectar se há instabilidade dos analitos durante alguma etapa analítica, desta forma, são realizados experimentos que visam a reproduzir as condições que as amostras são submetidas.



# CAPÍTULO 1. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, SOBREVIVÊNCIA E FATORES DE RISCO DA LMC

### 3. INTRODUÇÃO

O tratamento da LMC evoluiu significativamente nos últimos anos com o desenvolvimento e aprovação dos ITK, fornecendo alternativas eficazes e seguras para os pacientes [227, 228]. Contudo, o tratamento otimizado está sujeito a fatores prognósticos como a sobrevida global (SG) ou a sobrevida livre de doença, que são úteis para prever a história natural da doença. Estudos anteriores demonstraram que idade, contagem de plaquetas, porcentagem de blastos no sangue, contagem de basófilos e eosinófilos e o cromossomo Ph são alguns dos fatores prognósticos em pacientes em tratamento com LMC com terapia convencional [229-232]. No entanto, os pacientes diagnosticados com câncer geralmente desenvolvem uma segunda malignidade subsequente que pode ser síncrona (*i.e.* os cânceres ocorrem ao mesmo tempo) ou metacrônica (*i.e.* os cânceres seguem em sequência; ou seja, com mais de seis meses de diferença). Logo o impacto do momento da doença metastática e outras comorbidades também afeta o tratamento e os resultados clínicos da LMC [233].

Nesse contexto, a abordagem multivariada da análise de dados pode ser usada como um aspecto da pesquisa epidemiológica. Métodos como o modelo de regressão Cox covariável dependente do tempo permitem diferenciar várias covariáveis (incluindo covariáveis de mudança do tempo) que potencialmente influenciam o prognóstico do paciente [234, 235]. Assim, considerando os múltiplos fatores que podem alterar o tempo de sobrevida dos pacientes com LMC, bem como a literatura vasta e conflitante sobre a relação entre neoplasias primárias e secundárias na LMC [236-242], este estudo tem como objetivo avaliar o prognóstico e os fatores de risco associados à LMC por meio de uma análise de dados do *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) da *National Cancer Institute*.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar a sobrevida global da população acometida pela LMC e identificar cânceres que podem ser fatores de risco para causar a LMC, ou vice-versa.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Realizar análise descritiva da população acometida pela LMC;
- Estimar o tempo de sobrevida por meio da análise por Kaplan-Meier;
- Investigar os fatores prognósticos da LMC, pelo modelo de regressão de Cox covariável tempo-dependente;
- Determinar quais cânceres podem ser fatores de risco para a LMC;
- Avaliar para quais cânceres a LMC pode ser considerado fator de risco.

## **5.MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Desenho do estudo, fonte de dados e amostras**

Foi realizado um estudo observacional retrospectivo do tipo coorte. Os dados dos pacientes identificados para este estudo foram extraídos do banco de dados norte-americano SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), através do programa SEER\*Stat 8.3.5. Esta base coleta dados epidemiológicos de câncer de vários locais e origens dos Estados Unidos da América (EUA). A coleta de dados começou em 1973 com um número limitado de registros e continua a expandir para incluir ainda mais áreas e dados demográficos. Atualmente o SEER contempla 21 regiões dos EUA, representando 34,6% da população americana.

Contudo, para este estudo foi usada a base “Incidence - SEER 18 Regs Custom Data (with additional treatment fields), Nov 2018 Sub (1975-2016 varying), Linked to Country Attributes – Total U.S. 1969-2017 Countries”, pois esta fornece informações adicionais sobre o tratamento dos pacientes. Portanto, foram coletadas informações entre 1975 e 2017 (42 anos de *follow up* - acompanhamento), fornecidas por 18 regiões dos EUA: Alasca, Connecticut, Detroit, Atlanta, grande Georgia, rural Georgia, São Francisco – Oakland, São Jose – Monterey, grande California, Havaí, Iowa, Kentucky, Los Angeles, Louisiana, Novo México, Nova Jersey, Seattle, Puget Sound e Utah.

Somente foram incluídos no estudo pacientes diagnosticados com LMC. As variáveis independentes consideradas para o estudo foram: dados basais (sexo, raça, etnia), dados de diagnóstico (teste para confirmação do diagnóstico, ano do diagnóstico, idade quando diagnosticado) e dados da doença (número de registro do câncer para o paciente). A variável dependente do estudo foi o desfecho óbito (estado vital).

### **5.2. Análise descritiva**

Todos os dados dos pacientes com LMC, obtidos pelo programa SEER\*Star 8.3.5. foram importados para o Excel® e as variáveis foram codificadas em dados numéricos para a transferência destes para o software

IBM® *Statistical Package for the Social Sciences*®, SPSS® Statistics 20.0 (Chicago, Illinois, EUA).

No SPSS foi feita a análise descritiva das principais variáveis do estudo. Para as variáveis contínuas, inicialmente foi avaliada a normalidade das distribuições através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram descritas como média e desvio-padrão, enquanto aquelas que apresentaram distribuição não normal foram descritas como mediana e intervalo interquartil (25%-75%). Já para as variáveis categóricas calculou-se as frequências absoluta e relativa.

### **5.3. Análise de sobrevida por Kaplan-Meier e regressão de Cox covariável Tempo dependente**

Para estimar o tempo de sobrevida para cada desfecho de interesse, na presença de dados censurados, foi usado o método não paramétrico de Kaplan-Meier. Este método possibilita estimar a função de sobrevivência na presença de censura, incorporando os dados de todas as observações disponíveis para estimar a função de sobrevivência  $S(t)$  [243].

Para essas análises foi usado a variável da base SEER denominada “*SEER cause-specific death classification*”. Esta variável é recomendada pela própria base de dados para correlacionar aos dados de sobrevida, e subdivide os pacientes em: (i) mortes causadas por esta doença, (ii) vivos e mortos por outras causas. Logo, nestas análises, o desfecho de óbito foi somente vinculado a LMC. Portanto, foram censurados pacientes com registro de LMC que permaneceram vivos até o período de *follow-up* (censura à direita) e aqueles que morreram por outras causas que não pela LMC ou suas complicações (censura à esquerda).

As curvas de Kaplan-Meier foram comparadas entre si por meio do teste de log rank, Breslow e Tarone-Wave (uma vez que estes representam diferentes porções da curva de Kaplan-Meier), considerando como significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Já a análise multivariada de fatores prognósticos associados a sobrevida global foi realizada através da regressão de Cox tempo dependente. Para isso

foi considerado como variável dependente o tempo até a morte por LMC e as variáveis independentes foram: sexo, raça do paciente, origem, faixa etária, tratamento com quimioterapia, ano de diagnóstico (dividido em dois grupos, ou seja, antes de 2001 (ano em que foi aprovado o primeiro ITK - imatinibe) - era pré-ITK (e após 2001 - era pós-ITK), testes de confirmação diagnóstica e número de sequência do câncer. *Hazard Ratio (HR)* e o seu intervalo de confiança (IC 95%) foram mensurados para explicar o tamanho dos efeitos na análise de Cox tempo dependente. Todas as análises de sobrevida foram conduzidas através do software IBM® SPSS statistics (versão 20.0), e nível de significância  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

#### **5.4. Avaliação de fatores de risco**

Nesta etapa foi conduzido um estudo de caso-controle. Para avaliar a LMC como fator de risco para outras doenças foram considerados como “casos” os pacientes que apresentaram LMC como doença primária (de base), e que desenvolveram alguma outra malignidade ou doença secundária (grupo teste: LMC-1<sup>st</sup>). Já para o grupo “controle”, foram considerados pacientes que tiveram algum tipo de doença primária (não-LMC) seguido por outro câncer secundário (grupo controle: nLMC-1<sup>st</sup>).

Já para avaliar quais doenças podem se comportar como fator de risco para LMC, foram considerados como “casos” os pacientes que apresentaram LMC como doença secundária após algum outro câncer como doença primária (grupo teste: LMC -2<sup>nd</sup>). Já para o grupo “controle”, foram considerados pacientes que tiveram qualquer tipo de câncer primário seguido por outro câncer secundário não-LMC (grupo controle: nLMC-2<sup>nd</sup>).

A partir dos dados obtidos, o risco relativo (RR) foi calculado com base na relação entre o grupo teste (LMC-1<sup>st</sup> e LMC -2<sup>nd</sup>) e o grupo controle (nLMC-1<sup>st</sup> e nLMC -2<sup>nd</sup>). O valor de  $p$  e o intervalo de confiança (IC) foram calculados através do software BioEstat 5.3. Sendo considerado significativo RR superiores a 1 e com valor de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Análise descritiva

Após a busca na base de dados SEER, foram encontrados 35.860 registros de LMC entre 1975 e 2017. Dentre estes pacientes, 20.735 (57,82%) eram do sexo masculino, enquanto 29.501 (82,26%) eram caucasianos. Outros estudos, entretanto, demonstraram que homens são mais acometidos do que mulheres por esta patologia [244-246].

A mediana de idade da população geral foi 65 anos (IQR: 49-77 anos). Os indivíduos foram ainda subdivididos pela faixa etária, conforme demonstrado na Figura 1, havendo mais acometidos na faixa etária de 50-79. Essa mediana de idade e a faixa etária mais acometida estão de acordo com os resultados encontrados em estudos da Lituânia, Itália, Alemanha e da Inglaterra [246-249].

Com relação ao estado vital dos 35.860 acometidos com a LMC, 21.929 (61,2%) foram a óbito no intervalo de *follow-up* de 42 anos, sendo que destes 12.023 (33,5%) faleceram devido a este câncer. A TABELA 3 apresenta a descrição das características sociodemográficas (sexo, cor, faixa etária, etnia), testes usados para confirmação do diagnóstico, além do estado vital.

TABELA 3. CARACTERÍSTICAS BASAIS DOS PACIENTES COM LMC  
(N=35.860)

Variáveis	Pacientes com LMC, n (%)
<b>Gênero</b>	Feminino 20.735 (57,8)
	Masculino 15.125 (42,2)
<b>Raça</b>	Branco 29.501 (82,26)
	Negro 3.492 (9,9)
	Outros 2.428 (6,8)
<b>Hispânico ou não</b>	Hispânico 3.676 (10,3)
	Não hispânico 32.184 (89,7)
<b>Faixa etária</b>	0-19 anos 841 (2,3)
	20-39 anos 4.398 (12,3)
	40-59 anos 9.203 (25,7)
	60-79 anos 14.514 (40,5)
	>80 anos 6.899 (19,2)
<b>Estado vital</b>	Morte atribuída a LMC 12.023 (33,4)
	Outras causas de morte 9.906 (27,5)
	Vivos 13.931 (38,7)

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; FONTE: O autor (2020)

Com relação ao tratamento observa-se que 22.842 (63,7%) receberam quimioterapia. Dentre os pacientes que apresentaram LMC, Ao todo, 27.672 pacientes (77,2%) apresentaram somente LMC como câncer registrado (única malignidade). Já 2.560 pacientes tiveram a LMC como tumor primário e apresentaram outros cânceres posteriores a LMC, enquanto 5.627 pacientes apresentaram a LMC como segunda doença ou posterior a um outro tumor primário. Os dados do tratamento e a ordem do tumor são apresentados na TABELA 4.

Ainda 23.948 (66,8%) pacientes tiveram o diagnóstico da LMC na era ITK enquanto 11.912 (33,2%) foram diagnosticados na era pré-ITK. Na FIGURA 4, nota-se que pacientes que foram diagnosticados antes de 2001 (1975-2000) apresentavam maior suscetibilidade ao óbito, comprovando a importância da incorporação dos ITK no tratamento da LMC, assim como, da melhora do diagnóstico da LMC nos últimos anos.

TABELA 4. DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM LMC (n=35.860)

Variáveis	Classificação	Pacientes com LMC n (%)
Teste de confirmação de diagnóstico	Diagnóstico clínico	679 (2,0)
	Após estudo histológico e imonufenotipagem e/ou genético	3.065 (8,8)
	Citologia positiva e histologia negativa	439 (1,3)
	Histologia positiva	29.607 (85,2)
	Teste laboratorial positivo / estudo de marcadores	818 (2,4)
	Microscopia positiva, método não especificado	112 (0,3)
	Radiografia sem confirmação por microscopia	16 (0,05)
Ano de diagnóstico	Era Pré-ITK (antes de 2001)	11.912 (33,2)
	Era ITK (depois de 2001)	23.948 (66,8)
Quimioterapia	Sim	22.842 (63,7)
	Não	13.018 (36,3)
Primeiro tumor de acordo com as regras internacionais	Sim	35.446 (98,8)
	Não	414 (1,2)
Número da sequência	Só um primário	27.672 (77,2)
	1° de 2 ou mais	2.560 (7,1)
	2° de 2 ou mais	4.738 (13,2)
	3° de 3 ou mais	744 (2,1)
	4° de 4 ou mais	121 (0,3)
	5° de 5 ou mais	16 (<0,1)
	6° de 6 ou mais	8 (<0,1)

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; ITK, inibidor de tirosina quinase; FONTE: O autor (2020)



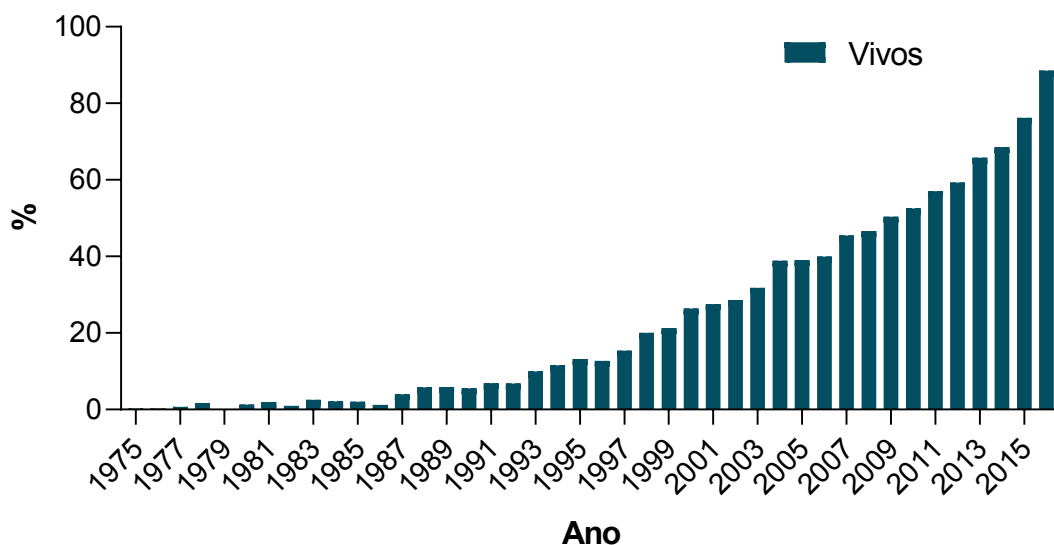


FIGURA 4. CORRELAÇÃO DO ANO DE DIAGNÓSTICO E ESTADO VITAL  
 FONTE: O autor (2020)

## 6.2. Análise de sobrevida

### 6.2.1. Considerações gerais

Da base de dados do SEER, dos 35.860 pacientes que tiveram LMC, 12.023 pacientes (33,4%) vieram a óbito devido a esta patologia. Dos demais 23.837 pacientes (grupo censurado), 9.906 morreram devido a outras causas (censura à esquerda), enquanto 13.931 permaneceram vivos até o final do *follow up* - 2017 (censura à direita).

### 6.2.2. Estimação de tempo de sobrevida: análise de Kaplan-Meier

Inicialmente o método de Kaplan-Meier foi usado para estimar a SG, que consiste do tempo decorrido entre o diagnóstico e o óbito (pela doença), e a sobrevida livre de eventos, que representa o tempo entre o diagnóstico e a ausência de remissão, recaída ou morte (pela doença ou por outras causas), sendo que no nosso estudo foram considerados somente os dados de óbito. O tempo médio de SG foi de 220,95 meses (IC 95%, 220,71- 233,20 meses) (FIGURA 5) enquanto o EFS foi de 120,80 meses (IC 95%, 117,28-124,33 meses) (FIGURA 6).

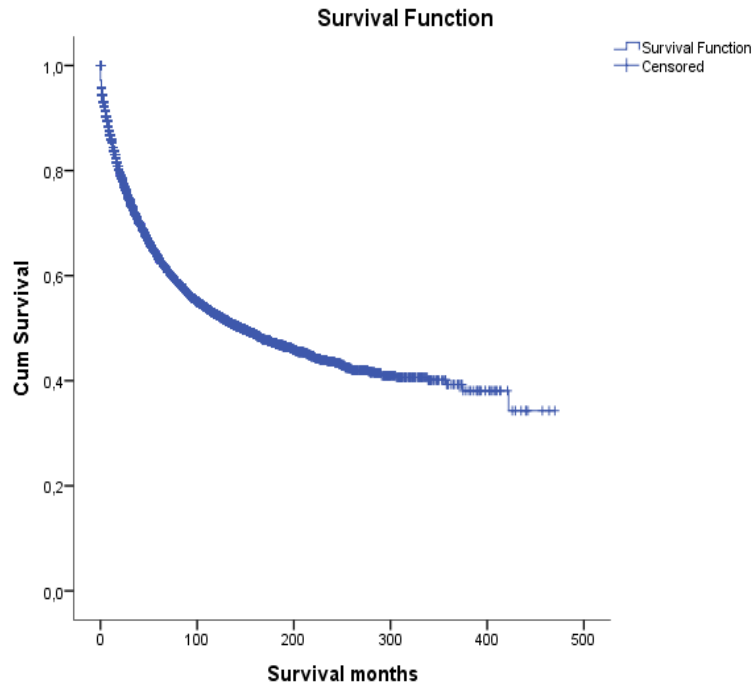


FIGURA 5. SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM LMC EM MESES  
 FONTE: O autor (2020)

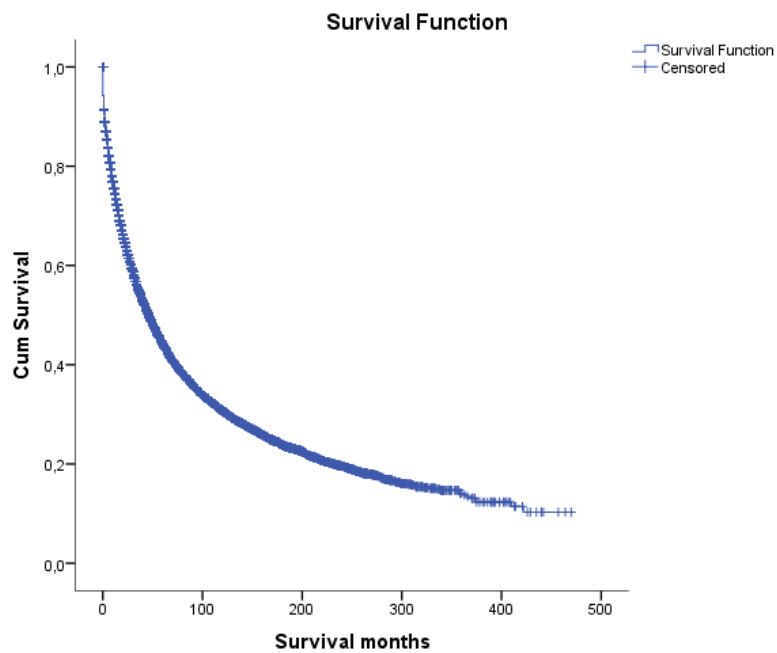


FIGURA 6. SOBREVIDA LIVRE DE EVENTOS DOS PACIENTES COM LMC  
 EM MESES  
 FONTE: O autor (2020)

A seguir são apresentados os detalhes da SG de acordo com **sexo**, **quimioterapia**, raça, origem, ano de diagnóstico, faixa etária, número de registro de câncer, teste de diagnóstico (TABELA 5), assim como é demonstrado o gráfico de Kaplan Mayer de comparação entre as curvas (FIGURA 7).

Nota-se que todas as variáveis independentes testadas (sexo, o uso ou não da quimioterapia, raça, origem (hispanico ou não), primeiro tumor maligno, primeiro pelas regras internacionais, faixa etária e confirmação de diagnóstico) apresentaram diferença significativa no início (Log Rank,  $p < 0,01$ ); meio (Tarone,  $p < 0,01$ ) e no fim do *follow up* (Breslow,  $p < 0,01$ ) (TABELA 5 e FIGURA 7).

TABELA 5. DADOS DE SOBREVIDA POR KAPLAN-MEIER PARA AS VARIÁVEIS BASAIS

Parâmetro	Classificação	N	Meses de sobrevivência	Erro padrão	IC 95%	Valor de p Log Rank	Valor de p Breslow	Valor de p Tarone-Ware
Sexo	Feminino	14.926	125,678	2,776	120,237-131,120	21,574 (p<0,01)	19,186 (p<0,01)	22,126 (p<0,01)
	Masculino	20.518	116,241	2,132	112,063-120,419			
	Geral	35.444	120,809	1,797	117,287-124,332			
Quimioterapia	Sim	22.842	150,565	2,589	145,490-155,639	2424, 099 (p<0,01)	2744,306 (p<0,01)	2654,937 (p<0,01)
	Não	12.602	69,853	1,565	66,786-72,920			
	Geral	35.444	120,809	1,797	117,287-124,332			
Raça	Branco	3.468	112,225	4,135	104,121-120,329	142,904 (p<0,01)	131,503 (p<0,01)	141,722 (p<0,01)
	Negros	29.125	115,880	1,871	112,212-119,547			
	Outros	2.414	155,432	7,245	141,231-169,632			
	Geral	35.007	119,133	1,779	115,647-122,619			
Origem	Hispanico	31.804	116,036	1,802	112,504-119,567	293,996 (p<0,01)	278,839 (p<0,01)	298,917 (p<0,01)
	Não-hispanico	3.640	156,102	7,202	141,985-170,219			
	Geral	35.444	120,809	1,797	117,287-124,332			
Ano do diagnóstico	Após 2001	23.703	137,92	0,64	136,67-139,17	2926,050 (p<0,01)	1997,961 (p<0,01)	2479,322 (p<0,01)
	Antes 2001	11.741	142,53	2,56	137,58-147,48			
	Geral	35.444	226,95	3,19	220,71-233,20			
Faixa etária	0-19 anos	840	262,977	11,810	239,829-286,126	10525,324 (p<0,01)	8720,514 (p<0,01)	9594,207 (p<0,01)
	20-39 anos	4.390	242,639	5,428	232,000-253,279			
	40-59 anos	9.178	180,170	3,686	172,945-187,396			
	60-79 anos	14.367	64,203	0,958	62,326-66,079			
	>80 anos	6.664	23,135	0,412	22,327-23,942			
	Geral	35.439	120,808	1,797	117,286-124,331			

Nota: IC, intervalo de confiança; FONTE: O autor (2020)

**CONCLUSÃO:** TABELA 5. DADOS DE SOBREVIDA POR KAPLAN-MEIER PARA AS VARIÁVEIS BASAIS

Parâmetro	Classificação	N	Meses de sobrevivência	Erro padrão	IC 95%	Valor de p Log Rank	Valor de p Breslow	Valor de p Tarone-Ware
Número de registro do câncer	Só um primário	27.294	204,95	3,18	198,725-211,18			
	1° de 2 ou mais	2.557	256,28	8,93	238,776-273,77	1966,90	1846,52	1960,45
	2° de 6 ou mais	5.592	397,24	0,34	396,579-397,90	(p<0,01)	(p<0,01)	(p<0,01)
	Geral	35.443	226,95	3,19	220,70-233,19			
Confirmação de diagnóstico	Diagnóstico clínico	679	112,147	7,946	96,574-127,720			
	Após estudo histológico e imonufenotipagem e/ou genético	3.065	73,372	0,557	72,279-74,464			
	Citologia positiva e histologia negativa	439	169,416	8,759	152,249-186,583			
	Histologia positiva	29.565	223,320	3,182	217,083-229,558			
	Teste laboratorial positivo / estudo de marcadores	818	161,289	6,796	147,969-174,610	326,688 (p<0,01)	317,022 (p<0,01)	324,688 (p<0,01)
	Microscopia positiva, método não especificado	112	105,650	11,371	83,362-127,938			
	Radiografia sem confirmação por microscopia	16	67,077	20,668	26,568-107,586			
	Geral	34.694	227,503	3,211	221,210-233,797			

Nota: IC, intervalo de confiança; FONTE: O autor (2020)

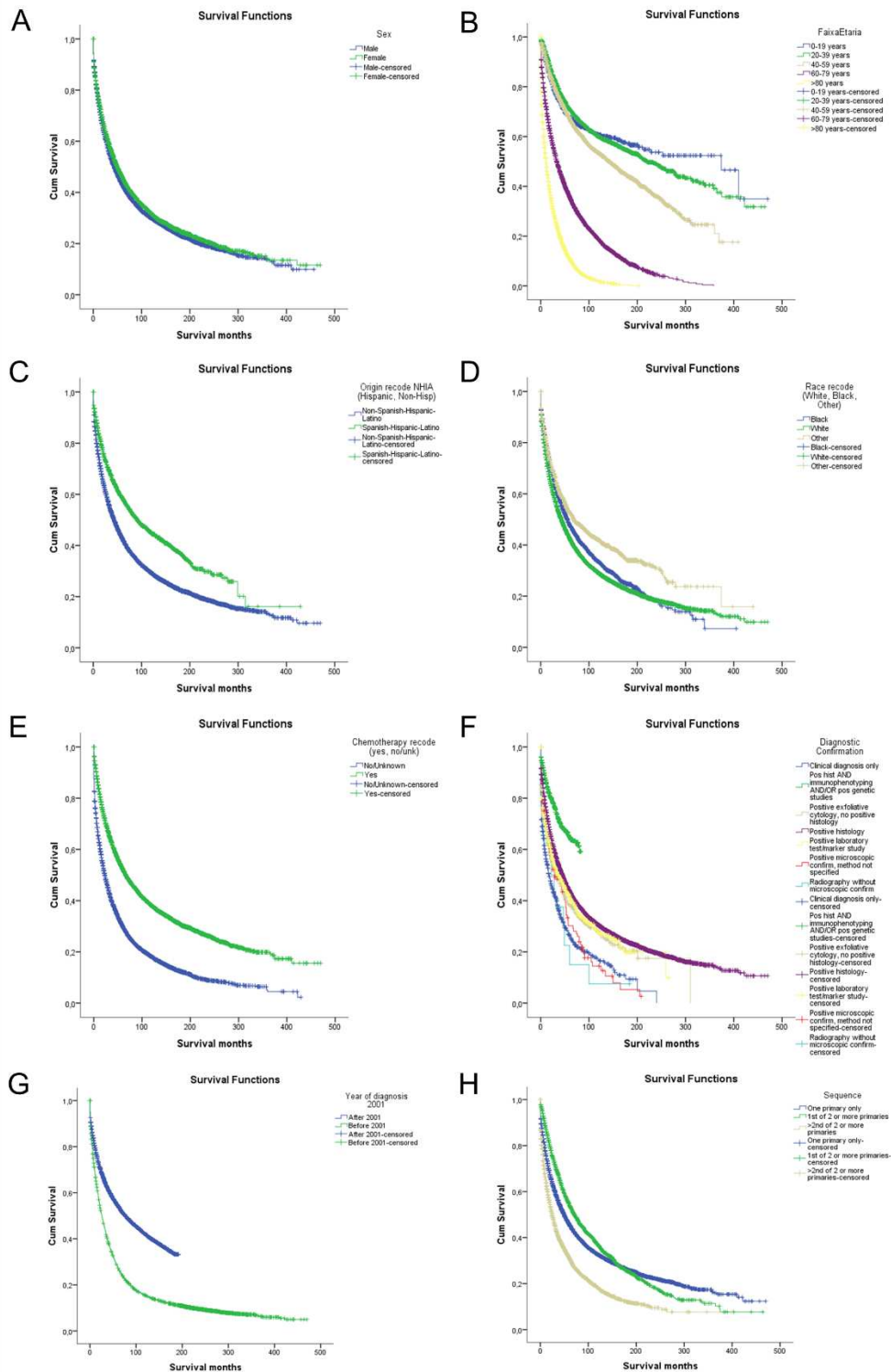


FIGURA 7. ANÁLISE DE SOBREVIDA POR KAPLAN-MEIER PARA AS VARIÁVEIS BASAIS (A) SEXO, (B) FAIXA ETÁRIA, (C) ORIGEM, (D) RAÇA, (E) QUIMIOTERAPIA, (F) TESTE DE DIAGNÓSTICO, (G) ANO DO DIANÓSTICO, (H) NÚMERO DE REGISTRO DO CÂNCER  
 FONTE: O autor (2020)

### 6.2.3. Investigação dos fatores prognósticos: análise de regressão de Cox covariável tempo-dependente

Uma vez que a análise de sobrevivência muda ao longo do tempo, como observado nos gráficos de Kaplan-Meier (FIGURA 7), foi realizada a análise de COX tempo dependente. Para a construção do modelo de regressão dois critérios são levados em consideração: o critério hierárquico e o critério matemático. No critério hierárquico, a seleção das variáveis que compõem o modelo é baseada no conhecimento *a priori* do pesquisador sobre quais delas são potencialmente relevantes para o modelo. Neste caso, são incluídas no modelo as variáveis que se mostraram importantes em outros estudos anteriores. Já no critério matemático (*forward* e *backward*), a seleção das variáveis importantes para o modelo de regressão de Cox, é realizada automaticamente pelo próprio software (SPSS). Em nosso estudo, para a construção do modelo de regressão de Cox covariável tempo-dependente foi utilizado o modelo matemático do tipo *Forward stepwise (LR-Likelihood Ratio)*. O modelo foi composto por sete passos e incluiu, no final, as seguintes variáveis: sexo, faixa etária, raça, quimioterapia, teste de diagnóstico usado para a confirmação, ano de diagnóstico (antes ou depois de 2001) e sequência de tumores. A variável tempo dependente usada para construir o modelo foi a faixa etária (TABELA 6).

TABELA 6. RESULTADO ANÁLISE DE COX-TEMPO-DEPENDENTE

Variáveis	Classificação	N	B	Erro padrão	Wald	Valor de p	HR	IC 95%
Faixa etária	0-19 anos	827	—	—	3008,160	—	—	—
	20-39 anos	4.267	-0,103	0,071	2,099	0,147	0,902	0,785-1,037
	40-59 anos	8.852	0,140	0,068	4,244	0,039	1,151	1,007-1,315
	60-79 anos	13.911	0,893	0,067	177,473	<0,001	2,443	2,142-2,786
	>80 anos	6.410	1,559	0,069	505,279	<0,001	4,754	4,150-5,446
Sexo	Feminino	14.389	—	—	—	—	—	—
	Masculino	19.880	0,167	0,019	76,079	<0,001	1,182	1,138-1,227
Quimioterapia	Sim	22.345	—	—	—	—	—	—
	Não/desconhecido	11.964	0,134	0,020	43,251	<0,001	1,143	1,098-1,189
Raça	Branco	28.482	—	—	36,330	—	—	—
	Negro	3.415	0,179	0,31	33,113	<0,001	1,196	1,125-1,272
	Outros	2.372	-0,045	0,39	1,341	0,247	0,956	0,886-1,032
Origem	Hispanico	3.520	—	—	—	—	—	—
	Não hispanico	30.747	0,025	0,034	0,520	0,471	1,025	0,958-1,097
Confirmação de diagnóstico	Após estudo histológico e imonufenotipagem e/ou genético	3.011	—	—	75,671	—	—	—
	Diagnóstico clínico	675	0,565	0,093	37,153	<0,001	1,759	1,467-2,110
	Citologia positiva e histologia negativa	434	0,577	0,100	33,219	<0,001	1,780	1,463-2,166
	Histologia positiva	29.210	0,479	0,062	59,405	<0,001	1,615	1,429-1,824
	Teste laboratorial positivo / estudo de marcadores	812	0,498	0,092	29,421	<0,001	1,646	1,375-1,971
	Microscopia positiva, método não especificado	112	0,126	0,172	0,536	0,464	1,134	0,810-1,589
	Radiografia sem confirmação por microscopia	15	1,409	0,359	15,430	<0,001	4,094	2,026-8,271
Sequência e quantidade de tumores	Só um primário	26.232	—	—	455,145	—	—	—
	1° de 2 ou mais	2.527	-0,650	0,038	285,843	<0,001	0,522	1,166-1,449
	2° de 6 ou mais	5.510	-5,866	0,447	172,055	<0,001	0,003	0,001-0,007
Ano do diagnóstico	Depois de 2001	22.797	—	—	—	—	—	—
	Antes de 2001	11.470	0,866	0,019	1984,705	<0,001	2,378	2,289-2,470

Nota: HR, *Hazard Ratio*; IC, intervalo de confiança; em azul os valores de p significativos; FONTE: O autor (2020)



Conforme demonstrado pela TABELA 6, as variáveis sexo, faixa etária, raça, quimioterapia, teste de confirmação de diagnóstico e sequência e quantidade de tumores e o ano de diagnóstico apresentaram um valor prognóstico significativo para a SG.

Os resultados evidenciaram que as mulheres têm melhor prognóstico de do que os homens. Este achado para a LMC está em concordância com achados de outros estudos. Alguns autores abordam que esta diferença está atrelada a influência do status hormonal no percurso da doença neoplásica. Outros acreditam que fatores genéticos e ambientais podem influenciar nesses resultados [238].

Já o uso da quimioterapia mostrou ser um fator prognóstico promissor no ganho de SG quando comparado a pacientes que não foram submetidos a essa terapia, possivelmente associado ao uso dos ITK que tem desencadeado melhoras significativas no percurso da doença, de modo que alguns pacientes alcancem a resposta molecular completa (MR 3,0) ou ainda a resposta molecular profunda (DMR, do inglês, *deep molecular response*) (MR 4,5) [250].

O sucesso da terapia para a LMC depende muito do diagnóstico, seja nos estágios iniciais da doença ou através do tratamento. Manifestações clínicas deste câncer geralmente são inespecíficas e muitos pacientes diagnosticados com LMC são assintomáticos. Em um caso de leucocitose persistente, o diagnóstico consiste em investigar a presença do cromossomo Ph por citogenética ou anormalidades moleculares do BCR-ABL1 por hibridização fluorescente in situ (Fish); ou por triagem de biologia molecular. A triagem molecular por PCR fornece dados sobre a porcentagem de transcritos de RNA BCR-ABL e é capaz de detectar uma célula anormal em um fundo de 100.000 células normais, mostrando-se uma técnica muito mais sensível. Este consegue detectar transcritos de RNA BCR-ABL mesmo após alcançar resposta CCyR. Os baixos níveis de doença residual mínima normalmente alcançados durante a terapia exigem um teste de monitoramento sensível para detecção e quantificação confiáveis [79].

### **6.3. Avaliação de fator de risco**

A FIGURA 8 apresenta um fluxograma do desenho da análise de fator de risco, descrevendo as frequências de câncer registrados na base do SEER. Foram encontrados 35.860 casos de LMC, dos quais o grupo LMC-1<sup>st</sup> foi composto por 2.560 indivíduos, enquanto o seu grupo controle (nLMC-1<sup>st</sup>) continha 996.859 registros. Já o grupo LMC-2<sup>nd</sup> foi composto por 5.627 registros sendo que o seu grupo controle (nLMC-2<sup>nd</sup>) continha 997.283 registros.

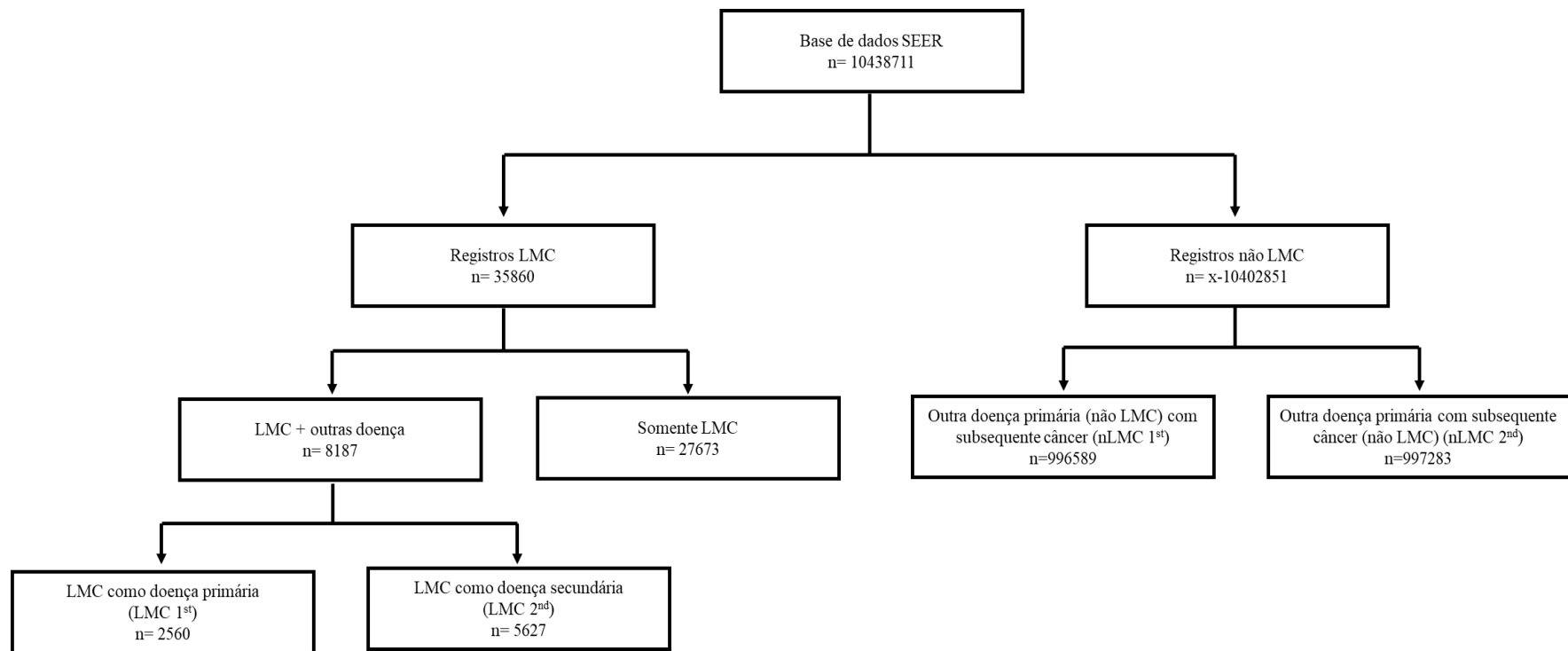


FIGURA 8. FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE RISCO

FONTE: O autor (2020)

### 6.3.1. LMC como fator de risco para outros cânceres

A TABELA 7 aborda para quais cânceres a LMC pode ser considerada um fator de risco. Em geral, é possível notar a associação entre a LMC e outras doenças hematológicas. Dentre estas, destacam-se os riscos relativos obtidos para a leucemia linfóide aguda (LLA) (RR 42,95) e a leucemia mieloide aguda (LMA) (RR 11,30). Essa correlação com a LLA e a LMA deve-se a própria evolução da LMC, em que após a fase crônica e a acelerada, a doença atinge a fase blástica, predominando células imaturas na medula óssea e no sangue. Em aproximadamente 25% dos pacientes, esse estágio se manifesta como se fosse LLA, enquanto nos 75% restantes se manifesta como LMA [251, 252].

A presença da translocação BCR-ABL junto com o aumento de alterações cromossômicas na evolução da LMC (principalmente na fase acelerada e blástica) favorece o desenvolvimento de tumores sólidos e hematológicos, devido à instabilidade genética resultante da ação descontrolada da tirosina quinase BCR-ABL [253, 254]. Isso porque o gene BCR-ABL compromete as vias de reparo do DNA e induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) que culminam em danos oxidativos crônicos ao DNA, quebra da fita dupla nas fases S e G2 do ciclo celular e mutagênese [16, 255].

Muitos estudos no período pré-ITK demonstram um aumento de risco para neoplasias secundárias a LMC em comparação com a população geral [256, 257]. Assim como, na era ITK vários estudos investigaram o risco de segunda malignidade primária na LMC [256-269]. Visando facilitar a comparação com esses dados da literatura os dados foram apresentados na TABELA 8.

TABELA 7. NÚMERO DE CASOS SUBSEQUENTES DE CÂNCER APÓS A LMC E NÃO LMC

Câncer antecessor	Total			Diagnosticados antes de 2001			Diagnosticados na era ITK (>2001)			
	LMC-1 <sup>st</sup> (n=2.335)	LMC-1 <sup>st</sup> (n=997.283)	RR	IC 95%	LMC-1 <sup>st</sup> (n=677)	RR	IC 95%	LMC-1 <sup>st</sup> (n=1.658)	RR	IC 95%
Lábio	12 (0,51)	2.069 (0,21)	2,48**	1,41-4,37	7 (1,03)	4,16**	1,95-8,84	5 (0,30)	2,01	0,84-4,81
Língua	24 (1,03)	7.221 (0,72)	1,42*	0,96-2,12	16 (2,36)	3,36**	1,99-5,65	8 (0,48)	0,70	0,34-1,42
Boca	20 (0,86)	4.548 (0,46)	1,88**	1,22-2,92	13 (1,92)	3,77**	2,12-6,67	7 (0,42)	1,11	0,52-2,35
Colo do útero	12 (0,51)	3.062 (0,31)	1,68*	0,95-2,95	6 (0,89)	2,96**	1,32-6,62	6 (0,36)	1,32	0,59-2,96
Próstata	284 (12,16)	75.687(7,59)	1,60*	1,44-1,79	99 (14,62)	1,64**	1,29-2,08	185 (11,16)	1,55**	1,29-1,86
Olho e órbita	8 (0,34)	1.598 (0,16)	2,14*	1,07-4,29	3 (0,44)	3,22	1,08-9,54	5 (0,30)	2,05	0,85-4,91
NHL-Extranodal	39 (1,67)	12.650(1,27)	1,32*	0,97-1,80	12 (1,77)	1,49	0,82-2,69	27 (1,63)	1,27	0,84-1,91
LLA	98 (4,21)	977 (0,10)	42,95**	35,04-53,65	24 (3,55)	41,10**	26,43-63,84	74 (4,46)	1,09	0,69-1,71
LLC	47 (2,02)	9.165 (0,92)	2,20**	1,65-2,92	10 (1,48)	1,62	0,85-3,09	37 (2,23)	2,49**	1,73-3,55
LMA	279(11,98)	10.571(1,06)	11,30**	10,11-12,64	4 (0,59)	0,81	0,31-2,12	275 (16,59)	11,57**	9,86-13,56
Outra leucemia mieloide	37 (1,58)	444 (0,04)	35,63**	24,68-51,01	4 (0,59)	14,24**	5,41-37,38	15 (0,90)	45,85**	31,13-67,47
Leucemia monocítica aguda	15 (0,64)	530 (0,05)	12,12**	7,27-20,21	0	0,00	-	33 (1,99)	17,79**	10,35-30,53
Outra leucemia aguda	37 (1,59)	444 (0,04)	4,53**	2,26-9,08	1 (0,15)	2,07	0,40-10,66	8 (0,48)	3,49**	1,81-7,50

Nota: RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; LLA, Leucemia linfóide aguda; LLC, Leucemia linfóide crônica; LMA, Leucemia mieloide aguda. \* indica valor de  $p < 0,05$ , \*\*indica valor de  $p < 0,01$ ; FONTE: O autor (2020)

TABELA 8. CÂNCERES SECUNDÁRIOS A LMC RELATADOS NA LITERATURA

Autor	Local	Período	n	Achados
Curtis [258]	Base de dados SEER – EUA	Era pré-ITK (1973-2000)	1281	Cânceres da cavidade oral e pulmão, cólon, linfoma não-Hodgkin e LLA
Duman, Paydas [259]	Não reportado	Era ITK	8	Adenocarcinoma de próstata (n=3), de cólon (n=1), carcinoma na bexiga urinária (n=1), de células escamosas (n=1), Tumor adenomatóide testicular (n=1), Linfoma difuso de grandes células B (n=1)
Frederiksen, Farkas [256]	Registro nacional da Dinamarca	Era pré-ITK (1977-2008)	1026	CA hematológicos (RR 5,2, IC 95% 2,8-8,7), CA não-hematológicos (RR 1,6, IC 95% 1,3-2,0)
Gambacorti-Passerini, Antolini [260].	Estudo multicêntrico	Era ITK (1999-2004)	30	Próstata 10 (1,2%), Mama (n=3, 0,4%), Cólon 3 (0,3%), Pulmão 2 (0,2%), Renal 2 (0,2%), Pele, célula escamosa 2 (0,2%), glândula adrenal, trato biliar, bexiga, glândula salivar, sistema nervoso central, linfoma Não Hodgkin, outra Leucemia e endométrio (cada um com n=1, 0,1%)
Gugliotta, Castagnetti [261]	Itália - (GIMEMA)	Era ITK	30	Mais comum: câncer de cólon, próstata, tireoide, mama, sistema nervoso central, pâncreas, fígado, e linfomas não Hodgkin
Gunnarsson, Stenke [262]	Registro nacional Sueco	Era ITK (>2002)	65	Câncer de próstata (26,9%), ginecológico (7,7%), de mama (7,7%), tumores gastrointestinais (25%)
Kumar, Garg [263]	Base de dados SEER – EUA	Era ITK (2000-2014)	511	Gengiva (RR 3,7; p=0,002), LLC (RR 3,4; p< 0,001), jejuno (RR 3,1; p=0,004), estômago (RR 2,1; p=0,005), tireoide (RR 2,2; p< 0,001), melanoma (RR 1,5; p=0,024), pulmão (RR 1,4; p=0,006), próstata (RR 1,3; p=0,026)
Miranda, Lauseker [264]	ECR CML IV- Alemanha	Era ITK (2002-2012)	64	Câncer de próstata (n = 9, 13%), colorretal (n=6, 9%), pulmão (n=6, 9%), linfoma não-Hodgkin (n=7, 10%), melanoma maligno (n=5, 7%), tumores de pele (n=5, 7%), mama (n=5, 7%), pâncreas (n=4, 6%), rim (n=4, 6%), LLC (n = 3, 4%), cabeça e pescoço (n=2, 3%), vesícula biliar (n=2, 3%), sarcoma (n=2 3%), esôfago, estômago, fígado, vulva, útero, cérebro (n=1 para cada)
Pilot, Sablinska [265]	França	Era ITK (2004-2005)	110	Não teve segunda doença relacionada a LMC
Rebora, Czene [257]	Base de dados Suécia	Era pré-ITK (1970-1995)	145	Estômago (RR 2,76, IC 95% 1,33-5,08), câncer de pele (RR 5,36, IC 95% 3,18-8,47), trato urogenital (RR 1,61, IC 95% 1,15-2,21), LLC (RR 5,53, IC 95% 1,79-12,89)
Roy, Guilhot [266]	França	Era ITK (1999-2004)	6	Câncer de próstata (n=3), bexiga (n=1), Cólon (n=1)
Shah and Ghimire [269]	Base de dados SEER – EUA	Era pré-ITK e ITK (1992-2009)	473	Tumores sólidos (RR 1,14, IC 95% 1,02-4,09), cavidade oral e faringe (RR 2,73, IC 95% 1,73-4,09), sistema digestivo (RR 1,29, IC 95% 1,05-1,58), fígado, vesícula biliar, ducto biliar intra-hepático e outras vias biliares (RR 1,89, IC 95% 1,06-3,11), flândula adrenal (RR 16,90, IC 95% 2,05-61,04), doenças hematológicas e linfáticas (RR 2,43, IC 95% 1,74-3,11), linfoma (RR 2,43, IC 95% 1,74-3,31) leucemias (RR 3,47, IC 95% 0,42-12,53)
Verma, Kantarjian [267]	EUA	Era ITK (1998-2010)	66	Câncer de pele (31%), próstata (15%), melanoma (13%), sistema digestivo (10%), renal (4%), tireoide (4%), mama (3%), LLC (3%)
Voglova, Muzik [268]	República Tcheca e Eslováquia	Era ITK (2000-2009)	35	Câncer de pulmão (n=7), mama (n=4), Pâncreas (n=2), Tecido hematopoiético (n=3), próstata (n=2), cólon (n=2), útero (n=2), bexiga, rim, testículo, ânus, reto, jejuno, apêndice, colo de útero, pele, glândula adrenal, estômago e laringe (n=1 cada)

Nota: ITK, inibidor de tirosina quinase; RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança; LLC, leucemia linfóide crônica; FONTE: O autor (2020)

Há muitos fatores de risco que afetam o desenvolvimento de uma segunda malignidade em sobreviventes de câncer. Os efeitos colaterais tardios do tratamento utilizado (quimioterapia ou radioterapia) são um desses fatores de risco. As alterações citogenéticas além do cromossomo Philadelphia são comuns na progressão da doença devido à instabilidade genética causada pela atividade descontrolada da tirosina quinase BCR-ABL. Porém, pacientes tratados com ITKs e com CMR ou CCyR ainda podem apresentar anormalidade cromossômicas. Já existem relatos mostrando o aumento de células neoplásicas em culturas tratadas com esses inibidores, possivelmente por esses fármacos ligarem a outros sítios de ATP em outras proteínas quinases, como o receptor de fator de célula-tronco c-KIT, o PDGFR  $\alpha$  e  $\beta$ , e a família SRC de tirosina quinases LCK, FRK, FYN [270].

Além disso, a tirosina quinase ABL interage com várias proteínas relacionadas ao mecanismo de reparo do DNA, como a proteína RAD51 que desempenha um papel essencial no reparo de quebra de cadeia dupla de DNA. Adicionalmente, apresenta ação pró-apoptótica por ligar diretamente a p53, possibilitando a parada do crescimento na fase G1. Defeitos no reparo do DNA e na parada G1 pela inibição da c-ABL mediada pelos ITKs podem predispor as células à replicação do DNA danificado, levando à instabilidade genética [270-272]. O sistema imunológico tem papel fundamental na eliminação desses clones aberrantes. Contudo, os ITKs têm ação imunossupressora, comprometendo a resposta imunológica celular por inibir a ativação e proliferação de células T ao diminuir a ação de células dendríticas e a produção de citocinas responsáveis pelo estímulo das respostas primárias das células T [254, 270, 272-274].

Essas observações sugerem relação entre ITK e a origem das aberrações dos centrossomas e dos cariótipos (instabilidade genética) e, portanto, podem explicar o surgimento de anormalidades cromossômicas clonais nas células progenitoras BCR-ABL negativas sob terapia com imatinibe. Em geral, após o paciente alcançar a CMR é recomendado que o paciente continue usando os ITKs [275]. Apesar de já serem bem conhecidos os eventos adversos dos ITKs a curto prazo, com o aumento da sobrevida dos pacientes com essa terapia, surgem efeitos a longo prazo ainda não claramente identificados, como neoplasias secundárias [267, 275].

### 6.3.2. Outros cânceres como fator de risco para a LMC

Na TABELA 9 são apresentados os resultados de quais cânceres podem se comportar como fatores de risco para a LMC. Já existem relatos na literatura associando a LMC como doença posterior a outras doenças hematológicas [276-282]. Além disso, o comprometimento imunológico pode ser um fator que predispõe o quadro da LMC. A vigilância imune diminuída aumenta a chance de que uma célula-tronco hematopoiética anormal escape dos mecanismos de inibição [283]. Contudo, para isso, é necessário também que o paciente seja suscetível à leucemia, ou seja, apresente certa predisposição hereditária [283].

A associação da leuceia linfocítica crônica (LLC) com a LMC já é relatada na literatura [276-282]. Pacientes com LLC apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de outras neoplasias devido ao próprio processo leucêmico, assim como pela imunodeficiência presente [276, 277, 280, 283]. Ainda, o tratamento da LLC com agentes alquilantes pode contribuir para a evolução da LMC, devido a este induzir anormalidades imunológicas [276-278, 280]. Ainda, a associação de distúrbio linfoproliferativo e mieloproliferativo pode ser devido a transformação neoplásica de um único progenitor capaz de diferenciar linhagem celular linfoide/mieloide. Entretanto muitos autores questionam que as doenças não surgem de diferentes clones celulares, devido a negatividade de um marcador molecular em comum [277, 280, 282].

Adicionalmente, na literatura, já existem estudos associando a LMC com câncer na amígdala [284], nasofaringe [285], tireoide[286-288], testículo [289-291], próstata [292] e mama [293, 294]. Mas todos os estudos associam a LMC como doença secundária deve-se a terapia realizada para este câncer inicial, principalmente a radioterapia (TABELA 10).



TABELA 9. NÚMERO DE CÂNCERES ANTECEDENTES A LMC E NÃO LMC

<b>Câncer subsequente</b>	<b>LMC-2<sup>nd</sup></b> <b>(n=3.300)</b>	<b>nLMC-2<sup>nd</sup></b> <b>(n=996.589)</b>	<b>RR</b>	<b>IC 95%</b>
Retroperitônio	5 (0,15)	574 (0,06)	2,63*	1,09-6,34
Próstata	783 (23,73)	149.204 (14,97)	1,58**	1,49-1,69
Testículo	25 (0,76)	3.873 (0,39)	1,95**	1,32-2,88
Tireoide	93 (2,82)	15.759 (1,58)	1,78**	1,46-2,18
Hodgkin– Nodal	24 (0,73)	5.052 (0,51)	1,43*	0,96-2,14
Não-Hodgkin Linfoma	159 (4,82)	35.014 (3,51)	1,37**	1,18-1,60
NHL-Nodal	103 (3,12)	23.350 (2,34)	1,33**	1,10-1,61
NHL-Extranodal	56 (1,70)	11.664 (1,17)	1,45**	1,12-1,88
Mieloma	42 (1,27)	7.098 (0,71)	2,11**	1,32-2,42
Leucemia linfocítica aguda	26 (0,79)	598 (0,06)	13,13**	8,88-19,42
Leucemia mieloide aguda	30 (0,91)	1.616 (0,16)	5,61**	3,91-8,03

Nota: IC, intervalo de confiança; RR, risco relativo; \* indica valor de  $p < 0,05$ ,

\*\*indica valor de  $p < 0,01$ ; FONTE: O autor (2020)

TABELA 10. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO A QUIMIOTERAPIA E RADIOTERAPIA ANTES DA LMC

Câncer primário (antes da LMC)	Fez quimioterapia antes da LMC			Não fez quimioterapia			Fez radioterapia antes da LMC			Não fez radioterapia		
	LMC-2 <sup>nd</sup> (n=644)	RR	IC 95%	LMC-2 <sup>nd</sup> (n=2.662)	RR	IC 95%	LMC-2 <sup>nd</sup> (n=898)	RR	IC 95%	LMC-2 <sup>nd</sup> (n=2.408)	RR	IC 95%
Nasofaringe	2 (0,31)	3,34	0,93-11,96	2 (0,08)	0,81	0,22-2,90	4 (0,45)	4,30**	1,64-11,25	0	-	-
Amígdala	4 (0,62)	1,58	0,60-4,13	6 (0,23)	0,55	0,25-1,24	10 (1,11)	2,63**	1,38-5,00	0	-	-
Outras cavidades orais e faringe	1 (0,16)	3,68	0,71-18,94	1(0,04)	0,89	0,17-4,59	2 (0,22)	4,40*	1,23-15,78	0	-	-
Laringe	4 (0,62)	0,45	0,17-1,19	28 (1,05)	0,69	0,46-1,04	25 (2,78)	1,81**	1,18-2,77	7 (0,29)*	0,20	(0,1-0,43)
Retroperitônio	1 (0,16)	4,03	0,78-20,72	4 (0,15)	2,93*	1,12-7,66	1 (0,11)	1,93	0,57-14,87	4 (0,17)	3,24*	1,24-8,47
Mama	129 (20,03)	0,94	0,76-1,17	365 (13,71)	0,68**	0,59-0,78	231 (25,72)	1,15*	0,97-1,37	263 (10,92)	0,55**	0,47-0,65
Próstata	4 (0,62)	0,05**	0,020-0,14	780 (29,30)	1,74**	1,56-1,94	320 (35,63)	2,38**	1,73-2,35	464 (19,27)	1,24**	1,09-1,41
Testículo	6 (0,93)	2,58*	1,15-5,77	19 (0,71)	1,88**	1,16-3,03	11 (1,22)	3,15**	1,76-6,04	14 (0,58)	1,55	0,89-2,68
Tireoide	0	-	-	93 (3,49)	2,18**	1,71-2,77	61 (6,79)	4,30**	3,07-5,49	32 (1,33)	0,86	0,58-1,25
Hodgkin– Nodal	15 (2,33)	4,66**	2,72-7,96	9 (0,34)	0,71	0,36-1,38	10 (1,11)	2,29**	1,20-4,35	14 (0,58)	1,19	0,68-2,06
NHL-Nodal	64 (9,94)	3,97**	2,72-7,96	39 (1,47)	0,64**	0,45-0,90	13 (1,45)	0,62	0,36-1,14	90 (3,74)	1,58**	1,24-2,02
NHL-Extranodal	29 (4,50)	3,78**	2,92-4,77	27 (1,01)	0,88	0,57-1,33	14 (1,56)	1,33	0,79-2,38	42 (1,74)	1,49**	1,07-2,10
Mieloma	24 (3,73)	5,18**	3,35-7,99	18 (0,68)	0,97	0,60-1,60	6 (0,67)	0,94	0,45-2,27	36 (1,50)	2,11**	1,47-3,03
LLC	14 (2,17)	1,89*	1,09-3,29	35 (1,31)	1,13	0,79-1,63	1 (0,11)	0,09	0,03-0,74	48 (1,99)	1,70**	1,24-2,34
LLA	24 (3,73)	60,96**	39,29-94,48	2 (0,08)	1,56	0,44-5,59	5 (0,56)	9,27	4,22-24,25	21 (0,87)	14,52*	9,27- 23,37
LMA	23 (3,57)	21,74**	13,93-33,88	7 (0,26)	1,74	0,82-3,68	0	-	-	30 (1,25)	7,72**	5,21-11,44
Outras mieloides	1 (0,16)	12,22**	2,37-62,94	4 (0,15)	8,88**	3,38-23,29	0	-	-	261 (10,84)	6,70**	5,71-7,86

Nota: LLA, Leucemia linfocítica aguda; LMA, Leucemia mieloide aguda; LLC, Leucemia linfoide crônica \* indica valor de p<0,05,

\*\*indica valor de p<0,01; FONTE: O autor (2020)

O desenvolvimento de neoplasias secundárias, como a LMC, já é discutido na literatura como consequência da radioterapia, irradiação e quimioterapia [283, 295, 296].

A irradiação como fator de risco para a LMC já é abordada em relatos de sobreviventes de bombas atômicas [297]. Isso ocorre devido à radiação induzir alterações cromossômicas, mais especificamente a quebra cromossômica [283]. O risco de desenvolver a LMC após a radiação está associado a dois processos celulares: iniciação, que corresponde ao surgimento de alterações que tornam uma célula pré-maligna (como translocações, mutações pontuais, inversões, deleções), e a inativação, que é qualquer evento que inviabiliza essa célula pré-maligna [282, 295]. Doses muito altas de radiação favorecem mais a morte celular do que a transformação, enquanto baixas doses de irradiação (como sobreviventes de bombas atômicas) e altas doses com baixa frequência favorecem a transformação/iniciação [282]. A chance do surgimento da LMC posterior a terapia depende então da dose e da duração da radiação. Portanto, considerando as diferentes abordagens terapêuticas disponíveis para as neoplasias primárias, a latência do tratamento até o diagnóstico da LMC varia conforme o tratamento adotado [283].

Como a radiação pode agir de forma inespecífica, previa-se mais alterações citogenéticas na LMC devido ao tratamento, além do BCR-ABL, porém no estudo de Yang e colaboradores (2018) foi encontrado que 83,5% dos casos de LMC secundária continham de achado somente o cromossomo Ph [283].

A associação entre a LMC e o câncer de próstata pode estar relacionada ao tratamento deste segundo câncer, que consiste na radioterapia por feixe externo [295]. Essa radiação desregula o mecanismo imunológico, pelo efeito imunossupressor da resposta inata, principalmente as células NK (do inglês, *natural killer*). Essas células são responsáveis pelo reconhecimento de clones malignos que podem resultar em outros cânceres como a LMC [292, 298].

O desenvolvimento de LMC secundária ao linfoma de Hodgkin pode ser tanto pela radioterapia (RR=2,29) quanto pela quimioterapia (RR=4,66), contudo, estudos anteriores demonstraram que, em geral, a quimioterapia no linfoma de Hodgkin tende a desencadear principalmente a LMA, por outro lado a exposição à radiação ionizante favorece a LMC. A radiação ionizante escassa é

considerada um indutor potente para translocações recíprocas, enquanto a quimioterapia predispõe a um maior número de mutações e mais complexas, que não é característico da fase crônica da LMC, e sim a LMA [299, 300].

## **7. CONCLUSÃO**

Os fatores prognósticos associados à um aumento da SG na LMC são: indivíduos jovens, do sexo feminino, submetidos à quimioterapia e diagnosticados após 2001 – que potencialmente fazem uso de ITK como quimioterapia. Outros fatores que também contribuíram no melhor prognóstico dos pacientes foram os testes de diagnóstico, a sequência do tumor e a raça. Outros cânceres prévios que são tratados com radioterapia têm potencial de se comportar como fatores de risco para desenvolvimento da LMC (como câncer secundário). Por sua vez, a LMC como doença primária pode levar ao aparecimento de outros tipos de câncer, incluindo de boca, lábio, língua, próstata e outras malignidades hematológicas devido à própria patologia da doença ou pelo tratamento com ITK .

Este estudo apresenta algumas limitações relacionadas especialmente ao acesso de dados e tipos de informações disponíveis na base de dados SEER, que podem prevenir outras análises ou conclusões sobre fatores prognósticos e de risco na LMC. Não foi possível obter informações completas sobre o tipo de tratamento recebido pelo paciente (*i.e.* dados apresentados, apenas como “sim” ou “não/desconhecido” para quimioterapia e radioterapia), ou sobre adesão à terapia. Ainda, não havia informações sobre os fatores subjacentes que podem aumentar a suscetibilidade ao câncer secundário, como fatores genéticos, comorbidades, estilo de vida e microambiente do tumor primário.

# CAPÍTULO 2. REVISÃO SISTEMÁTICA E META- ANÁLISE DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DOS ITKS

## 8. INTRODUÇÃO

A farmacoterapia da LMC é baseada principalmente no uso de ITK. O primeiro inibidor da BCR-ABL a ser utilizado na prática clínica foi o mesilato de imatinibe, que demonstrou maior tolerabilidade e menor probabilidade de progressão para fase acelerada ou blástica em comparação ao interferon- $\alpha$  associado a citarabina, quimioterapia base antes do desenvolvimento dos ITK [78, 301].

De acordo com a ELN e a NCCN, a resposta ideal ao ITK é definida como CHR e CCyR em seis meses de tratamento, e CMR ou MMR em 12 meses de tratamento [24, 103]. Contudo, muitos pacientes em uso de imatinibe não atingem os objetivos do tratamento, principalmente devido à resistência aos medicamentos. Assim, novos medicamentos desta classe foram desenvolvidos e aprovados pelas agências reguladoras. As novas gerações de ITK incluem: dasatinibe, nilotinibe, bosutinibe, ponatinibe e radotinibe [301].

A segunda geração (dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe) é considerada mais potente e eficaz que o imatinibe em pacientes resistentes ao tratamento de primeira linha. O ponatinibe e o radotinibe (ITK de terceira geração) são eficazes em pacientes refratários ao dasatinibe ou nilotinibe e com mutação T315I, respectivamente [5, 107]. No entanto, não há estudos comparando diretamente a eficácia e a segurança de todos esses ITK disponíveis no mercado para o tratamento da LMC.

A meta-análise em rede (do inglês *network meta-analysis*, NMA) surgiu como uma alternativa eficaz para comparar vários tratamentos em um único modelo. As vantagens desta metodologia em comparação com as meta-análises diretas incluem a possibilidade de comparar em um único modelo diferentes intervenções que não tenham sido avaliadas de maneira pareada em estudos primários (p. ex. ensaios clínicos), permitindo assim um aumento significativo no número de pacientes comparados e uma maior evidência comparativa [302]. Portanto, este capítulo tem como objetivo conduzir uma revisão sistemática e NMA para comparar a eficácia e a segurança entre os ITK disponíveis no mercado [227, 228].

## **9. OBJETIVO**

### **9.1. Objetivo geral**

Comparar a evidência do perfil de eficácia e segurança dos ITK utilizados para LMC e ponderar seus riscos e benefícios.

### **9.2. Objetivo específico**

- Reunir dados de eficácia e segurança dos inibidores de tirosina quinase bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe.
- Analisar o risco de viés e a qualidade dos estudos incluídos.
- Avaliar comparativamente a eficácia, segurança e tolerabilidades dos inibidores de tirosina quinase.

## 10. MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1. Revisão sistemática

O protocolo deste estudo foi registrado no PROSPERO (número de registro CRD42017065864).

Visando reunir evidências sobre a eficácia e segurança dos ITK recomendados para o tratamento da LMC uma busca sistemática na literatura foi realizada, baseada nos sete passos recomendados pela diretriz metodológica internacional da *Cochrane Collaboration Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, *The Cochrane Collaboration* [303] e da *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) [304].

Inicialmente, foi estruturada a pergunta da pesquisa utilizando o acrônimo PICOS, para a identificação dos estudos. Portanto, os estudos incluídos deveriam contemplar os seguintes critérios:

- P (população): pacientes adultos (> 18 anos) diagnosticados com LMC;
- I (intervenção terapêutica): ITK usado no tratamento da LMC (imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, bosutinibe, ponatinibe, radotinibe), independente da concentração, regime posológico e tempo de tratamento;
- C (comparador / controle): qualquer outro medicamento da classe ITK (*head-to-head*) (fármaco-fármaco) ou placebo;
- O (outcome / desfechos): desfechos clínicos de eficácia (resposta hematológica, citogenética e molecular) e segurança (eventos adversos sérios);
- S (Study design / desenho de estudo): ensaio clínico randomizado (ECR).

#### 10.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Após a definição da pergunta, os critérios de inclusão e exclusão de artigos puderam ser definidos. Foram incluídos ECR que atendiam os critérios estabelecidos pelo acrônimo PICOS e publicados até fevereiro de 2018. Foram excluídas publicações escritas em algarismos não romanos.



### 10.1.2. Localização dos estudos

A busca pelas publicações foi conduzida nas bases de dados MEDLINE/Pubmed, Web of Science, Scielo e Scopus, e complementada através de busca manual (análise das referências dos artigos incluídos).

Para a busca dos trabalhos foram utilizados os seguintes descritores na estratégia de busca: nomes comerciais e genéricos dos medicamentos da classe de inibidores de tirosina quinase aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), o termo leucemia mieloide crônica e sinônimos, além dos descritores referentes a ensaios clínicos – padronizados pelo Pubmed para este *query*. Os descritores foram adaptados para cada base de dados e combinados através de operadores booleanos (OR e AND). A estratégia de busca para cada base de dados é apresentada na TABELA 11.

TABELA 11. ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NAS BASES DE DADOS

Base de dados	Estratégia de busca
PubMed	(imatinib[Title/Abstract] OR glivec[Title/Abstract] OR Gleevec [Title/Abstract] OR dasatinib[Title/Abstract] OR sprycel[Title/Abstract] OR nilotinib [Title/Abstract] OR tassigna[Title/Abstract] OR bosutinib [Title/Abstract] OR bosulif[Title/Abstract] OR ponatinib[Title/Abstract] OR iclusig[Title/Abstract] OR radotinib[Title/Abstract] OR supect [Title/Abstract] OR "tyrosine kinase inhibitor"[Title/Abstract]) AND ((clinical [Title/Abstract] AND trial[Title/Abstract]) OR "clinical trials as topic" [MeSH Terms] OR "clinical trial"[Publication Type] OR random* [Title/Abstract]) OR "random allocation"[MeSH Terms] OR "therapeutic use"[MeSH Subheading]) AND ("Chronic Myeloid Leukemia" [Title/Abstract] OR "chronic myelogenous leukemia"[Title/Abstract] OR "leukemia, myelogenous, chronic"[MeSH Terms])
Scopus	TITLE-ABS-KEY (imatinib OR glivec OR gleevec OR dasatinib OR sprycel OR nilotinib OR tassigna OR bosutinib OR bosulif OR ponatinib OR iclusig OR radotinib OR supect OR "tyrosine kinase inhibitor") AND TITLE-ABS-KEY (clinical AND trial) AND TITLE-ABS-KEY (chronic AND myeloid AND leukemia) AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar") OR LIMIT-TO (DOCTYPE , "ip" ))
Web of Science	("chronic myeloid leukemia") AND ("randomized trial") AND ("tyrosine kinase inhibitors") (Topic)
Scielo	Leukemia AND Trial AND (imatinib OR dasatinib OR nilotinib OR bosutinib OR ponatinib OR radotinib)

FONTE: O autor (2020)

### 10.1.3. Seleção dos estudos

Dois revisores independentes selecionaram os artigos potencialmente relevantes para a revisão baseados no título e resumo. Se houvesse discordância sobre a inclusão do artigo, um terceiro revisor era consultado. Os artigos selecionados nesta fase foram lidos na íntegra e tiveram seus dados coletados.

### 10.1.4. Coleta dos dados

Os dados foram extraídos em tabelas pré-elaboradas no *Microsoft Office Excel*. Os dados coletados consistiram em dados gerais e basais do estudo, desfechos de eficácia (resposta hematológica, citogenética e molecular) e segurança (eventos adversos sérios e gerais, e eventos hematológicos de grau 3-4).

### 10.1.5. Avaliação da qualidade dos estudos

A qualidade metodológica atribuída à ensaios clínicos incluídos implica na confiabilidade do estudo. Essa avaliação foi realizada por meio da escala de Jadad, que apresenta cinco questões visando avaliar a randomização, cegamento, e descrição de perdas e exclusão. Dessa forma, considera-se como estudo de moderada ou elevada qualidade metodológica em caso de escore igual ou superior a 3 pontos, respectivamente [305].

Outra avaliação realizada nos estudos incluídos foi o risco de viés através da ferramenta da *Cochrane Collaboration*, disponibilizada no *Cochrane – Handbook de revisões sistemáticas de intervenções em saúde* [303]. Essa ferramenta também remete à confiabilidade do estudo, entretanto, apresenta seis domínios, sendo os seguintes: seleção, performance, detecção, atrito, publicação e outras fontes de vieses.

Os resultados obtidos com estas duas ferramentas permitem conhecer a confiabilidade do estudo e não são considerados como critérios de exclusão dos estudos.

## 10.2. Apresentação dos resultados e meta-análises

A análise foi feita através de comparações diretas e indiretas entre os tratamentos disponíveis. Assim, na presença de ambas as comparações, estas foram interpoladas gerando um resultado misto. Esse teste foi realizado por meio de metodologia bayesiana, em que o intervalo relacionado à medida de efeito encontrada deve ser considerado como intervalo de credibilidade (ICr), utilizando o software Addis, versão 1.16.8. ICr de 95% representa que há 95% de probabilidade de que o valor de OR esteja dentro do intervalo especificado [306].

Além disso, foi realizado um ranqueamento dos fármacos, definindo com isso qual tratamento é considerado o melhor e o pior para cada desfecho. Esse ranqueamento foi calculado via *surface under the cumulative curve analyses* (SUCRA) [307].

A avaliação da inconsistência entre as evidências da comparação direta e indireta foi realizada com base no *node-splitting*, sendo que em casos de inconsistência (valor de  $p < 0,05$ ), foram realizadas análises de sensibilidade para detectar a causa dessa discrepância [308, 309].

## 11. RESULTADOS

### 11.1. Revisão sistemática

Após pesquisar nas bases de dados eletrônicas e fazer remoção das duplicatas, 5.012 registros foram incluídos para a leitura de título e resumo. Destes, 62 foram lidos na íntegra, e 21 foram incluídos na revisão sistemática. Outros três registros foram adicionados manualmente, resultando em um total de 24 artigos [310-333] referente a 17 ECR (FIGURA 9).

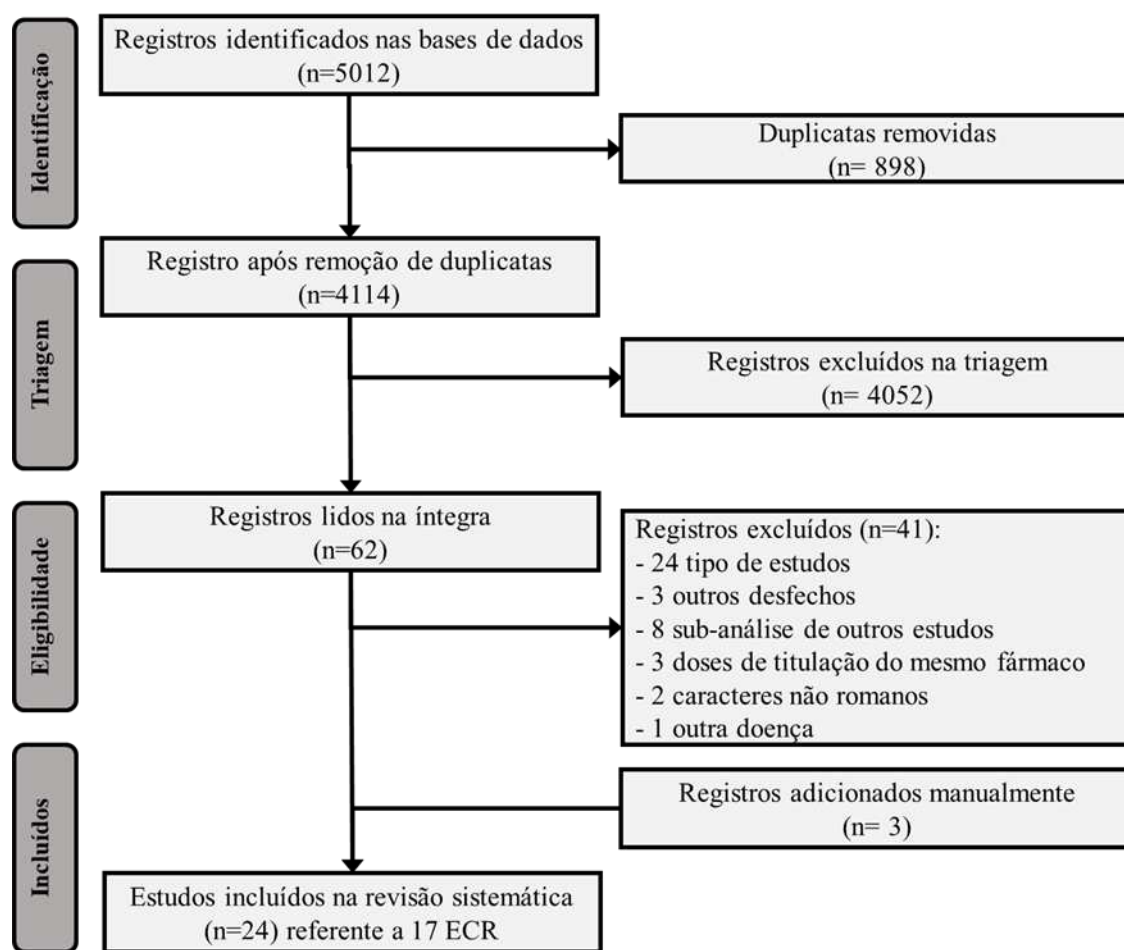


FIGURA 9. FLUXOGRAMA DA REVISÃO SISTEMÁTICA

FONTE: O autor (2020)

Os estudos incluídos nesta revisão sistemática foram publicados entre 2009 e 2017 e a maioria eram multicêntricos (82,3%). Os pacientes do sexo masculino representaram 58% dos pacientes e a idade variou de 18 a 91 anos, com mediana de 50,5 anos (IQR 47,0 - 52,8 anos). A duração do tratamento variou de 12 a 120 meses. Todos os estudos foram realizados de forma direta e englobaram os medicamentos bosutinibe (n=3), dasatinibe (n=5), imatinibe (n=23), nilotinibe (n=5), ponatinibe (n=1) e radotinibe (n=1) em doses diferentes. Todos os estudos incluíram apenas pacientes na fase crônica da LMC. Não foram encontrados ensaios clínicos controlados por placebo. As principais características dos 24 estudos incluídos estão apresentadas na TABELA 12.

TABELA 12. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Registro do ensaio	País	Autor	Tempo (meses)	Fármaco	Nº de paciente	Idade (anos)	% Homem	Desfecho
NCT00070499 ECR, fase III	EUA e Canadá	Deininger, 2014 [317]	12	Imatinibe 400 mg	72	50 (23–80)	62,5	CMR, MMR, CCyR, CHR, anemia, eventos adversos sérios, trombocitopenia
				Imatinibe 800 mg	73	52 (19–82)	64,4	
		Radich, 2012 [329]	12	Imatinibe 400 mg	123	50 (19–89)	58,5	
				Imatinibe 100 mg	123	47 (18–90)	60,2	
START-R NCT00103844 ECR, open label, fase 2	58 centros em 23 países	Kantarjian, 2009 [324]	24	Dasatinibe 140 mg	101	51 (24–85)	52	Anemia, leucopenia, neutropenia
				Imatinibe 800 mg*	49	51 (24–80)	45	
NCT00123474 ECR, open label, fase 3	Multicentro (139 países)	Shah, 2010 [331]	24	Dasatinibe 100 mg	167	56 (20–78)	50	Anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia
				Dasatinibe 100 mg*	168	55 (21–84)	51	
				Dasatinibe 140 mg	167	54 (20–84)	42	
				Dasatinibe 140 mg*	168	55 (18–83)	46	
TOPS NCT00124748 ECR, open label, fase 3	19 países	Cortes, 2010 [312]	17	Imatinibe 400 mg	157	45 (18–75)	53,5	MMR, CCyR
				Imatinibe 800 mg*	319	48 (18–75)	57,4	
		Baccarini, 2014 [310]	42	Imatinibe 400 mg	157	45 (18–75)	53,5	
				Imatinibe 800 mg*	319	48 (18–75)	57,4	
ISTAHIT NCT00327262 ECR, open label, fase 3	7 países	Petzer, 2012 [328]	6	Imatinibe 400 mg	113	46 (20–68)	42	Anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia
				Imatinibe 800 mg*	114	46 (18–76)	47	
ENESTnd NCT00471497 ECR, open label, fase 3	38 países	Saglio, 2010 [330]	12	Nilotinibe 300 mg*	282	47 (18–85)	56,0	MMR, CCyR, MCyR, CHR
				Nilotinibe 400 mg*	281	47 (18–81)	62,0	
		Hochhaus, 2016 [321]	36	Imatinibe 400 mg	283	46 (18–80)	56,0	
				Nilotinibe 300 mg*	282	47 (18–85)	56,0	
DASISION NCT00481247 ECR, open label, fase 3	89 países	Kantarjian, 2010 [325]	12	Dasatinibe 100 mg	259	46 (18–84)	56,0	MMR, CCyR
				Imatinibe 400 mg	260	49 (18–78)	63,0	
		Cortes, 2016 [316]	60	Dasatinibe 100 mg	259	46 (18–84)	56,0	Anemia, trombocitopenia
				Imatinibe 400 mg	260	49 (18–78)	63,0	
NCT00514488 ECR	Itália	Baccarani, 2009 [311]	12	Imatinibe 400 mg	108	51 (18–81)	57,0	MMR, CCyR, MCyR
				Imatinibe 800 mg*	108	51 (18–84)	55,0	
ENESTcmr NCT00760877 ECR, open label, fase 3	Multicentro	Hughes, 2017 [322]	48	Nilotinibe 800 mg	104	46 (23–82)	68	Anemia, trombocitopenia
				Imatinibe 400/600 mg	103	52 (19–76)	63	

Nota: \*Regimes designados foram igualmente divididos em duas doses por dia; CMR, resposta molecular completa; MMR, resposta molecular maior; CCyR, resposta citogenéticamolecular completa; MCyR, resposta citogenética maior; CHR, resposta hematológica completa; FONTE: O autor (2020)

**Conclusão: TABELA 12. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS**

Registro do ensaio	País	Autor	Tempo (meses)	Fármaco	Nº de paciente	Idade (anos)	% Homem	Desfecho	
<b>BELA</b> NCT00574873 ECR	31 países	Cortes, 2012 [315]	12	Bosutinibe 500 mg	250	48 (19–91)	60,0	Eventos adversos sérios	
				Imatinibe 400 mg	252	47 (19–89)	54,0		
		Gambacorti, 2014 [333]	36	Bosutinibe 500 mg	250	48 (19–91)	60,0		Anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia
				Imatinibe 400 mg	252	47 (19–89)	54,0		
<b>LASOR</b> NCT00802841 ECR	12 países	Cortes, 2016 (2) [313]	24	Nilotinibe 800 mg*	96	46 (32–56)	54	Leucopenia, trombocitopenia	
				Imatinibe 600 mg	95	44 (33–56)	58		
<b>NordCML006</b> NCT00852566 ECR, open label, fase 2	Finlândia, Noruega e Suécia	H.-Hansen, 2014 [320]	36	Dasatinibe 100 mg	22	53 (29–71)	32,0	CCyR, anemia, trombocitopenia	
				Imatinibe 400 mg	24	58 (38–78)	63,0		
<b>ENESTchina</b> NCT01275196 ECR, open label, fase 3	China	Wang, 2015 [332]	24	Nilotinibe 300 mg*	134	41 (18–76)	67,9	MMR, CCyR, anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia	
				Imatinibe 400 mg	133	39 (19–74)	60,9		
<b>RERISE</b> NCT01511289 ECR, open label, fase 3	Coreia, Tailândia, Filipinas, Indonésia	Kwak, 2017 [326]	12	Radotinibe 300 mg*	79	45 (20–75)	56,0	CMR, MMR, CCyR	
				Radotinibe 400 mg*	81	43 (18–84)	68,0		
				Imatinibe 400 mg	81	45 (18–83)	64,0		
<b>EPIC</b> NCT01650805 ECR, open label, fase 3	21 países	Lipton, 2016 [327]	12	Ponatinibe 45 mg	155	55 (18–89)	63,0	CMR, MMR, trombocitopenia	
				Imatinibe 400 mg	152	52 (18–86)	61,0		
<b>BFORE</b> NCT02130557 ECR, open label, fase 3	24 países	Cortes, 2017 [314]	12	Bosutinibe 400 mg	268	52 (18–84)	57,7	CMR, MMR, CCyR, eventos adversos sérios, leucopenia, neutropenia	
				Imatinibe 400 mg	268	53 (19–84)	56,0		
<b>CML- Study IV</b> ECR, open label	Alemanha, Suíça, República Tcheca	Hehlmann, 2011 [318]	12	Imatinibe 400 mg	325	54 (16–88)	60,0	CCyR, anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia	
				Imatinibe 800 mg	338	52 (18–86)	59,0		
				IFN + Imatinibe 400 mg	351	54 (16–83)	61,0		
		Hehlmann, 2017 [319]	120	Imatinibe 400 mg	400	53 (16–88)	61,0	CMR, MMR	
				Imatinibe 800 mg	420	51 (18–85)	59,0		
				IFN + Imatinibe 400 mg	430	53 (16–83)	59,0		
				IFN+ Imatinibe 400 mg	128	53 (18–87)	63,0		
		Kalmanti, 2015 [323]	120	Imatinibe 400 mg+ citarabina	158	52 (18–79)	63,0	Anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia	
				Imatinib 400 mg	406				
				Imatinib 800 mg	422				
				IFN+ Imatinibe 400 mg	434				
				IFN + Imatinibe 400 mg	131	53	-		
				Imatinibe 400 mg + citarabina	158				
				Imatinibe 400 mg	325				

Nota: \*Regimes designados foram igualmente divididos em duas doses por dia; CMR, resposta molecular completa; MMR, resposta molecular maior; CCyR, resposta citogenéticamolecular completa; MCyR, resposta citogenética maior; CHR, resposta hematológica completa; FONTE: O autor (2020)

## 11.2. Avaliação da qualidade metodológica e risco de viés

No geral, a qualidade metodológica dos ECR foi baixa a moderada, com uma pontuação média de Jadad de 2,1 (TABELA 13). Todos os estudos tiveram pontuação em “randomização” e contabilizaram a retirada ou desistência dos pacientes. No entanto, apenas três estudos (12,5%) descreveram adequadamente seus métodos de randomização. Devido à gravidade da condição clínica avaliada, todos os ensaios foram abertos.

TABELA 13. ANÁLISE DE QUALIDADE POR JADAD

Estudo	Random.	Método random.	Duplo-cego	Método de cegamento	Perdas estudo	Total
Deininger, 2014 [317]	1	0	0	0	1	2
Radich, 2012 [329]	1	0	0	0	1	2
Kantarjian, 2009 [324]	1	0	0	0	1	2
Shah, 2010 [331]	1	0	0	0	1	2
Cortes, 2010 [312]	1	0	0	0	1	2
Baccarini, 2014 [310]	1	0	0	0	1	2
Petzer, 2012 [328]	1	0	0	0	1	2
Saglio, 2010 [330]	1	0	0	0	1	2
Hochhaus, 2016 [321]	1	0	0	0	1	2
Kantarjian, 2010 [325]	1	0	0	0	1	2
Cortes, 2016 [316]	1	0	0	0	1	2
Baccarani, 2009 [311]	1	0	0	0	1	2
Cortes, 2012 [315]	1	0	0	0	1	2
Gambacorti, 2014 [333]	1	0	0	0	1	2
Hughes, 2017 [322]	1	0	0	0	1	2
Cortes, 2016 (2) [313]	1	1	0	0	1	3
Hjorth-Hansen, 2014 [320]	1	0	0	0	1	2
Wang, 2015 [332]	1	0	0	0	1	2
Kwak, 2017 [326]	1	1	0	0	1	3
Lipton, 2016 [327]	1	1	0	0	1	3
Cortes, 2017 [314]	1	0	0	0	1	2
Hehlmann, 2011 [318]	1	0	0	0	1	2
Hehlmann, 2017 [319]	1	0	0	0	1	2
Kalmanti, 2015 [323]	1	0	0	0	1	2

FONTE: O autor (2020)

Em relação à ferramenta RoB (FIGURA 10), os estudos mostraram um risco pouco claro de viés sobre os métodos de alocação, principalmente porque os estudos não forneceram detalhes suficientes.

Ainda, os estudos foram considerados com risco de viés incerto para ocultação da avaliação dos resultados, porque apesar dos estudos não serem cegados a maior parte dos desfechos eram objetivos (laboratoriais).

Todos os registros foram considerados com baixo risco de viés em relação aos dados incompletos dos resultados. Quase todos os estudos declararam patrocínio pelas indústrias farmacêuticas, por isso tiveram um viés alto para o domínio “outras fontes de viés”.

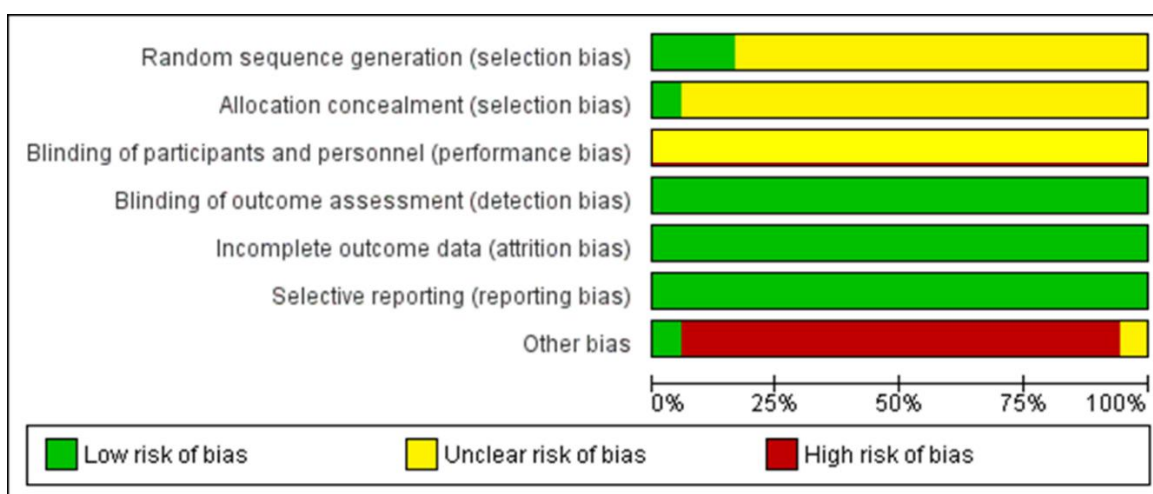


FIGURA 10. AVALIAÇÃO GLOBAL DO RISCO DE VIÉS PELA FERRAMENTA COCHRANE

FONTE: O autor (2020)

### 11.3. Meta-análises

#### 11.3.1. Meta-análises de eficácia

Na FIGURA 11 são apresentadas as cinco redes obtidas para os desfechos de eficácia usadas no monitoramento terapêutico: resposta hematológica completa (CHR), citogenética parcial (MCyR) e completa (CCyR), e resposta molecular parcial (MMR) ou completa (CMR).



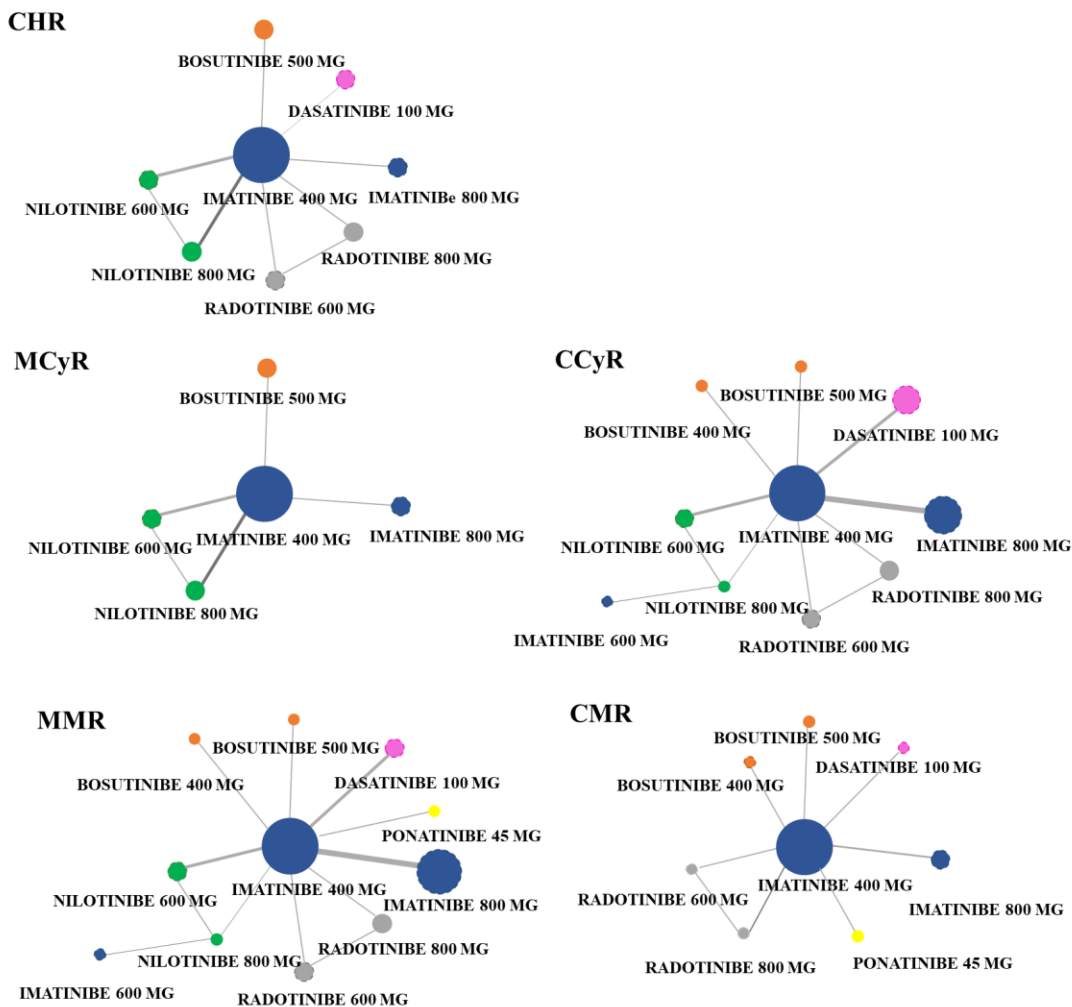


FIGURA 11. DIAGRAMA DE REDE OBTIDA PARA OS DESFECHOS DE EFICÁCIA

Nota: Laranja refere-se à bosutinibe; rosa à dasatinibe; azul à imatinibe; verde à nilotinibe; amarelo à ponatinibe; cinza à radonitibe

FONTE: O autor (2020)

As análises de comparação de tratamento múltiplo revelaram diferenças estatisticamente significantes entre os fármacos, especialmente para o resultado da MMR. Exceto pelo radotinibe 600 mg, todos os fármacos foram estatisticamente superiores ao radotinibe 800 mg. Os fármacos dasatinibe 100 mg, imatinibe 800 mg, nilotinibe 600 e 800 mg e ponatinibe 45 mg foram superiores aos imatinibe 400 mg. O radotinibe 600 mg foi considerado pior que o nilotinibe 600 mg (OR 0,29 [ICr95% 0,10-0,80]), nilotinibe 800 mg (OR 0,30 [ICr95% 0,09-0,87]) e ponatinibe 45 mg (OR 0,09 [ICr95% 0,01-0,81]). Para os demais desfechos, diferenças significativas foram observadas para:

- Resultado do CCyR: valores de OR 2,01 [ICr95% 1,03-4,88] favoreceram 100 mg de dasatinibe em comparação com 400 mg de imatinibe.
- Resultado de CHR: valores de OR 5,81 [ICr95% 1,14-31,56] favoreceram o nilotinibe 600 mg comparado ao bosutinibe 500 mg;
- Resultado de CMR: valores de OR 51,30 [ICr95% 1,44-4170,60] favoreceram 45 mg de ponatinibe em comparação com 400 mg de imatinibe.

Não foram encontradas outras diferenças entre os medicamentos. As análises de sensibilidade foram realizadas para todas as redes, considerando o regime do medicamento, o desenho do estudo e a qualidade metodológica, mas não foram encontradas diferenças adicionais nas análises originais. Todas as redes foram robustas para os resultados avaliados. Com a análise de inconsistência e a técnica de *nodesplit* não foram identificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em magnitude ou direção entre os resultados dos efeitos diretos e indiretos. As classificações de probabilidade para os cinco desfechos avaliados foram realizadas pela análise do SUCRA, conforme demonstrado na TABELA 14.

TABELA 14. RESULTADO DA ANÁLISE DE SUCRA PARA EFICÁCIA

Fármaco	CCyR	CHR	CMR	MCyR	MMR
Bosutinibe 400 mg	68,10%	-	63,50%	-	42,10%
Bosutinibe 500 mg	51,50%	7,60%	-	22,00%	57,80%
Dasatinibe 100 mg	80,40%	37,60%	48,50%	-	60,40%
Imatinibe 400 mg	30,50%	39,80%	32,30%	47,80%	21,10%
Imatinibe 800 mg	65,60%	53,00%	60,20%	24,30%	49,40%
Nilotinibe 600 mg	61,10%	86,00%	-	90,00%	81,00%
Nilotinibe 800 mg	-	75,60%	-	74,20%	79,20%
Ponatinibe 45 mg	-	-	90,00%	-	91,40%
Radotinibe 600 mg	15,00%	-	32,70%	-	15,60%
Radotinibe 800 mg	12,80%	-	17,50%	-	0,80%

Nota: SUCRA: *surface under the cumulative ranking curve*. Os valores SUCRA podem variar de 0% (ou seja, o tratamento sempre ocupa a última posição) a 100% (ou seja, o tratamento sempre ocupa a primeira posição). CCyR, resposta citogenética completa; CHR, resposta hematológica completa; CMR, resposta molecular completa; MCrR, resposta citogenética maior; MMR resposta molecular maior; FONTE: O autor (2020)

### 11.3.2. Meta-análises de segurança

Os eventos adversos sérios (EAS) relatados nos ensaios clínicos eram principalmente desfechos hematológicos de grau 3-4: anemia (n = 16 estudos), leucopenia (n = 11), neutropenia (n = 14) e trombocitopenia (n = 17). Para cada um desses eventos adversos, uma meta-análise em rede foi realizada considerando todos os pacientes. Os gráficos de rede estão representados na FIGURA 12.

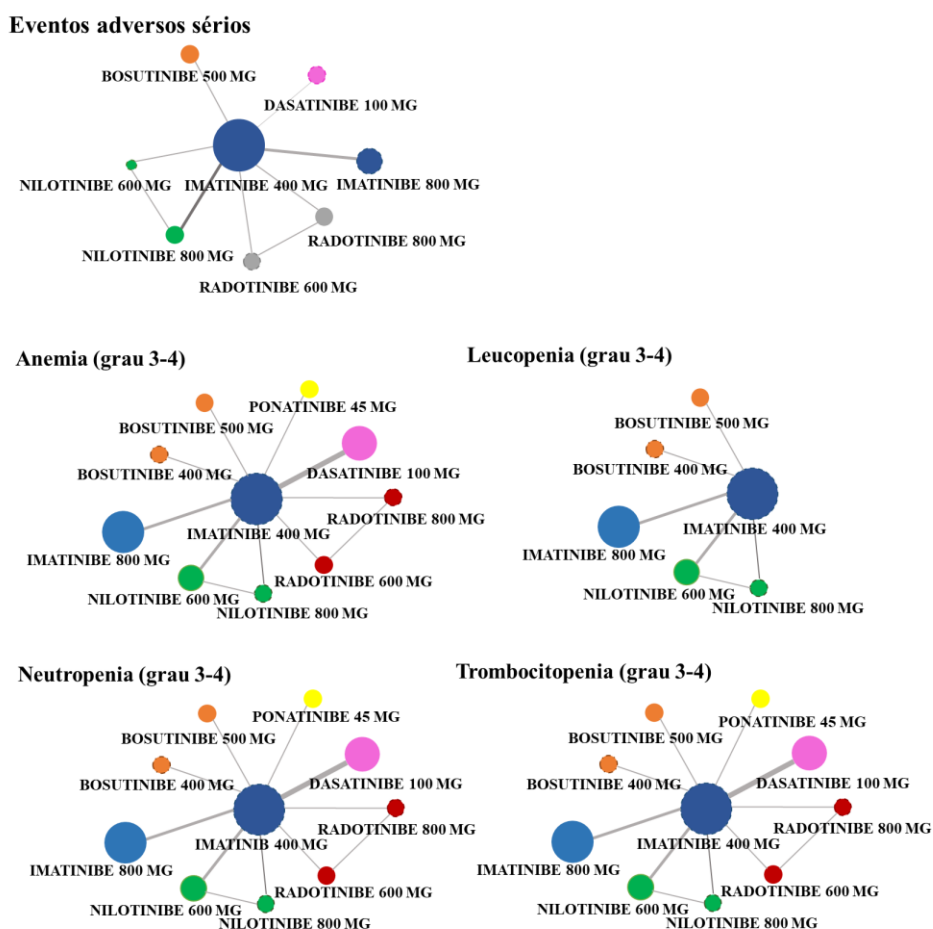


FIGURA 12. DIAGRAMA DE REDE OBTIDA PARA OS DESFECHOS DE SEGURANÇA

Nota: Laranja refere-se à bosutinibe; rosa à dasatinibe; azul à imatinibe; verde à nilotinibe; amarelo à ponatinibe; vermelho à radonitibe

FONTE: O autor (2020)

Os resultados do SUCRA para as análises dos desfechos de segurança de cada medicamento são demonstrados na TABELA 15.

TABELA 15. RESULTADO DA ANÁLISE DE SUCRA PARA CADA FÁRMACO CONSIDERANDO OS DESFECHOS DE SEGURANÇA

Fármacos	Desfechos				
	Anemia	Leucopenia	Neutropenia	Trombocitopenia	EAS
Bosu 400 mg	52%	47%	22%	71%	44%
Bosu 500 mg	60%	27%	21%	34%	52%
Dasa 100 mg	74%	84%	74%	79%	67%
Dasa 140 mg	90%	87%	91%	97%	-
Ima 400 mg	39%	59%	56%	34%	10%
Ima 600 mg	5%	24%	-	20%	-
Ima 800 mg	74%	79%	70%	63%	77%
Nilo 600 mg	22%	24%	33%	29%	-
Nilo 800 mg	36%	15%	18%	33%	-
Pona 45 mg	-	-	21%	65%	-
Rado 600 mg	63%	-	65%	28%	-
Rado 800 mg	35%	-	80%	47%	-

Nota: SUCRA, *Surface under the cumulative ranking curve* values; EAS, eventos adversos sérios. O valor de SUCRA pode variar de 0 a 100%. Taxas mais altas representam uma opção menos segura (resultado negativo); FONTE: O autor (2020)

A análise revelou que dasatinibe 140 mg causa significativamente mais anemia do que imatinibe 400 mg (OR 0,30 [ICr95% 0,07-0,86]), imatinibe 600 mg (OR 0,04 [ICr95% 0,00-0,61]) ou nilotinibe 600 mg (OR 0,18 [ICr95% 0,03-0,81]), sendo considerada a alternativa terapêutica menos segura para esse resultado (90% de probabilidade de ser a menos segura, conforme demonstrado na TABELA 15). Em uma dose mais baixa, dasatinibe 100 mg também resultou em mais casos de anemia do que imatinibe 600 mg (OR 0,05 [ICr95% 0,00-0,87]). O imatinibe 600 mg foi considerado a opção mais segura para esse desfecho (SUCRA: 5%).

Para o resultado da leucopenia, ambas as doses de dasatinibe (100 e 140 mg) e imatinibe (400 e 800 mg) foram consideradas opções menos seguras (SUCRA entre 84 a 87%), enquanto nilotinibe nas doses de 600 ou 800 mg foram as alternativas superiores (valores de SUCRA de 15 a 24%).

Ao considerar o desfecho da neutropenia, dasatinibe 140 mg foi classificado em último (SUCRA: 91%), sendo estatisticamente diferente do

nilotinibe (600 e 800 mg), ponatinibe (45 mg) e bosutinibe (400 e 500 mg). O ponatinibe (45 mg) e o bosutinibe (400 e 500 mg) apresentaram as menores probabilidades de causar neutropenia (<22%).

Para o desfecho de trombocitopenia, semelhante aos outros eventos adversos hematológicos, dasatinibe 140 mg foi a opção menos segura (SUCRA: 97%). Doses mais baixas de imatinibe (400 a 600 mg) e radotinibe 600 mg apresentaram as menores probabilidades de causar esse evento (SUCRA: 20-27%).

A análise de sensibilidade também foi realizada em todas as redes de segurança, considerando regime de drogas, desenho do estudo e qualidade metodológica; no entanto, nenhuma diferença adicional foi encontrada na análise original. Todas as redes foram consideradas robustas para os resultados avaliados. Com relação à análise de inconsistência, não foram identificadas diferenças substanciais ( $p < 0,05$ ) em magnitude ou direção entre os resultados dos efeitos diretos e indiretos.

#### **11.4. Correlação dos desfechos de eficácia e segurança**

A correlação entre o desfecho de eficácia (MMR) e segurança (EAS) é apresentado na FIGURA 13.

No geral, o nilotinibe 600 mg mostrou as maiores probabilidades de ser a melhor opção de tratamento, porque ele permaneceu em primeiro lugar (86,0% para o CHR e 90,0% para o MCyR) ou em segundo lugar (81,0% para o MMR). O imatinibe 400 mg apresentou taxas mais baixas de eventos adversos sérios entre todas as opções, mas sua probabilidade em termos de eficácia é de apenas cerca de 25%. Dasatinibe 100 mg e nilotinibe 800 mg foram considerados opções menos seguras, apesar das taxas de probabilidade de eficácia superiores a 60%. O ponatinibe 45 mg apresentou altos valores de SUCRA para CMR (90,0%) e MMR (91,4%), mas apenas um estudo avaliando esse medicamento foi incluído nas análises e nenhum dado sobre eventos adversos foi relatado. No geral, todas as doses de imatinibe e radotinibe apresentaram piores resultados para os desfechos de eficácia em 12 meses. Para MMR, o radotinibe em ambas as doses (600 mg e 800 mg) ficou em último lugar.

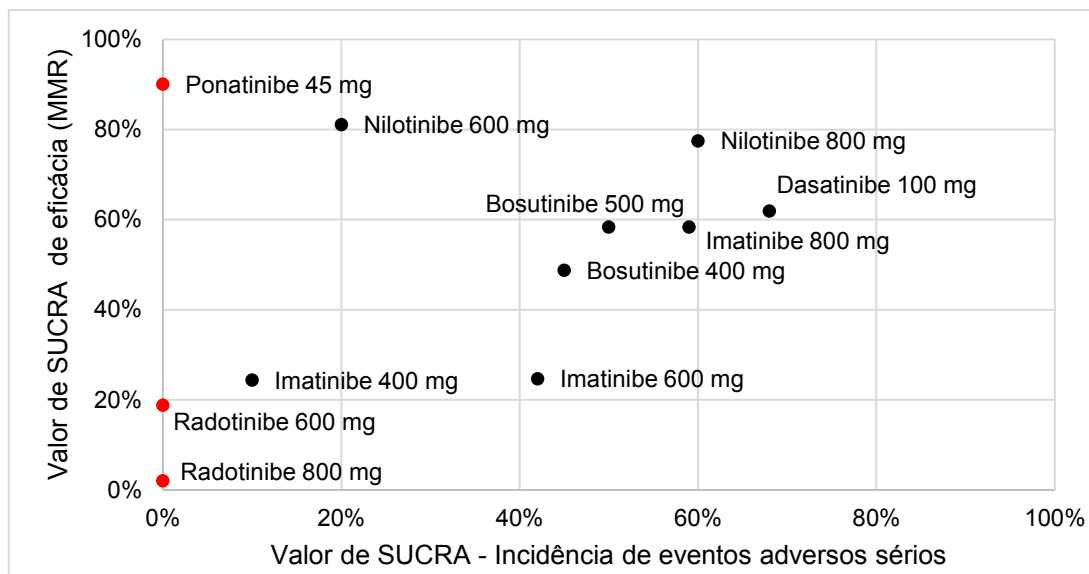


FIGURA 13. SUCRA FINAL CONSIDERANDO DESFECHO DE EFICÁCIA (MMR) E SEGURANÇA (EVENTOS ADVERSOS SÉRIOS)

Nota: Em preto são as intervenções que apresentam resultados tanto para eficácia quanto para segurança; em vermelho são as intervenções que só apresentam resultados para eficácia

FONTE: O autor (2020)

## 12. DISCUSSÃO

O sucesso terapêutico dos ITK deve ser avaliado através do monitoramento das respostas hematológicas, citogenéticas e moleculares em tempos específicos [3, 5, 86]. As respostas hematológicas e citogenéticas fornecem informações limitadas sobre a cinética da doença residual [334, 335]. Portanto, muitos pacientes que atingem CHR e CCyR podem apresentar recidivas [334, 336].

O monitoramento molecular do BCR-ABL oferece maior sensibilidade, sendo crítico para detectar doenças residuais mínimas (células BCR-ABL residuais Ph+) e fornecendo sinais de alerta de resposta abaixo do ideal [86, 335, 337]. Além disso, o sangue periférico pode ser usado sem a necessidade de punção da medula óssea [3, 338]. O MMR corresponde a uma redução de 3 log do nível BCR-ABL, aproximadamente 1 log abaixo do nível em que o CCyR é detectado [334, 336]. Atingir a MMR em 12 meses é o objetivo do tratamento, pois está associado a uma redução na progressão para a fase avançada e é

considerado um marcador de sobrevida livre de progressão (SLP) [79, 103, 339, 340]. Mais recentemente, surgiu o interesse em alcançar o MR4,5. Vários estudos relataram altas taxas de resposta molecular profunda com pacientes mantendo com sucesso a remissão sem tratamento, embora a recomendação dos protocolos de tratamento atuais seja permanecer com o tratamento indefinidamente [103, 339-342].

Nas análises de comparação múltipla da NMA notam-se taxas superiores de MR4,5 e MMR para ponatinibe 45 mg em comparação aos outros ITK. Esse fármaco provavelmente se destaca por sua característica estrutural, permitindo a interação fármaco-receptor sem impedimento estérico volumoso devido à mutação [139, 343, 344]. Devido a esse aspecto, o ponatinibe é especificamente recomendado para pacientes com mutações conhecidas por conferir resistência ao tratamento, incluindo a mutação T315I mais comum, que confere resistência a todos os outros ITK [139, 343-348]. De fato, aproximadamente 25% dos pacientes adquirem resistência aos outros ITK e não apresentam respostas satisfatórias, o que pode justificar a superioridade do ponatinibe [79, 139, 343, 345]. Porém, apenas um estudo randomizado de fase III foi incluído para o ponatinibe, e nenhum dado sobre EAS foi relatado. Portanto, são necessárias pesquisas adicionais para confirmar esses resultados iniciais. O cuidado durante a prescrição também é recomendado pela FDA, pois estudos anteriores foram interrompidos devido ao aparecimento de eventos vasculares precoces em pacientes tratados com ponatinibe [138, 349-351].

Em geral, a análise do monitoramento terapêutico mostrou que os pacientes tratados com nilotinibe atingiram as maiores taxas de resultados de eficácia quando comparados aos outros representantes dessa classe farmacológica. Esses achados estão de acordo com estudos publicados anteriores [106, 107, 131-135, 352-356] e com as recomendações recentes das diretrizes atuais da NCCN e ELN, que consideram o nilotinibe como uma opção para o tratamento de primeira linha de LMC [103, 339]. Além disso, ao comparar o nilotinibe com as outras opções de tratamento de primeira linha, o nilotinibe 600 mg tem 81,0% de chance de atingir a MMR em comparação com o imatinibe 400 mg (24,4%), o imatinibe 600 mg (24,7%) e o dasatinibe 100 mg (61,9%).

O imatinibe e o radotinibe apresentaram as menores taxas de eficácia entre todos os parâmetros utilizados para o monitoramento terapêutico. Apesar do imatinibe ser considerado um tratamento de primeira linha [103, 339, 340, 357] e apresentar um bom perfil de segurança (400 mg) em comparação com outras opções (SUCRA EAS: 10%), estudos anteriores relataram que muitos pacientes apresentam recidiva dentro de um ano de tratamento devido ao desenvolvimento de intolerância, levando à descontinuação do tratamento. A ocorrência de eventos adversos pode causar menor adesão à terapia, comprometendo a eficácia clínica do tratamento e resultando em progressão e resistência da doença [112, 114, 358-360]. Esse contexto destaca a importância de monitorar a adesão terapêutica, a fim de alcançar resultados clínicos desejáveis [361, 362].

Além disso, a escolha do tratamento não deve basear-se apenas na eficácia do tratamento, mas também no manejo dos EAS e na tolerabilidade a longo prazo [363, 364]. As toxicidades hematológicas são clinicamente significativas e requerem a interrupção temporária ou definitiva do tratamento ou ajustes de dose. Sabe-se que os ITK ao impedirem a proliferação celular em pacientes oncológicos, desencadeiam um processo de mielossupressão, que se manifesta em pacientes como anemia, leucopenia, neutropenia e trombocitopenia [365]. Essas complicações hematológicas podem levar a outros eventos adversos, como fadiga em pacientes com anemia, infecções oportunistas em pacientes com leucopenia ou neutropenia e risco de sangramento associado à trombocitopenia [363]. Comumente, a mielossupressão ocorre durante o início do tratamento, contudo, esse fenômeno é rapidamente revertido [364, 366]. Durante o tratamento a longo prazo, os EAS hematológicos são relatados principalmente em estágios avançados. A citopenia é uma manifestação da redução da reserva residual da medula óssea. Com o sucesso do tratamento com LMC, a medula óssea saudável (negativa para cromossomos Ph) é incapaz de normalizar a contagem sanguínea periférica após a supressão do clone anormal [363, 367-369].

Além da via c-ABL, outras vias que desempenham um papel fundamental na hematopoiese são inibidas pelos ITK, como Src, KIT e vias de receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), que contribuem ainda



mais para a mielossupressão [365, 366, 370, 371]. Os resultados obtidos na meta-análise demonstraram que as citopenias foram tipicamente mais frequentes com o uso de dasatinibe em ambas as doses (100 e 140 mg), apesar de 140 mg não ser uma dose usual na prática clínica. Justificável por este fármaco possuir um amplo espectro de inibição de tirosina quinases (baixa especificidade), incluindo Bcr-Abl, c-KIT, receptor de efrina (EphA2), quinases da família Src (como Fyn, Yes, Src e Lyn) e PDGFR quinases, que estão associadas ao desenvolvimento de toxicidades hematológicas [363, 372-376]. Por outro lado, o nilotinibe (ambas as doses) foi menos frequentemente associado a EAS hematológicos, justificados por sua especificidade relativamente alta [373].

Reconhecemos certas limitações em nossas análises. Em primeiro lugar, o número limitado de estudos para alguns medicamentos, incluindo ponatinibe e radotinibe. Em segundo lugar, todos os estudos incluídos foram projetados como abertos devido à gravidade da doença; entretanto como os resultados medidos foram objetivos, nenhum viés adicional foi associado aos resultados do estudo. Não foi possível realizar a análise de subgrupos para os ITK de segunda e terceira linha, apesar das evidências relatando que a toxicidade hematológica ocorre em uma proporção maior de pacientes que utilizam ITK de segunda e terceira linha devido à intolerância ou resistência a ITKs anteriores [364, 368, 377]. Além disso, não foram encontrados estudos que incluíssem pacientes nas fases acelerada e blástica da LMC, que são fases relacionadas à resistência ao tratamento - considerado fator decisivo na seleção terapêutica.

### **13. CONCLUSÃO**

No geral, o nilotinibe parece ser uma alternativa promissora para a terapia de primeira linha em pacientes com LMC, em comparação com os ITKs atualmente disponíveis no mercado internacional, tanto para os desfechos de eficácia (resposta hematológica, citogenética e molecular) quanta para os desfechos de segurança (EAS gerais e hematológicos). Além disso, considerando os desfechos de segurança, as evidências indicam que o dasatinibe é o ITK menos seguro, principalmente por causa de EAS hematológicos.

# CAPÍTULO 3. REVISÃO SISTEMÁTICA DOS ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS

## 14. INTRODUÇÃO

Um dos desafios do uso dos ITK que são a terapia base para LMC é obter a máxima eficácia clínica com respostas mais rápidas e eventos adversos mínimos para o paciente. Sabe-se que os pacientes apresentam grandes variações nas concentrações plasmáticas de fármacos da classe ITK em resposta a doses padrão [378]. Assim, é possível que alguns pacientes recebam doses subterapêuticas ou supratrapêuticas, o que pode comprometer a a eficácia e a segurança do tratamento. Uma estratégia que pode contribuir para alcançar esse equilíbrio é o monitoramento terapêutico de medicamentos (TDM, do inglês, *Therapeutic Drug Monitoring*) e a intervenção na concentração alvo desses medicamentos, visando ajustar a dose de acordo com as necessidades de cada paciente individual [8-10].

Nesse cenário, a análise e o entendimento das propriedades farmacocinéticas dos ITK podem contribuir para a interpretação dos dados de TDM, personalização da terapia medicamentosa, bem como novas propostas de regime de dosagem. O objetivo do presente estudo foi revisar sistematicamente estudos na literatura para abordar os parâmetros farmacocinéticos do bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe em pacientes saudáveis e com LMC.

## **15. OBJETIVO**

### **15.1. Objetivo geral**

Reunir sistematicamente evidências sobre os parâmetros farmacocinéticos dos inibidores de tirosina quinase

### **15.2. Objetivo específico**

- Reunir dados dos parâmetros farmacocinéticos dos inibidores de tirosina quinase bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe;
- Comparar estatisticamente os parâmetros farmacocinéticos  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-\infty}$ ;
- Simular a farmacocinética de cada fármaco por meio do modelo de Monte-Carlo.

## 16. MATERIAL E MÉTODOS

A revisão sistemática foi realizada de acordo com as recomendações do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) [304] e recomendações da *Cochrane Collaboration Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, The Cochrane Collaboration* [303]. Foi estruturada a pergunta da pesquisa utilizando o acrônimo PICO, para a identificação dos estudos.

- P (população): pacientes diagnosticados com LMC ou saudáveis;
- I (intervenção terapêutica): ITK usado no tratamento da LMC (bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe);
- C (comparador / controle): não se aplica;
- O (outcome / desfechos): parâmetros farmacocinéticos;
- S (desenho do estudo): estudos farmacocinéticos.

Após a definição da pergunta, os critérios de inclusão e exclusão de artigos puderam ser definidos. Foram incluídos estudos que atendiam os critérios estabelecidos pelo acrônimo PICO. Estudos em caracteres não romanos foram excluídos. Foi conduzida uma busca sistemática (em fevereiro de 2020) nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. Foram usados na busca os seguintes termos e sinônimos: farmacocinética, bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe, radotinibe e inibidor de tirosina quinase. A estratégia de busca para cada base de dados é apresentada na TABELA 16.

TABELA 16. ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NAS BASES DE DADOS

Base de dados	Estratégia de busca
PubMed	(((((pharmacokinetics[MeSH Terms]) OR pharmacokinetic*[Title/Abstract]) OR bioavailability[Title/Abstract])) AND (((((((((((((((imatinib[Title/Abstract]) OR glivec[Title/Abstract]) OR gleevec[Title/Abstract]) OR dasatinibe [Title/Abstract]) OR sprycel[Title/Abstract]) OR nilotinib[Title/Abstract]) OR tassigna [Title/Abstract]) OR ponatinib[Title/Abstract]) OR iclusig [Title/Abstract]) OR radotinib [Title/Abstract]) OR supect[Title/Abstract]) OR "tyrosine kinase inhibitor" [Title/Abstract]) OR bosutinib[Title/Abstract]) OR bosulif [Title/Abstract]))
Scopus	( TITLE-ABS-KEY ( imatinib OR glivec OR gleevec OR dasatinib OR sprycel OR nilotinib OR tassigna OR bosutinib OR bosulif OR ponatinib OR iclusig OR radotinib OR supect OR "tyrosine kinase inhibitor" ) AND TITLE-ABS-KEY ( pharmacokinetic* OR bioavailability ) )
Web of Science	TOPICOS (imatinib OR glivec OR gleevec OR dasatinib OR sprycel OR nilotinib OR tassigna OR bosutinib OR bosulif OR ponatinib OR iclusig OR radotinib OR supect OR "tyrosine kinase inhibitor") AND (pharmacokinetic* OR bioavailability))

FONTE: O autor (2020)

### 16.1. Triagem, elegibilidade e extração

Todas as etapas da revisão sistemática foram conduzidas por dois revisores. Inicialmente foi feita a etapa de triagem (leitura de título e resumo) e em seguida a etapa de elegibilidade (leitura na íntegra).

Após a fase de elegibilidade, foram extraídas dos artigos que atenderam os critérios de inclusão, as seguintes informações no Excel®: características do estudo (nome dos autores, ano de publicação, país), dados basais do paciente (tamanho da amostra, sexo, peso, raça, faixa etária, se era paciente saudável ou com LMC, e se o paciente estava em jejum ou alimentado durante a administração), dados da medicação (nome do medicamento, regime posológico, se havia combinação com outro medicamento) e parâmetros farmacocinéticos ( $t_{1/2}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $k_{el}$ ,  $Cl/F$  e  $Vd/F$ ).

A definição de cada parâmetro farmacocinético é descrita a seguir:

- $t_{1/2}$ : Tempo necessário para que a concentração plasmática seja reduzida pela metade;

- $AUC_{0-t}$ : Área sob o gráfico das concentrações do medicamento *versus* curva do tempo, do momento da administração do medicamento (tempo “0”) ao tempo “t”;
- $AUC_{0-\infty}$ : Área sob a concentração plasmática *versus* a curva de tempo de zero a t calculado como  $AUC_{0-t}$  mais a quantidade extrapolada do tempo t até o infinito;
- $C_{max}$ : Concentração plasmática máxima registrada;
- $T_{max}$ : Tempo de concentração máxima observada;
- $K_{el}$ : Constante de taxa de eliminação;
- $Cl/F$ : *Clearance* oral;
- $Vd/F$ : Volume oral de distribuição.

## 16.2. Análises estatísticas

### 16.2.1. Meta-análise

Para cada medicamento foram conduzidas meta-análises de braço único para os parâmetros farmacocinéticos  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-\infty}$ . Os valores dos parâmetros foram agrupados por similaridade das características dos pacientes. O grupo de referência na meta-análise foram pacientes saudáveis sem interação medicamentosa.

Para obter tamanhos de efeito combinados, um modelo de efeitos aleatórios foi usado, e os resultados são apresentados como taxas de eventos (média e erro padrão) com intervalo de confiança de 95%.

A heterogeneidade foi avaliada pelos testes estatísticos qui-quadrado e  $I^2$  e foi considerada significativa quando  $p < 0,05$  e alta quando  $I^2 > 75\%$ , respectivamente.

As análises de subgrupos foram feitas para identificar diferenças entre os grupos de variáveis com os diferentes parâmetros usando o teste nulo (bicaudal) e uma análise de modelo de efeito misto. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

Para avaliar o impacto de qualquer estudo individual na heterogeneidade dos dados, foram realizadas análises de sensibilidade com base na remoção

sequencial dos estudos. Todas as análises foram conduzidas usando o software *Comprehensive Meta Analysis v.2*.

### 16.2.2. Simulação de Monte Carlo

Simulações foram realizadas para 5.000 estudos usando ModelRisk vs 6.1.5 com os seguintes parâmetros farmacocinéticos obtidos na revisão sistemática:  $t_{1/2}$ ,  $Cl/F$ ,  $Vd/F$ . Estes parâmetros foram ponderados de acordo com o n amostral de cada estudo. Os valores dos parâmetros foram agrupados por similaridade das características dos pacientes.

Simulações de Monte Carlo foram realizadas para cada condição. Os parâmetros farmacocinéticos foram assumidos para seguir uma distribuição log-normal. A probabilidade de alcance do alvo (PTA, do inglês, *probability of target attainment*) foi definida como a probabilidade de que a concentração alvo de ITK fosse alcançada. As concentrações alvo foram estabelecidas de acordo com informações da literatura. O  $C_{min}$  para bosutinibe é  $63 \text{ ng.mL}^{-1}$  [379], para ponatinibe é  $23 \text{ ng.mL}^{-1}$  [380], para nilotinibe é  $800 \text{ ng.mL}^{-1}$ , e para imatinibe o  $C_{min}$  é  $1000 \text{ ng.mL}^{-1}$  [8].  $C_{min}$  foi calculada pela seguinte equação:

$$C_{min} = \frac{\text{Dose}}{Vd} \cdot \frac{e^{-\frac{Cl}{Vd}\tau}}{1 - e^{-\frac{Cl}{Vd}\tau}}$$

onde  $Cl$  e  $Vd$  são  $Cl/F$  e  $Vd/F$ , respectivamente,  $C_{min}$  é o nível mínimo e  $\tau$  é o intervalo entre as doses.

## **17.RESULTADOS**

### **17.1. Estudos incluídos**

Por meio das buscas em bancos de dados eletrônicos, 2.968 estudos foram incluídos na triagem após a remoção das duplicatas. Após a leitura dos títulos e resumos, 147 estudos foram elegíveis para avaliação, e após a leitura



na íntegra, 49 estudos foram incluídos para extração de dados [381-429]. O número de estudos incluídos em cada etapa é apresentado na FIGURA 14.

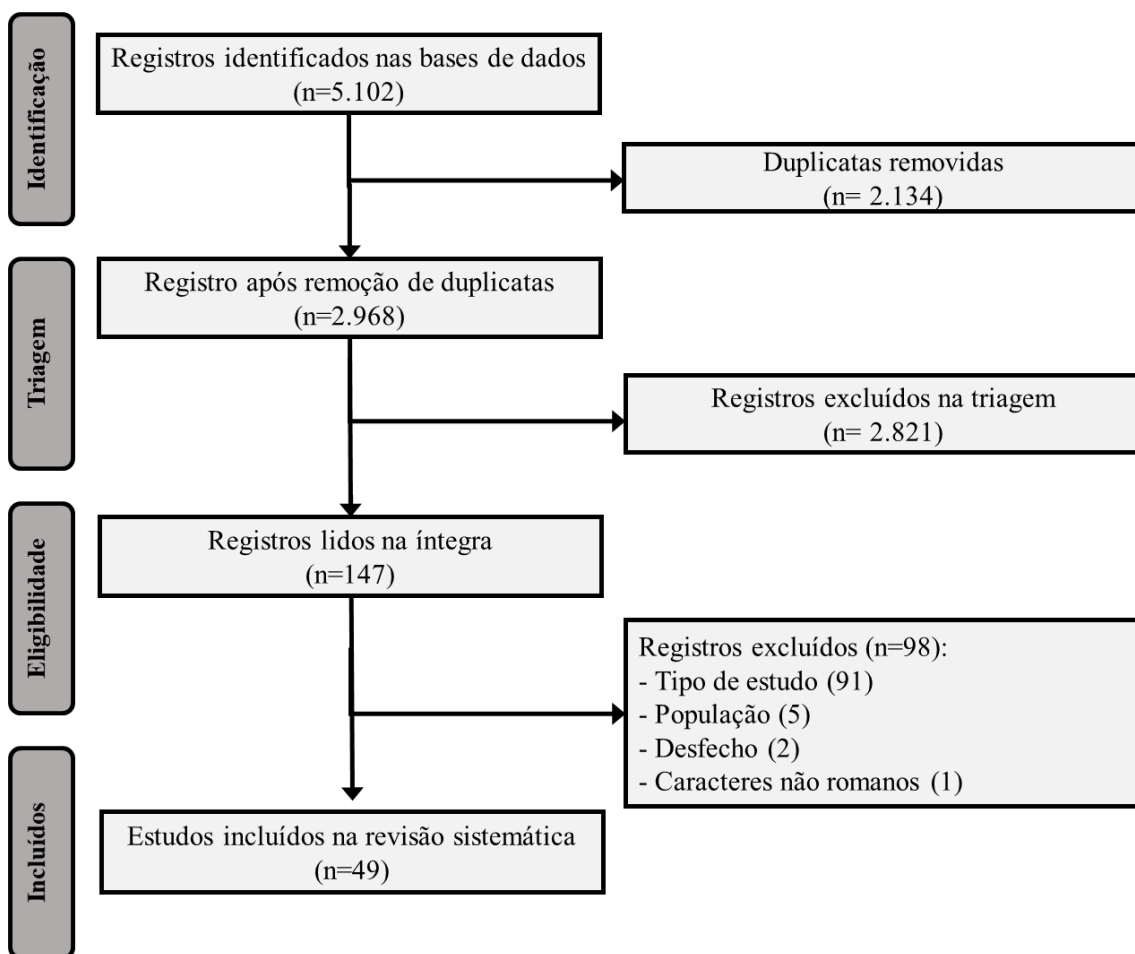


FIGURA 14. FLUXOGRAMA DA REVISÃO SISTEMÁTICA

FONTE: O autor (2020)

Oito estudos foram incluídos para o bosutinibe [422-429] (TABELA 17), 25 para o imatinibe [381-405] (TABELA 18), 11 para o nilotinibe [406-416] (TABELA 19), e cinco para o ponatinibe [417-421] (TABELA 20). Não foram encontrados estudos para dasatinibe e radotinibe.

A maioria dos estudos (n=23) foi realizada nos EUA [385, 387, 388, 400, 403, 406, 408-411, 413, 414, 416, 418-420, 422-425, 427, 428]. Cinco ensaios foram realizados na Coreia [391, 392, 394, 405, 430], quatro na Suíça [384, 386, 396, 399], três no Japão [407, 421, 429] e na Alemanha [393, 401, 412] e dois na China [404, 415].

A maioria dos estudos foram abertos (n=37) [382, 385-388, 391, 392, 394-399, 402-404, 406-422, 427, 429, 430] e do tipo cruzado (*cross-over*) (n=28) [382, 384-388, 390-392, 394, 397-399, 402, 403, 406, 408, 409, 411, 413, 414, 416, 418, 420, 423, 424, 427-429]. A combinação mais comum com um dos ITK foi o cetoconazol [386, 406, 418, 423, 424, 426].

TABELA 17. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA BOSUTINIBE

Referência	País	Medicamento	Paciente	N	Idade -Anos		Peso kg	Alimentado ou jejum	Desenho do estudo
					Média ± DP; Mediana (IQR)	Homens n (%)			
Abbas, 2013 (a) [422]	EUA	BOS 200 mg	Saudável	12 (9)	52 ± 6	6 (50)	NR	Alimentado	Estudo aberto, dose única, grupo paralelo
			Child-Pugh A	6	53 ± 7	4 (67)		Alimentado	
			Child-Pugh B	6	56 ± 9	5 (83)		Alimentado	
			Child-Pugh C	6	51 ± 8	3 (50)		Alimentado	
Abbas, 2013 (b) [427]	EUA	BOS 400 mg	Saudável	24	46 (18-49)	24 (100)	78,5	Jejum	Estudo de fase I, aberto
		BOS 400 mg + Lanzoprazol 60 mg		24 (23)					
Abbas, 2012 (a) [426]	Holanda	BOS 100 mg + Cetoconazol 400 mg	Saudável	6	32,0 ± 10,7	48 (100)	79,5 ± 9,7	Alimentado	Estudo duplo-cego, fase I, randomizado, grupo-sequencial
		BOS 200 mg + Cetoconazol 400 mg		6					
		BOS 300 mg + Cetoconazol 400 mg		6					
		BOS 500 mg + Cetoconazol 400 mg		6					
		BOS 500 mg + Cetoconazol 400 mg		6					
		BOS 600 mg + Cetoconazol 400 mg		6					
Cetoconazol 400 mg	12								
Abbas, 2012 (b) [425]	EUA	BOS 200 mg	Saudável	6	33,7±10,9	5 (83)	79,1 ± 3,7	Jejum	Estudo duplo-cego, fase I, randomizado, grupo-sequencial
		BOS 200 mg		6	35,0 ± 11,4	5 (83)	76 ± 5,5	Alimentado	
		BOS 400 mg		12	NR	5 (42)	78,5 ± 5,5	Jejum	
		BOS 400 mg		6	25,8 ± 11,2	6 (100)	80,1 ± 8,1	Alimentado	
		BOS 600 mg		6	28,5 ± 9,4	5 (83)	76,1 ± 4,8	Jejum	
		BOS 600 mg		5	29,6 ± 13,5	4 (80)	73,7± 13,7	Jejum	
Placebo	14	31,7 ± 9,4	11 (78)	78,6± 15,6	NR				
Abbas, 2011 (a) [424]	EUA	BOS 100 mg	Saudável	24	35 ± 8	24 (100)	78,9 ± 10,6	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		BOS + Cetoconazol 400 mg							
Abbas, 2011 (b) [423]	EUA	BOS 500 mg + placebo	Saudável	60 (56)	28,5 (18-50)	60 (100)	82,9	NR	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e duplo- cego
		BOS 100 mg + Cetoconazol 400 mg		60 (54)					
Hsyu, 2016 [428]	EUA	BOS 400 mg	Saudável	20	35,4 (19-55)	12 (60)	76,5 ± 10,8	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e duplo- cego
		BOS 400 mg + Aprepitanto 125 mg							
Nakaseko, 2015 [429]	Japão	BOS 400 mg	LMC – Fase crônica/ acelerada	7	41 (31-59)	4 (57)	NR	NR	Estudo <i>crossover</i> , aberto, fase I/II
		BOS 500 mg		7	62 (20-73)	5 (71)			
		BOS 600 mg		3	60 (24-69)	1 (33)			

Nota: EUA, Estados Unidos da América; BOS, bosutinibe; IQR, intervalo interquartil; DP, desvio padrão; NR, não reportado; FONTE: O autor (2020)

TABELA 18. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA IMATINIBE

Referência	País	Medicamento	Paciente	N	Idade -Anos Média ± DP; Mediana (IQR)	Homens n (%)	Peso kg	Alimentado ou jejum	Desenho do estudo
Adeagbo, 2015 [381]	Nigéria	IMA 400 mg	Saudável	3	NR	NR	NR	NR	Método bioanalítico
Arora, 2015 [382]	Índia	IMA 400 mg (formulação teste) IMA 400 mg (referência)	LMC	42 (40)	41,3 (20-67)	34 (81)	58,2 ± 8,5	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Boddy, 2007 [383]	Reino Unido	IMA 400 mg	LMC	6 (5)	35-54	3 (50)	NR	NR	Método bioanalítico
Bolton, 2004 [384]	Suíça	IMA 400 mg IMA 400 mg + rifampicina 600 mg	Saudável	14	49,8 ± 8,2	13 (93)	74,4 ± 8,1	Alimentado	Estudo <i>crossover</i>
Smith, 2004 [385]	EUA	IMA 400 mg IMA 400 mg + Erva São João 300mg	Saudável	10	Homem: 44±6 Mulher: 33 ± 6	7 (70)	80,5 ± 6	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> e aberto
Dutreix, 2004 [386]	Suíça	IMA 200 mg IMA 200 mg + Cetoconazol 400 mg	Saudável	14	35-59	13 (93)	NR	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Egorin, 2009 [387]	EUA	IMA 400 mg IMA 400 mg + omeprazol 50 mg	Saudável	12	NR	6 (50)	NR	NR	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Fyre, 2004 [388]	EUA	IMA 400 mg IMA 400 mg + Erva São João 300mg	Saudável	12	28,3 ± 11,9	6 (50)	NR	NR	Estudo <i>crossover</i> e aberto
Passerini, 2003 [389]	Itália	IMA 400 mg IMA 600 mg IMA 400 mg + clindamicina 2,7 g	LMC	8 5 5	NR	NR	NR	Alimentado	NR
Jawhari, 2011 [390]	Canadá	IMA 400 mg (formulação teste) IMA 400 mg (referência)	Saudável	22 (21)	39 ± 11	22 (100)	78,7 ± 9,4	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e cego
Jung, 2014 [391]	Coreia	IMA 200 mg (formulação teste) IMA 200 mg (referência)	Saudável	28 (23)	29 ± 7	28 (100)	69,5 ± 8,1	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Kim, 2013 [392]	Coreia	IMA 400 mg (formulação teste) IMA 400 mg (referência)	Saudável	30 (28)	24,9 ± 2	30 (100)	69,9 ± 2	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Coutre, 2004 [393]	Alemanha	IMA 400 mg IMA 600 mg	LMC – Fase crônica LMC – fase acelerada e blástica	32 (6) 32 (6)	24,9 ± 2	NR	NR	NR	NR
Lee, 2015 [394]	Coreia	IMA 400 mg (formulação teste) IMA 400 mg (referência)	Saudável	36 (35)	24,5 ± 1,7	36 (100)	72,3 ± 8,5	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto

Nota: EUA, Estados Unidos da América; IMA, imatinibe; IQR, intervalo interquartil; DP, desvio padrão; NR, não reportado; FONTE: O autor (2020)

**Conclusão:** TABELA 18. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA IMATINIBE

Referência	País	Medicamento	Paciente	N	Idade -Anos Média ± DP; Mediana (IQR)	Homens n (%)	Peso kg	Alimentad o ou jejum	Desenho do estudo
Mohajeri, 2015 [395]	Irã	IMA 4 x 100 mg cápsula	LMC	12	43 ± 10	19 (53)	69,2 ± 8,2	Jejum	Estudo <i>crossover</i> e randomizado
		IMA 4 x 100 mg comprimido		12					
		IMA 400 mg comprimido		12					
Nikolova, 2004 [396]	Suíça	IMA 4 x 100 mg cápsula	Saudável	33	38,3 ± 11,8	27 (82)	75,7 ± 10,7	Jejum	Estudo <i>crossover</i> e randomizado
		IMA 4 x 100 mg comprimido							
		IMA 400 mg comprimido							
Ostrowicz, 2014 [397]	Polônia	IMA 100 mg comprimido revestido	Saudável	43 (37)	32,1 ± 9,9	39 (91)	74,2 ± 8,1	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		IMA 100 mg (referência)		43 (37)	32,4 ± 9,8	39 (91)			
		IMA 400 mg comprimido revestido		42 (37)	33,9 ± 11,8	38 (90)	75,6 ± 7,3		
		IMA 400 mg (referência)		42 (37)	34,1 ± 11,6	38 (90)			
Campiglia, 2009 [398]	Uruguai	IMA 400 mg (formulação teste)	Saudável	31 (30)	27,8 ± 6,5	30 (97)	71,2 ± 9,8	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		IMA 400 mg (referência)							
Peng, 2004 (a) [399]	Suíça	IMA 400 mg (cápsula)	Saudável	17 (12)	40-58	14 (82)	73,3 ± 7	Alimentado	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		IMA 400 mg (solução oral)							
		IMA 400 mg (I.V. infusão)							
Peng, 2004 (b) [400]	EUA	IMA 25 mg	LMC- fase crônica e acelerada	64 (61)	Crônica:54 ± 13 Aguda:51±14	42 (66)	NR	NR	Fase 1
		IMA 50 mg							
		IMA 85 mg							
		IMA 140 mg							
		IMA 200 mg							
		IMA 250 mg							
		IMA 300 mg							
		IMA 350 mg							
		IMA 400 mg							
		IMA 500 mg							
		IMA 600 mg							
IMA 750 mg									
IMA 800 mg (2x 400 mg)									
IMA 1000 mg (2x 500 mg)									
Schleyer, 2004 [401]	Alemanha	IMA 400 mg	LMC	6	NR	NR	NR	NR	NR
		IMA 600 mg							
Smirnov, 2013 [402]	Rússia	IMA 400 mg (Genfatinitib®)	Saudável	24	29,5 (18-55)	24 (100)	NR	NR	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		IMA 400 mg (Gleevec®)							
Tawbi, 2014 [403]	EUA	IMA 400 mg IMA 400 mg +4g carbon. de cálcio	Saudável	12 (11)	>18	6 (50)	NR	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Wang, 2008 [404]	China	IMA 400 mg + metoprolol 100 mg	LMC	20	40,5 ± 11	16 (80)	72,1 ±12,1	Jejum	Estudo aberto
Yang, 2013 [405]	Coreia	IMA 200 mg	Saudável	27	NR	NR	NR	Jejum	Método bioanalítico

Nota: EUA, Estados Unidos da América; IMA, imatinibe; IQR, intervalo interquartil; DP, desvio padrão; NR, não reportado; FONTE: O autor (2020)

TABELA 19. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA NILOTINIBE

Referência	País	Medicamento	Paciente	N	Idade -Anos		Homens n (%)	Peso kg	Alimentado ou jejum	Desenho do estudo
					Média ± DP; Mediana (IQR)					
Tanaka, 2011 [406]	EUA	NILO 200 mg	Saudável	26 (25)	39,1 ± 11	22 (85)	76,8 ± 11,7	Jejum	Estudo <i>crossover</i> e aberto	
		NILO 200 mg + Cetoconazol 400 mg		15						32,1 ± 7,9
Tawbi, 2014 [416]	EUA	NILO 400 mg NILO 400 mg + Carbonato de cálcio	Saudável	12 (11)	NR	6 (50)	NR	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto	
Tojo, 2009 [407]	Japão	NILO 400 mg	LMC- fase crônica	16 (15)	57 (30-83)	9 (56)	61	Jejum	Estudo de fase I/II, aberto	
			LMC fase acelerada	7	61 (30-74)	5 (71)	65			
			LMC- fase blástica	4	53 (29-70)	2 (50)	63			
Xia, 2012 [408]	EUA	NILO 200 mg NILO 400 mg	Saudável	25	NR	NR	NR	Jejum	Estudo pré- farmacocinético	
				15						
Yin, 2013 [409]	EUA	NILO 400 mg + Famotadina 20 mg NILO 400 mg + Suspensão antiácida NILO 400 mg + Suspensão antiácida	Saudável	52 (45)	40 ± 11	45 (87)	80 ± 11,3	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto	
				52 (46)						
				52 (43)						
				52 (44)						
Yin, 2011 [413]	EUA	NILO 400 mg NILO 400 mg + colher de chá de iogurte natural desnatado NILO 400 mg + colher de chá de purê de maçã	Saudável	48 (46)	46 ± 11	42 (88)	75,8 ± 8	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto	
				48 (46)						
				48 (47)						
Yin, 2010 (a) [412]	Alemanha	NILO 400 mg NILO 400 mg + esomeprazol 40 mg	Saudável	22 22 (15)	44,9 ± 13,9	16 (73)	73,9 ± 7,9	Jejum	Estudo aberto	
Yin, 2010 (b) [411]	EUA	NILO 400 mg NILO 400 mg + suco de toranja	Saudável	21	36,8 ± 8	21 (100)	82,8 ± 12,3	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto	
Yin, 2009 [410]	EUA	NILO 200 mg	Dano hepático leve	6	56 ± 7	6 (100)	90 ± 9,3	Jejum	Estudo aberto	
			Dano hepático moderada	6	52,3 ± 3,2	6 (100)	90,2 ± 12,5			
			Dano hepático grave	6	57,3 ± 2,2	6 (100)	92,5 ± 10,6			
			Saudável	9	53,8 ± 8,2	9 (100)	88,8 ± 12,4			
Zhang, 2015 [414]	EUA	NILO 600 mg NILO 600 mg + midazolam 4 mg	Saudável	18	39,9 ± 11	15 (83)	73,1 ± 8,6	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto	
Zhou, 2009 [415]	China	NILO 400 mg	LMC	23 (21)	40 (19-67)	18 (78)	68,3	Jejum	Estudo aberto	

Nota: EUA, Estados Unidos da América; NILO, nilotinibe; IQR, intervalo interquartil; DP, desvio padrão; NR, não reportado; FONTE: O autor (2020)

TABELA 20. CARACTERÍSTICA DOS ESTUDOS INCLUÍDOS PARA PONATINIBE

Referência	País	Medicamento	Paciente	N	Idade -Anos Média ± DP; Mediana (IQR)	Homens n (%)	Peso kg	Alimentado ou jejum	Desenho do estudo
Narasimhan, 2015 [420]	EUA	PON 45 mg PON 45 mg + rifampicina 600 mg	Saudável	20 (19)	43 (24-53)	19 (95)	NR	Jejum	Estudo <i>crossover</i> e aberto
Narasimhan, 2014 [419]	EUA	PON 30 mg	Saudável	8	54,6 ± 5,7	6 (75)	NR	Jejum	Estudo aberto
			Child-Pugh A	6	53,3 ± 1,2	4 (67)			
			Child-Pugh B	6	54 ± 6,7	5 (83)			
			Child-Pugh C	4	53,8 ± 7,8	2 (50)			
Narasimhan, 2013 (a) [417]	EUA	PON 45 mg	Saudável	24 (22)	41,3 ± 6,9	23 (95,8)	81 ± 12,9	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
		PON 45 mg + refeição rica em gordura		24 (22)				Alimentado	
		PON 45mg + refeição pobre em gordura		24 (22)				Alimentado	
Narasimhan, 2013 (b) [418]	EUA	PON 45 mg PON 45 mg + Cetoconazol 400 mg	Saudável	22	42 (22-53)	22 (100)	77,5 ± 12,5	Jejum	Estudo <i>crossover</i> , randomizado e aberto
Tojo, 2017 [421]	Japão	PON 15 mg	LMC fase crônica e acelerada	35 (3)	62 (30-77)	20 (57)	57	NR	Estudo de fase I/II, aberto
		PON 30 mg		35 (6)					
		PON 45 mg		35 (6)					

Nota: EUA, Estados Unidos da América; PON, ponatinibe; IQR, intervalo interquartil; DP, desvio padrão; NR, não reportado; FONTE: O autor (2020)

## 17.2. Bosutinibe

### 17.2.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do bosutinibe

Os parâmetros farmacocinéticos do bosutinibe dos oito estudos incluídos [422-429] são apresentados na TABELA 21. Um dos estudos avaliou o uso do fármaco em pacientes com comprometimento hepático [422] e outro em pacientes com LMC [429]. Alguns estudos avaliaram os parâmetros farmacocinéticos de bosutinibe combinados com outros fármacos como cetoconazol [423, 424, 426], lansoprazol [427] e aprepitanto [428]. As doses administradas de bosutinibe foram de 200 [425], 400 [425, 427, 429], 500 [423, 428, 429], 600 [425, 429] e 800 mg [425].

Em geral, os pacientes apresentaram  $C_{max}$  e  $AUC_{0-t}$  variando de acordo com a dose. Em comparação com indivíduos saudáveis, a concentração plasmática máxima e a AUC aumentaram aproximadamente duas vezes em pacientes com insuficiência hepática (TABELA 22) ( $AUC_{0-\infty}$ :  $p = 0,002$ ).

A coadministração com os fármacos cetoconazol e aprepitanto aumentaram significativamente a  $AUC_{0-\infty}$  ( $p < 0,001$  para ambos) (TABELA 22), bem como  $C_{max}$  de bosutinibe.

O  $t_{max}$  em voluntários saudáveis e pacientes com LMC administrando bosutinibe isolado foi de 3 a 6 horas. O  $t_{max}$  mais prolongado foi obtido quando o bosutinibe foi combinado com cetozanól e aprepitanto.

A meia-vida de eliminação de bosutinibe foi descrita entre 22-46 h após administração oral única. A  $t_{1/2}$  aumentou significativamente em pacientes com comprometimento hepático, e em pacientes que tiveram coadministração de bosutinibe com aprepitanto e cetoconazol.

Foi relatado que o Cl/F varia de 237 a 461 L.h<sup>-1</sup> em voluntários saudáveis quando em jejum, e 171 a 281 L.h<sup>-1</sup> quando alimentado. Ele foi reduzido em pacientes com algum nível de lesão hepática (classes A, B e C de Child-Pugh). Ainda, a depuração após administração oral do bosutinibe foi reduzida cerca de 10 vezes em voluntários saudáveis com o uso de cetoconazol. Em pacientes com LMC, o Cl/F estava similar aos voluntários saudáveis.



TABELA 21. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE BOSUTINIBE

Referência	Medicamento	Paciente	N	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	R áreas	C <sub>max</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl/F (L/h)	Vd/F (L)
Abbas, 2013 (a) [422]	BOS 200 mg	Saudável	9	NR	914±334	NR	34±10,5	4 (1-8)	55,0±15,8	244 ±83,6	18400± 5110
		Child-Pugh A	6	NR	1980±450	NR	86,7±45,5	2,5 (0,5-4)	85,7±8,6	105±24,6	13100± 4040
		Child-Pugh B	6	NR	1870±688	NR	68,4±24,2	2 (1-4)	112,5±37,9	128±71,2	18600± 5560
		Child-Pugh C	6	NR	1780±778	NR	58,8±41,4	1,5 (1-3)	111,1±33,7	130±50,5	21700±12500
Abbas, 2013 (b) [427]	BOS 400 mg	Saudável	24	1600± 576	1940±698,4	0,82	70,2±22,5	5 (3-8)	31,05± 4,35	NR	NR
	BOS 400 mg + LAN 60 mg		23	1130±508,5	1470±632,1	0,77	42,9±23,1	6 (3-24)	37,12±9,28	NR	NR
Abbas, 2012 (a) [426]	BOS 100 mg + CET 400 mg	Saudável	6	2740±854	2980±802	0,92	58,4±13,3	5,17 (3,00-6,00)	47,69±5,41	35,7±9,8	2480± 773
	BOS 200 mg + CET 400 mg		6	6390±2110	6830±2120	0,94	120±44,1	7,20 (3,00-12,17)	52,45±32,33	31,8±10,1	2340±1340
	BOS 300 mg + CET 400 mg		6	8430±1880	8600±1860	0,98	189±69,8	6,83 (1,00-12,00)	39,90±5,43	36,4±8,6	2150±851
	BOS 500 mg + CET 400 mg		6	10300±3730	10600±3830	0,97	242±100	6,58 (5,83-8,00)	41,98±4,91	45,6±27,3	2800±1790
	BOS 500 mg + CET 400 mg		6	16400±5310	16800±5510	0,98	372±107	7,33 (5,83-8,00)	38,19±4,81	33,2±13,1	1840±881
	BOS 600 mg + CET 400 mg		6	22200±3630	23000±4020	0,97	426±100	11,0 (6,02-23,93)	41,62±6,91	26,8±5,0	1590±276
Abbas, 2012 (b) [425]	BOS 200 mg	Saudável	6	474±119	NR	NR	17±11	6 (3-36,1)	41,2±3,3	442,9± 101,8	27210±7891
	BOS 200 mg		6	1082±325	NR	NR	43±10	6 (3-8)	39,1±12,9	171,0 ± 41,0	9956±4579
	BOS 400 mg		12	1150±621	NR	NR	62±41	3 (2,1-6)	37,3±10,1	460,8 ± 285,7	24570± 18919
	BOS 400 mg		6	1768±283	NR	NR	88±23	6 (4-6)	32,4±8,4	232,3 ± 37,2	10573± 1797
	BOS 600 mg		6	2960±681	NR	NR	141±48	6 (6-24)	32,6±6,8	213,1 ± 51,1	10121± 3846
	BOS 600 mg		5	4003±1521	NR	NR	216±86	6 (4-8)	33,8±8,1	280,8±261,1	15771± 19083
Abbas, 2011 (a) [424]	BOS 100 mg	Saudável	24	233±104	323±139	0,72	7±3,2	6 (2-8)	46,2±16,2	418,9± 310,0	22565± 6769
	BOS 100 mg+ CET 400 mg		24	1694±677	2631±789	0,64	38,4±20,7	6 (6-36)	69±28,9	43,4±18,7	4144± 1906
Abbas, 2011 (b) [423]	BOS 500 mg + placebo	Saudável	56	2330±816	NR	NR	114±40	5 (1,5-12)	22,27±3,56	NR	NR
	BOS 100 mg + CET 400 mg		54	15200±4408	NR	NR	326±78	8 (3-12,1)	36,60±9,52	NR	NR
Hsyu, 2016 [428]	BOS 500 mg	Saudável	20	2193±1052	2268±1157	0,97	94±52	4,15 (2-8,17)	27,79± 5,22	220,4±112,4	8695± 5390
	BOS 500 mg + Aprepitanto 125 mg		20	4097±1926	4719±1463	0,87	146±86	6,02(1,9-11,9)	25,99± 3,84	105,9±32,8	3935± 1338
Nakaseko, 2015 [429]	BOS 400 mg	LMC	7	NR	2474±483	NR	131±29,7	4,0 (3,97-7,90)	16,82±2,37	167±34,6	4035±879
	BOS 500 mg		7	NR	2720±560	NR	128±23,1	3,95 (3,00-5,98)	16,90±2,47	190±37,8	4570±714
	BOS 600 mg		3	NR	2760±626	NR	155±44,4	3,97 (3,97-4,03)	17,27±3,64	224±45,7	5707±2187

Nota: NR, não reportado; BOS, bosutinibe; CET, cetoconazol; LAN, lanzoprazol; FONTE: O autor (2020)

TABELA 22. META-ANÁLISE DE AUC<sub>0-∞</sub> DO BOSUTINIBE

Variável	n	AUC <sub>0-∞</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>
<b>Pacientes</b>						
Saudável e sem interação	5	2090,739	300,574	1501,625-2411,095	-	92,636
LMC	3	2329,322	129,110	2076,262-2582,372	0,466	0,000
Dano hepático	2	3660,972	420,832	2836,157-4485,788	0,002	0,000
<b>Coadministração com outros fármacos</b>						
Com aprepitanto	1	3775,220	261,689	3262,298-4288,102	<0,001	0,000
Com cetoconazol	7	13238,064	964,113	11348,438-15127,690	<0,001	68,158
Com lansoprazol	1	1470,000	131,802	1211,673-1728,328	0,059	0,000

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; IC, intervalo de confiança; n, número de estudos; azul, p significativo; I<sup>2</sup>, heterogeneidade; FONTE: O autor (2020)

### 17.2.2. Simulação de Monte-Carlo para bosutinibe

Três estudos foram agrupados [422, 425, 427] para atingir os parâmetros ponderados para indivíduos saudáveis em jejum, enquanto quatro estudos [422, 424, 425, 428] eram sobre pacientes saudáveis e alimentados. A interação do cetoconazol foi avaliada em três estudos diferentes [423, 424, 426], totalizando 114 perfis farmacocinéticos. Parâmetros para insuficiência hepática, interação com lansoprazol, ou com aprepitanto e pacientes com LMC foram adquiridos somente de um estudo cada. A TABELA 23 apresenta os parâmetros farmacocinéticos ponderados para bosutinibe.

TABELA 23. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE BOSUTINIBE

Referência	Paciente	N	t <sub>1/2</sub> (h)	DP	Cl/F (L.h <sup>-1</sup> )	SD	Vd/F (L)	SD
Abbas, 2013 (a) [422] Abbas, 2013 (b) [427] Abbas, 2012 (b) [425]	Saudável em jejum	66	38,62	11,09	362,30	235,15	23785,51	11657,55
Abbas, 2013 (a) [422] Abbas, 2012 (b) [425] Abbas, 2011 (b) [423] Hsyu, 2016 [428]	Saudável alimentado	108	28,63	6,96	225,12	113,94	11581,96	7242,44
Abbas, 2013 (a) [422]	Dano hepático	18	103,10	29,70	121,00	52,36	17800,00	8235,80
Abbas, 2011 (b) [423] Abbas, 2011 (a) [424] Abbas, 2012 (a) [426]	Com cetoconazol	114	45,64	16,85	38,29	16,29	2975,43	1499,85
Abbas, 2013 (b) [427]	Com lanzoprazol		37,12	25	330,00	155,10	-	-
Hsyu, 2016 [428]	Com aprepitanto	20	25,99	3,84	105,90	32,83	3935,00	1337,90
Nakaseko, 2015 [429]	LMC	17	16,93	2,63	186,53	37,73	4550,35	1110,58

FONTE: O autor (2020)

A FIGURA 15 mostra seu uso para obter a probabilidade de cumprimento da meta considerando uma C<sub>min</sub> de estado estacionário de 63 ng.mL<sup>-1</sup> [379].

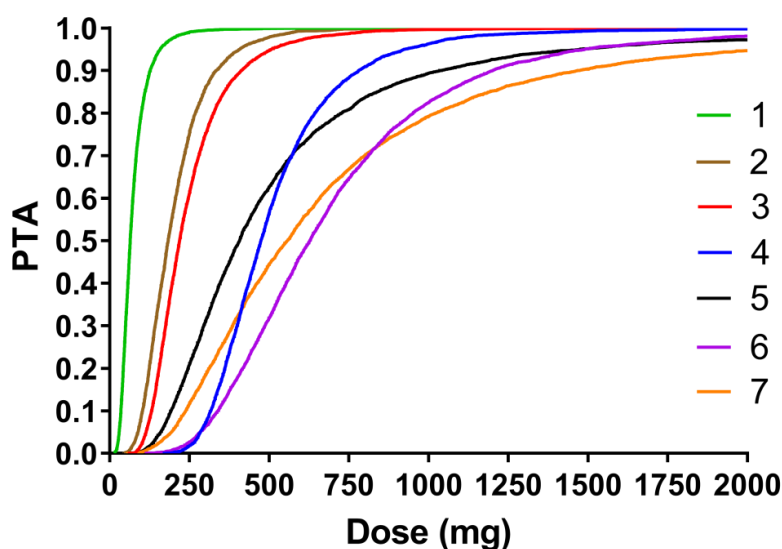


FIGURA 15. A PROBABILIDADE DE ALCANCE DA META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 63 NG.ML<sup>-1</sup>

Nota: 1, saudável com cetoconazol; 2, dano hepático, 3, saudável com aprepitanto, 4, pacientes com LMC; 5, saudável/alimentado; 6, saudável com lanzoprazol; 7, saudável/ jejum

FONTE: O autor (2020)

As doses recomendadas de bosutinibe são 400, 500 ou 600 mg por dia com base na resposta do paciente e toxicidades. Com base nos indivíduos simulados (FIGURA 15), a dose máxima de 600 mg seria suficiente para atingir a meta terapêutica em mais de 70% dos pacientes simulados com LMC e sujeitos saudáveis, se alimentados. Na presença de disfunção hepática, cerca de 240 mg alcançariam PTA semelhante, enquanto a dose diária recomendada de 200 mg pode chegar a quase 60% de PTA. Os inibidores do CYP3A4, aprepitanto e cetoconazol, também reduziram a dose necessária para atingir o PTA de maneira semelhante aos pacientes com LMC sem outros tratamentos. O aprepitanto atingiu mais de 70% do PTA com 300 mg. Com base em três estudos usando cetoconazol (400 mg em dose múltipla) 100 mg de bosutinibe foram suficientes para atingir 63 ng.mL<sup>-1</sup> de C<sub>min</sub> em cerca de 80% dos indivíduos, enquanto 200 mg atingiram PTA superior a 95%.

A interação do lansoprazol atua no sentido inverso, diminuindo a exposição ao BOSU quando administrado concomitantemente. Sugere-se que dose mais alta (600 mg) permite que 50% dos indivíduos atinjam a C<sub>min</sub> desejada. Para aumentar essa probabilidade para 70%, são necessários cerca de 800 mg.

### **17.3. Imatinibe**

#### **17.3.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do imatinibe**

Os parâmetros farmacocinéticos do imatinibe (TABELA 24) foram avaliados em 25 estudos [381-405] e, a partir desses estudos, as seguintes doses foram testadas: 25 [400], 50 [400], 85 [400], 140 [400], 200 [386, 391, 400, 405], 250 [400], 300 [400], 350 [400], 400 [381-385, 387-390, 392-404], 500 [400], 600 [389, 393, 400-402], 750 [400], 800 [400] e 1000 mg [400]. Foi avaliado a coadministração de imatinibe com carbonato de cálcio [403], clindamicina [389], cetoconazol [386], metoprolol [404], omeprazol [387], rifampicina [384] e erva de São João [385, 388]. Foram incluídos estudos com indivíduos saudáveis e com pacientes com LMC [382, 383, 389, 393, 395, 400, 401, 404].

AUC<sub>0-t</sub> e C<sub>max</sub> foi proporcional à dose em pacientes saudáveis, enquanto o T<sub>max</sub> variou de 2-5 a 3,6 h. Rifampicina e a erva de São João diminuíram as

concentrações plasmáticas de imatinibe ( $C_{max}$  e  $AUC_{0-t}$ ) (TABELA 25). Enquanto, a coadministração com cetoconazol aumentou estes parâmetros.

A  $t_{1/2}$  média de imatinibe isolado foi de 9,5 a 20 horas após a administração oral em indivíduos saudáveis e pacientes com LMC, exceto para um valor médio de 24 horas, cujo método de quantificação era espectrometria de massa de acelerador. De acordo com os autores Boddy et al (2007) [383], houve algumas discrepâncias entre as concentrações de imatinibe medidas pelo AMS e o método padrão, considerando apenas o último como semelhante aos valores relatados anteriormente.

A  $t_{1/2}$  média foi menor do que o respectivo grupo de controle de estudo quando o IMA foi combinado com rifampicina ou erva de São João. A  $k_{el}$  média foi relatada entre 0,03 a 0,05  $h^{-1}$ . O  $Cl/F$  varia de 13,8 a 16,3  $L.h^{-1}$  em jejum, aumentando somente quando associado a rifampicina e erva de São João e diminuído quando associado com cetoconazol. A coadministração de imatinibe com omeprazol e carbonato de cálcio não afetou os parâmetros farmacocinéticos deste ITK.

TABELA 24. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IMATINIBE

Referência	Medicamento	Paciente	N	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	R areas	Cmax (ng.mL <sup>-1</sup> )	Tmax (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl/F (L/h)	Vd/F (L)
Adeagbo, 2015 [381]	IMA 400 mg	Saudável	3	16770±2937	NR	NR	1281,8±192,9	3	9,5±0,55	NR	NR
Arora, 2015 [382]	IMA 400 mg (teste)	LMC	40	48977±12453	NR	NR	3101±659	3,25 (1,5-6)	NR	NR	NR
	IMA 400 mg (referência)			49870±15003	NR	NR	3155±791	3,5 (1,5-8)	NR	NR	NR
Boddy, 2007 [383]	IMA 400 mg	LMC-AMS método LMC-LC-MS método	5	13000±2000	26000± 3000	0,50	975±462	4±2	24±6	NR	NR
				15000±6000	27000± 11000	0,56	1328±871	3±1	20±8	NR	NR
Bolton, 2004 [384]	IMA 400 mg + rifampicin 600 mg	Saudável	14	16301± 3475	22992± 5607	0,71	1563±285	2,5 (2-4)	16,7±3,1	18,7±6,0	NR
				5331±1369	5996± 1631	0,89	727±173	2,5 (1-2,5)	8,8±0,7	72,0±21,5	NR
Smith, 2004 [385]	IMA 400 mg + erva de Sãp João 300 mg	Saudável	10	NR	28900 (13400-36700)	NR	1800 (880-2600)	2,5 (1-4)	13,5 (10,8-18,1)	13,8 (10,9-29,8)	NR
			10	NR	19700 (10700-25000)	NR	1280 (920-2000)	2,5 (1-8)	10,7 (9,1-13,5)	20,3 (16,0-37,4)	NR
Dutreix, 2004 [386]	IMA 200 mg + cetoconazol 400 mg	Saudável	14	9618±4191	14228±7359	0,68	942±311	2,5 (1,5-4)	20,5±4,4	16,3±4	NR
			14	13498±5561	19667±8932	0,69	1213±528	4 (2-6)	19,2±4,5	11,6±4	NR
Egorin, 2009 [387]	IMA 400 mg + omeprazol 50 mg	Saudável	12	NR	32100±11100	NR	2040±560	3±0,9	13,4±1,5	14,1±9,5	244±130
			12	NR	33100±9300	NR	2020±650	3,1±1,2	14,1±1,9	15,2±12,6	273±168
Fyre, 2004 [388]	IMA 400 mg + erva de Sãp João 300 mg	Saudável	12	NR	34500±9500	NR	2153±491	3 (2-6)	12,8±3,2	12,5±3,6	NR
			12	NR	24200±7000	NR	1840±489	2 (2-4)	9±2,3	17,9±5,6	NR
Passerini, 2003 [389]	IMA 400 mg	LMC	8	24660± 8500	NR	NR	2352±1050	1,82±0,61	12,5±2,4	NR	NR
			5	99740± 54150	NR	NR	7830±3800	3±1,09	12,5±1,4	NR	NR
Jawhari, 2011 [390]	IMA 400 mg (teste)	Saudável	21	30946,5± 8665	31912,5± 8999,3	0,97	1761± 468	3,67±0,97	14,07±2,33	NR	NR
				31073,6± 7985,9	32270,9± 8519,5	0,96	1779± 459	3,67±1,43	14,18±2,42	NR	NR
Jung, 2014 [391]	IMA 200 mg (teste)	Saudável	27	13084,3± 39,1	14669,3± 5713,5	0,89	922,8±318,8	3,2 (2-6)	14,3±2,2	15,9±7,1	324,5± 143,6
			24	14131,7± 3826,2	14938,9± 3523,7	0,95	986,3±266	2,9 (1,5-4)	14,3±2,3	14,2±3,4	289,8± 84,2
Kim 2013 [392]	IMA 400 mg (teste)	Saudável	28	28485 ± 6274	29079± 6371	0,98	1792±357	3 (1,5-5)	12,74±1,32	14,38±3,03	264,5±
			28	27222 ± 4624	27872± 4751	0,98	1710±312	3 (1-4)	13,10±1,07	14,79±2,73	279,29± 52,18
Coutre, 2004 [393]	IMA 400 mg	LMC	6	37500±9375	NR	NR	2020±646	4,07±1,50	16,6±3,2	NR	NR
			6	85900± 56694	NR	NR	6760±4664	3,84±2,11	16,9±5,9	NR	NR
Lee, 2015 [394]	IMA 400 mg (teste)	Saudável	35	46877± 11995	47987± 12382	0,98	3309±1084	3 (2-6)	13,2±1,5	8,9±2,2	167,6±40
			35	43510± 8909	44482±9027	0,98	3066±906	3 (1-6)	13,1±1,8	9,4±2	177±42,5

Nota: NR, não reportado; IMA, imatinibe; CP, comprimido; FONTE: O autor (2020)

**Conclusão:** TABELA 24. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IMATINIBE

Referência	Medicamento	Paciente	N	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	R areas	Cmax (ng.mL <sup>-1</sup> )	Tmax (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl/F (L/h)	Vd/F (L)
Mohajeri, 2015 [395]	IMA 4 x 100 mg cápsula	LMC	12	19834±8215	27011± 11562	0,73	1548±252	2 (1,5-3,5)	15,7±2,2	17,2±3,7 <sup>a</sup>	382±112 <sup>b</sup>
	IMA 4 x 100 mg CP		12	19003±7563	25811± 10547	0,74	1605±209	2,1 (1,2-3,8)	15,8±2,8	17,1±4,2 <sup>a</sup>	384±105 <sup>b</sup>
	IMA 400 mg CP		12	18452±8235	25699± 11253	0,72	1622±233	2 (0,9-3,9)	15,6±2,2	17,8±5,4 <sup>a</sup>	391±99 <sup>b</sup>
Nikolova, 2004 [396]	IMA 4 x 100 mg cápsula	Saudável	33	26749±12623	27094± 12933	0,99	1748±702	2,5 (2-6)	15,8±2,9	17,1±5,8	383±133
	IMA 4x100mg CP		33	25724±11450	26081± 11757	0,99	1638±604	2,5 (1,5-6)	15,9±3,1	17,3±5,1	387±114
	IMA 400 mg CP		33	25150± 11611	25464± 11846	0,99	1606±647	2,5 (1,5-6)	15,7±2,8	18±5,7	404±144
Ostrowicz, 2014 [397]	IMA 100 mg CP revestido	Saudável	37	6582± 2169	6709± 2244	0,98	427±149	2,9±1,5	17,4±3,2	NR	NR
	IMA 100 mg (referência)		37	6418±2344	6554± 2440	0,98	410±146	3,2±1,5	17,5±3,8	NR	NR
	IMA 400 mg CP revestido		37	24705± 8902	25065± 9005	0,99	1547±579	2,9±1,7	16,4±2,6	NR	NR
	IMA 400 mg (referência)		37	24545± 778	24913± 7957	0,99	1506±459	3,5±1,38	15,9±2,44	NR	NR
Campiglia, 2009 [398]	IMA 400 mg (teste)	Saudável	30	NR	38179± 15504	NR	2472±933	3,28 (1,5-6)	14,2±8,04	NR	NR
	IMA 400 mg (referência)		30	NR	40554± 17027	NR	2566±963	3,63 (1,5-6)	13,02±3,82	NR	NR
Peng, 2004 (a) [399]	IMA 400 mg (cápsula)	Saudável	12	2769±2362	32640±16501	0,08	1822±1193	2,5 (1-6)	17,9±3,1	14,9±7,5	382±194
	IMA 400 mg (solução oral)		12	3317±1466	30729±9573	0,11	1848±805	2 (1,5-4)	18,3±2,7	14,5±5,7	385±167
	IMA 400 mg (I.V. infusão)		12	1617±398	7836±2185	0,21	1206±295	1 (0,5-1)	21,9±4,3	13,9±5 <sup>a</sup>	NR
Peng, 2004 (b) [400]	IMA 25 mg	LMC	3	700±200	1000±200	0,70	72±18	2,2±0,8	13±2	24,8±6,0	461,6±172
	IMA 50 mg		3	1400±300	1900±500	0,74	186±57	1,8±1	10±5	16,5±10,0	377,2±145,9
	IMA 85 mg		3	4300±1600	5800±2600	0,74	444,7±209,2	2±1,4	11,7±3,6	28,3±7,7	261,7±82,7
	IMA 140 mg		3	8900±6900	12300±9100	0,72	889,3±757,7	1,8±1	13,3±1,5	10,9±1,0	306,8±183
	IMA 200 mg		4	11000±3700	21500±16300	0,51	846±197,1	4±3,6	18,9±1,2	16,3±5,2	273,3±66,3
	IMA 250 mg		3	18700±7200	26500±9600	0,71	1381,4±366,3	2,6±1,1	11,6±4,1	9,3±3,1	182,1±93,4
	IMA 300 mg		3	19000±7300	27400±11500	0,69	1640±443	2,6±2,1	13,8±2,3	16,1±10,3	237,2±68
	IMA 350 mg		3	13800±1400	20600±2300	0,67	1190±150	2,5±0,9	14,4±2,1	11,7±1,4	353±36,7
	IMA 400 mg		3	24800±7400	38800±15900	0,64	1907,5±355	3,1±2	14,8±5,8	12,7±6,7	236±76,5
	IMA 500 mg		4	28500±10700	45300±20500	0,63	2056,7±605,4	3,8±2,1	14,7±3,6	18,2±7,8	265,9±88,1
	IMA 600 mg		4	39700±25900	52400±33700	0,76	3395±2408,9	2,9±1,4	10,9±2	10,3±3,0	245,5±152,4
IMA 750 mg	6	34400±13200	45600±21600	0,75	3016±1040	3,7±2,3	10,6±3,4	13,3±3	279,6±127		
Schleyer, 2004 [401]	IMA 400 mg	LMC	6	37500±9375	NR	NR	2020±640	4,07±1,51	16,6±3,2	NR	NR
	IMA 600 mg		6	85900±56694	NR	NR	6760±4660	3,84±1,42	16,9±5,9	NR	NR
Smirnov, 2013 [402]	IMA 400 mg (Genfatinib®)	Saudável	24	75145,3±32388	NR	NR	4600,2±1513	2,9±1,7	NR	NR	NR
	IMA 400 mg (Gleevec®)		24	120872±142984	NR	NR	5562,3± 2342	2,9±1,3	NR	NR	NR
Tawbi, 2014 [403]	IMA 400 mg	Saudável	11	NR	41200±11800	NR	2350±590	2,5±0,7	14,3±3,7	10,5±3,1	179±54
	IMA 400 mg + 4 g carbonato de cálcio		11	NR	40800±9400	NR	2390±620	2,4±1,1	13,4±2,0	10,4±2,9	176±55
Wang, 2008 [404]	IMA 400 mg + metoprolol 100 mg	LMC	20	39041± 12700	NR	NR	4245±1330	2 (0,5-4)	NR	11,3± 3,7	NR
Yang, 2013 [405]	IMA 200 mg	Saudável	27	14131,7± 3826,2	14938,9± 3523,7	0,95	986,3±266,0	2,9±0,7	14,3±2,3	14,2± 3,4	289,8± 84,2

Nota: NR, não reportado; IMA, imatinibe; CP, comprimido; FONTE: O autor (2020)

TABELA 25. META-ANÁLISE DE AUC<sub>0-t</sub> E AUC<sub>0-∞</sub> PARA IMATINIBE

Variável	n	AUC <sub>0-t</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>	N	AUC <sub>0-∞</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>
<b>Pacientes</b>												
Saudável e sem interação	21	25163,151	2658,799	19952,000-30374,301	-	99,872	24	29622,401	358,954	28918-30325,938	-	91,522
LMC	36	26929,404	2370,906	22281,514-31575,293	0,620	99,808	31	29921,559	623,212	28700,086-31343,033	0,511	93,563
<b>Coadministração com outros fármacos</b>												
Com omeprazol	-	-	-	-	-	-	1	33100,000	2684,679	27838,126-38361,126	0,511	0,000
Com cetoconazol	1	26996,000	1486,240	24083,024-29980,976	0,547	0,000	1	39334,000	4774,355	29976,436-48691,564	0,098	0,000
Com carbonato de cálcio	-	-	-	-	-	-	1	40800,000	2834,207	35245,057-46354,943	0,002	0,000
Com clindamicina (LMC)	1	19500,000	2477,563	14644,065-24355,935	0,119	0,000	-	-	-	-	-	-
Com metoprolol (LMC)	1	39041,000	2839,806	33475,082-44606,918	<0,001	0,000	-	-	-	-	-	-
Com rifampicina	1	25163,151	2658,799	19952,000-30.374,301	<0,001	0,000	1	5996,000	435,903	5141,646-6850,354	<0,001	0,000
Com erva de São João	-	-	-	-	-	-	1	24200,000	2020,726	20239,450-28160,550	0,004	0,000

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; IC, intervalo de confiança; n, número de estudos; em azul os valores de p significativo; I<sup>2</sup>, heterogeneidade; FONTE: O autor (2020)



### 17.3.2. Simulação de Monte-Carlo para imatinibe

Dezesseis estudos [381, 384-388, 390, 391, 394, 396-399, 402, 403, 405] foram agrupados para atingir os parâmetros ponderados para saudáveis sem outros tratamentos, e dois [385, 388] foram usados para obter os valores agrupados em interação com a erva de São João.

A TABELA 26 mostra os parâmetros combinados e a FIGURA 16 mostra seu uso para obter a probabilidade de alcance da meta considerando uma concentração mínima de estado estacionário de 1000 ng. mL<sup>-1</sup> [8].

TABELA 26. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE IMATINIBE

Referência	Paciente	N	t <sub>1/2</sub> (h)	DP	CI/F (L.h <sup>-1</sup> )	SD	Vd/F (L)	SD
Adeagbo, 2015 [381], Bolton, 2004 [384], Smith, 2004 [385], Dutreix, 2004 [386], Egorin, 2009 [387], Fyre, 2004 [388], Jawhari, 2011 [390], Jung, 2014 [391], Lee, 2015 [394], Nikolova, 2004 [396], Ostrowicz, 2014 [397], Campiglia, 2009 [398], Peng, 2004 (a) [399], Smirnov, 2013 [402], Tawbi, 2014 [403], Yang, 2013 [405]	Saudável em jejum	677	15,13	3,17	14,18	5,02	295,4	108,28
Bolton, 2004 [384]	Com rifampicina	14	8,8	0,7	72	21,5	-	-
Smith, 2004 [385] Fyre, 2004 [388]	Com erva de São João	22	9,77	2,02	19	5,06	-	-
Dutreix, 2004 [386]	Com cetoconazol	14	19,2	4,5	11,6	4	-	-
Tawbi, 2014 [403]	Com carbonato de cálcio	11	13,4	2	10,4	2,9	176	55
Arora, 2015 [382], Boddy, 2007 [383], Passerini, 2003 [389], Peng, 2004 (b) [400], Coutre, 2004 [393]	LMC	136	15,06	3,71	13,69	5,54	282,02	110,88

FONTE: O autor (2020)

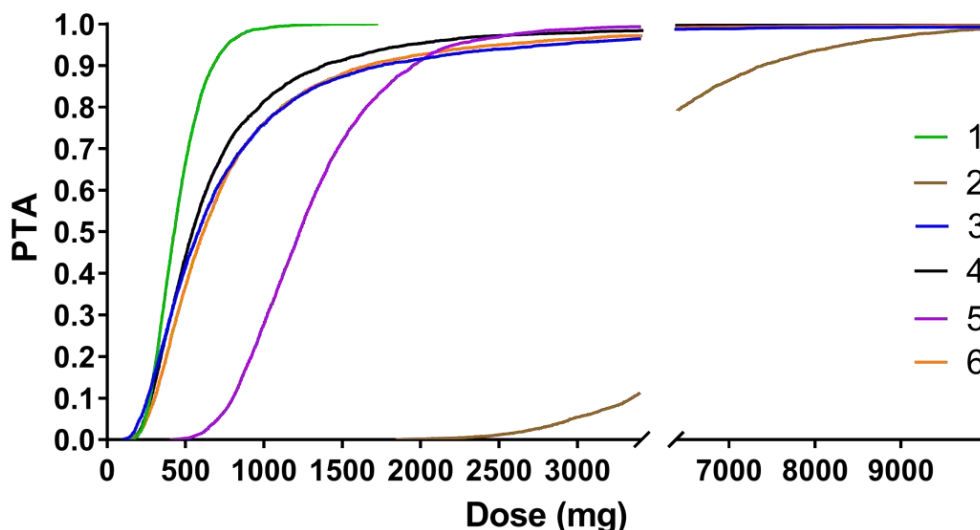


FIGURA 16. A PROBABILIDADE DE ALCANÇAR A META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 1000 NG.ML<sup>-1</sup> PARA IMATINIBE

Nota: 1, saudável com cetoconazol; 2, saudável com rifampicina; 3, paciente LMC, 4, saudável com carbonato de cálcio; 5, saudável com erva de São João; 6- saudável/sem outro tratamento

FONTE: O autor (2020)

A dose comumente usada de imatinibe é de 400 mg, mas pode ser aumentada para 600 mg se a concentração mínima alvo não for atingida. Com base nos dados extraídos neste trabalho, a dose de 400 mg foi suficiente para apenas 30% dos pacientes atingirem a  $C_{min}$  de 1000 ng.mL<sup>-1</sup>. Probabilidade semelhante foi observada para indivíduos saudáveis sem outros tratamentos (25%) e saudáveis com carbonato de cálcio (29%). Quando administrado com erva de São João ou rifampicina, nenhum dos indivíduos atingiu a  $C_{min}$  esperada. Contudo, semelhante ao observado para outros ITK, o cetoconazol aumentou a proporção de indivíduos que apresentaram  $C_{min}$  de 1000 ng.mL<sup>-1</sup>.

Considerando a dose de 600 mg, os pacientes com LMC saudáveis sem outros tratamentos e aqueles que administraram imatinibe junto com carbonato de cálcio apresentaram PTA em torno de 50%. Na presença de cetoconazol os 600 mg são suficientes para 83%, enquanto apenas alguns (1,5%) daqueles em uso de erva de São João atingiram a meta terapêutica.

## 17.4. Nilotinibe

### 17.4.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do nilotinibe

Para o nilotinibe, 11 ensaios foram incluídos [406-416]. Destes, sete estudos avaliaram a coadministração de nilotinibe, sendo eles: suspensão de antiácido [409], carbonato de cálcio [416], esomeprazol [412], famotidina [409], suco de toranja [411], cetoconazol [406], midazolam [414] e rifampicina [406]. As doses relatadas nos estudos foram 200 [387, 408, 410, 413], 400 [406-413, 415, 416] e 600 mg [414]. Houve apenas dois estudos que avaliaram o medicamento no estado estacionário [407, 415]. Os parâmetros farmacocinéticos do nilotinibe são demonstrados na TABELA 27.

Foram incluídos estudos com voluntários saudáveis [406, 408-414, 416], com pacientes com LMC [407, 415] e com pacientes com insuficiência hepática [410]. O CI/F médio de nilotinibe em indivíduos saudáveis foi de 21,7 a 31,2 L.h<sup>-1</sup> na dose de 200 mg, enquanto para 400 mg, um estudo mostrou um valor de 24,9 L.h<sup>-1</sup> e cinco estudos mostraram valores entre 33,4 e 50,5 L.h<sup>-1</sup>, semelhantes ao que foi observado no único estudo na dose de 600 mg, 45,3 L.h<sup>-1</sup>. Os dados gerais sugerem algum nível de dependência da dose no *clearance*, mas nenhum estudo abordou esta questão.

O cetoconazol aumentou a C<sub>max</sub> e AUC (p<0,01, TABELA 28) do nilotinibe em comparação com o nilotinibe sozinho. O *clearance* médio foi inferior a metade, prolongando a t<sub>1/2</sub> em mais de 2 vezes, uma vez que a alteração do volume de distribuição foi leve. Além disso, a rifampicina aumentou o CI/F do nilotinibe em cerca de 4 vezes, mas com menos impacto na meia-vida de eliminação devido a uma grande alteração no volume de distribuição. A farmacocinética do nilotinibe foi modestamente afetada pela insuficiência hepática (valores aumentados de C<sub>max</sub>, AUC<sub>0-t</sub> e AUC<sub>0-∞</sub>), mas deve-se esperar um prolongamento da meia-vida proporcional à insuficiência hepática.

Os resultados indicam que o uso de carbonato de cálcio não afeta significativamente a farmacocinética do nilotinibe. Além disso, nem o antiácido nem a famotidina afetaram significativamente a farmacocinética do nilotinibe.

TABELA 27. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE NILOTINIBE

Referência	Medicamento	Paciente	N	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	R areas	Cmax (ng.mL <sup>-1</sup> )	Tmax (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl/F (L/h)	Vd/F (L)
Tanaka, 2011 [406]	NILO 200 mg NILO 200 mg + cetoconazol 400 mg	Saudável	25	8793±4769	8590±4753	0,98	356±142	4 (2-8)	15,2±9,3	31± 17	586,8± 385,1
				27757±13183	26682±13703	0,96	673±279	4 (2-8)	32,7±17,9	12,3± 13,9	333,5± 219,4
	NILO 400 mg NILO 400 mg + rifampicina 600 mg	Saudável	15	10114±3996	11217±5155	1,11	426±150	3 (2-8)	18,8±10	45,2± 24,6	887,5± 304,5
				2088±801	2010±579	0,96	149±30	4 (2-6)	14,6±6,5	215,9± 68,5	4156,8± 1950,5
Tawbi, 2013 [416]	NILO 400 mg NILO 400 mg + carbonato de cálcio	Saudável	11	NR	18400±7500	NR	670±351	4,3±1,7	18,9±5,9	24,9±9,2	714±275
			11	NR	16900±8200	NR	618±273	5,6±2,5	17,2±9,1	28,7±13,9	739±330
Tojo, 2009 [407]	NILO 400 mg	LMC – Fase crônica	15	7110±1800	NR	NR	942±276	3 (2-7)	NR	NR	NR
		LMC- Fase acelerada	7	7550±3150	NR	NR	1120±614	3 (3-23)	NR	NR	NR
		LMC- Fase blástica	4	8880±2700	NR	NR	1150±458	5,5 (3-7)	NR	NR	NR
Xia, 2012 [408]	NILO 200 mg NILO 400 mg	Saudável	25	NR	8590±4753	NR	356±142	4	15,2±9,3	31±17	587±385
			15	NR	11217±5155	NR	426±150	3	18,8±10	45±24,6	888±305
Yin, 2013 [409]	NILO 400 mg NILO 400 mg + famotadina 20 mg	Saudável	45	10223±3465	11216±4542	0,91	374±157	4 (1,97-10)	28,63±26,80	35,66±18,72	1081,8± 510,6
			46	10194±3843	10767±4964	0,95	363±133	4,02 (1,97-10)	31,94±46,92	39,7±29,81	1116,5±701,2
	NILO 400 mg + suspensão antiácida	Saudável	43	10715±3471	12391±5080	0,86	357±149	3,98 (1-10)	28,81±31,06	32,28±23,98	1094,4±518,7
			44	10841±3458	12355±4843	0,88	354±172	3 (1,97-10)	27,19±18,08	23,38±29,76	1029,1± 1039,4
Yin, 2011 [413]	NILO 400 mg NILO 400 mg + chá de iogurte natural desnatado NILO 400 mg + chá de purê de maçã	Saudável	46	11223±3804	11965±4666	0,94	398±160	4 (2-10)	19,8±11,1	33,4±13	891±367
			46	12559±4157	13655±5434	0,92	525±198	4 (1-10)	21±11,3	29,3±12	815±255
			47	11214±3700	12105±4333	0,93	378±156	3 (2-10,1)	20,6±11,9	33±12	866±319
Yin, 2010 (a) [412]	NILO 400 mg NILO 400 mg + esomeprazol 40 mg	Saudável	22	10280±3462	11515±6140	0,89	397±89,5	4 (2-10)	17,3±10,7	41,6±16,4	876±247
			15	6825±3337	7164±3752	0,95	303±157	5,98 (2-10)	15,9±6,6	72,8±38,7	1551±1001
Yin, 2010 (b) [411]	NILO 400 mg NILO 400 mg + toranja	Saudável	21	11500±6400	11900±6700	0,97	445±189	4 (2-6)	13±4,8	50,5±36,8	804±411
				13600±6600	14000±6800	0,97	678±214	4 (4-5)	11,7±3,1	35,3±16,7	548±185
Yin, 2009 [410]	NILO 200 mg	Insufic. hepática leve	6	13191±3646	13395±3652	0,98	476,8±173,4	4 (3-5)	15,1±5,0	15,8±4,1	351±189
		Insufic.hepática moderada	6	11923±4545	13723±5166	0,87	302±63,5	3,6 (2-4)	21,6±7,8	16,1±5,3	462±96
		Insufic.hepática grave	6	12074±6207	13628±7260	0,89	249,7±119,1	4 (4-8)	32,4±10,7	22,9±22,1	943±670
		Saudável	9	9855±3340	10052±3301	0,98	411±134,2	3 (3-4)	16±9,1	21,7±6,3	502±314
Zhang, 2015 [414]	NILO 600 mg NILO 600 mg + midazolam 4 mg	Saudável	18	NR	14576± 5109	NR	453±204	4	24,6±12,5	45,3±18,3	1490±710
				NR	14512± 6302	NR	511±203	3 (1-12,05)	NR	47,5±29,0	1476±763
Zhou, 2009 [415]	NILO 400 mg	CML	21	NR	5076,3± 3275	NR	637,3±506	3,0 (1,0-12,1)	NR	NR	NR

Nota: NR, não reportado; NILO, nilotinibe; FONTE: O autor (2020)

TABELA 28. META-ANÁLISE DE AUC<sub>0-t</sub> E AUC<sub>0-∞</sub> PARA NILOTINIBE

Variável	n	AUC <sub>0-t</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>	N	AUC <sub>0-∞</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>
<b>Pacientes</b>												
Saudável e sem interação	9	10752,887	361,768	10043,835-11461,938	-	52,703	13	11767,156	533,352	11330,502-13413,365	-	72,192
LMC	3	7327,818	412,260	6519,804-8135,833	<0,001	0,000	3	5076,300	714,664	3675,585-6477,015	<0,001	0,000
Comprometimento hepático	3	12586,846	1055,531	10518,043-14655,649	0,100	0,000	3	27043,871	2248,656	22636,587-31451,156	<0,001	0,000
<b>Coadministração com outros fármacos</b>												
Com antiácido	2	10778,967	371,473	10050,893-11507,042	0,960	0,000	2	12371,934	531,352	11330,502-13412,365	0,422	0,000
Com carbonato de cálcio	-	-	-	-	-	-	1	16900,000	2472,393	12054,199-21745,801	0,042	0,000
Com cetoconazol	1	27757,000	2636,000	22589,359-39924,641	<0,001	0,000	1	26882,000	2740,600	21310,523-32053,477	<0,001	0,000
Com esomeprazol	1	6825,000	861,610	5136,276-8513,724	<0,001	0,000	1	7164,000	968,762	5265,261-9062,739	<0,001	0,000
Com famotidina	1	10194,000	566,640	9083,406-11304,594	0,406	0,000	1	10767,000	731,841	9332,618-12201,382	0,269	0,000
Com midazolam	-	-	-	-	-	-	1	9674,667	1485,396	6763,345-12585,989	0,185	0,000
Com rifampicina	1	2088,000	146,242	1801,371-3570,802	<0,001	0,000	1	2010,00	149,497	1716,991-2303,009	<0,001	0,000
Com suco de toranja	1	13600,000	1440,238	10777,185-16422,815	0,055	0,000	1	14000,000	1483,882	11091,645-16908,355	0,157	0,000

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; IC, intervalo de confiança; n, número de estudos; em azul os valores de p significativo; I<sup>2</sup>, heterogeneidade; FONTE: O autor (2020)

#### 17.4.2. Simulação de Monte-Carlo para nilotinibe

Nove estudos foram agrupados [406, 408, 409, 411-414, 416] para atingir os parâmetros ponderados para indivíduos saudáveis usando nilotinibe como monoterapia, enquanto apenas um estudo estava disponível para todas as outras condições simuladas. Não há estudos disponíveis em pacientes com LMC, pois os trabalhos de Tojo (2009) [407] e Zhou (2009) [415] não publicaram o volume de distribuição, *clearance* ou meia-vida de eliminação.

A TABELA 29 apresenta os parâmetros ponderados e a FIGURA 17 demonstra a probabilidade de alcançar a meta considerando uma concentração mínima de estado estacionário de 800 ng.mL<sup>-1</sup> [10].

TABELA 29. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE NILOTINIBE

Referência	Pacientes	N	t <sub>1/2</sub> (h)	DP	Cl/F (L/h)	DP	Vd/F (L)	DP
Tanaka, 2011 [406], Xia, 2012 [408], Yin, 2013 [409], Yin, 2010 (b) [411], Yin, 2010 (a) [412], Yin, 2011 [413], Zhang, 2015 [414], Tawbi, 2014[416]	Saudável	345	20,1	14,3	35,4	17,9	867,2	370,2
Yin, 2009 [410]	Dano hepático	18	23,0	8,2	18,3	10,5	585,3	405,7
Tanaka, 2011 [406]	Com cetoconazol	25	32,7	3,7	12,3	2,8	333,5	44,8
Tanaka, 2011 [406]	Com rifampicina	15	14,6	1,7	215,9	18,3	4156,8	521,3
Yin, 2013 [409]	com famotidina	46	31,9	7,0	39,7	4,4	1116,5	104,5
Yin, 2013 [409]	Com antiácido antes	43	28,8	4,8	32,3	3,7	1094,4	80,0
Yin, 2013 [409]	Com antiácido depois	44	27,2	2,9	23,4	4,5	1029,1	158,5
Tawbi, 2013 [403]	Com carbonato de cálcio	11	17,2	2,9	28,7	4,4	739,0	104,4
Yin, 2010 (a) [412]	Com esomeprazol	15	15,9	1,8	72,8	10,3	1551,0	267,5
Yin, 2013 [409]	Com toranja	21	11,7	0,7	35,3	3,7	548,0	41,4
Zhang, 2015 [414]	Com midazolam	18	24,6	3,0	47,5	7,0	1476,0	185,1

FONTE: O autor (2020)

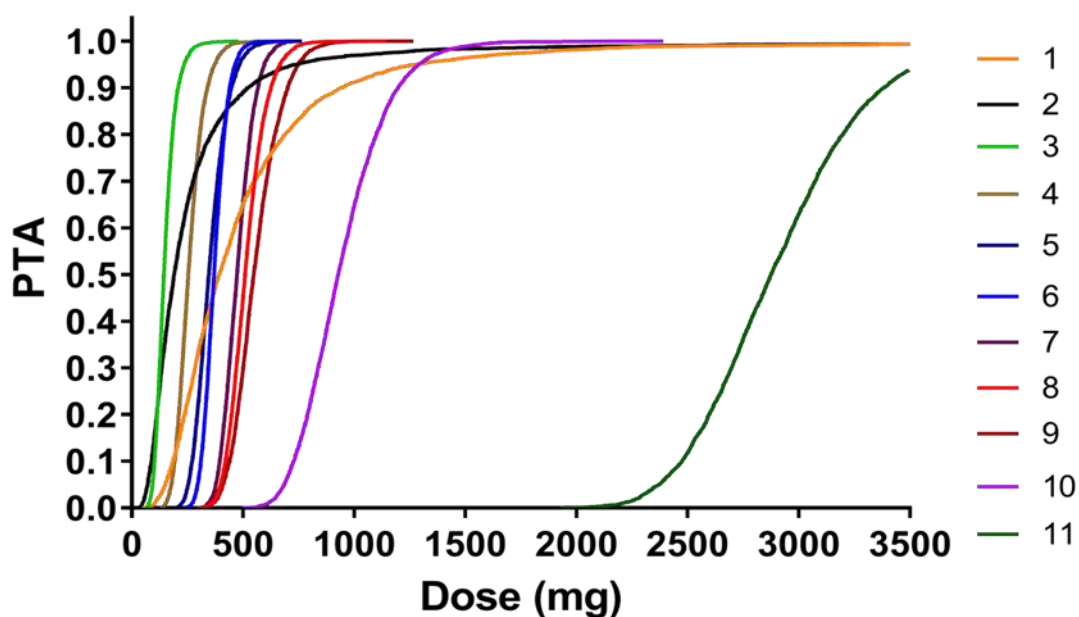


FIGURA 17. PROBABILIDADE DE NILOTINIBE DE ATINGIR A META, QUE FOI CALCULADA COM BASE EM CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS DE 800 NG.ML<sup>-1</sup> COM INTERVALO DE DOSE DE 12 H.

Nota: 1, saudável e nenhum outro tratamento; 2, insuficiência hepática; 3, saudável com cetoconazol; 4 saudável com antiácido depois; 5 saudável com carbonato de cálcio; 6, saudável com antiácido antes; 7, saudável com famotidina; 8, saudável com toranja; 9, saudável com midazolam; 10, saudável com esomeprazol; 11, saudável com rifampicina

FONTE: O autor (2020)

Para pacientes que utilizam nilotinibe como tratamento de primeira linha, em geral a dose é de 300 mg duas vezes ao dia, enquanto a dose de 400 mg duas vezes ao dia é utilizada quando o nilotinibe é o tratamento de segunda linha [24, 103]. A concentração mínima recomendada de nilotinibe é de 800 ng.mL<sup>-1</sup> (considerado como concentração mínima alvo no estudo), embora a concentração mínima alvo caia para 500 ng.mL<sup>-1</sup> para pacientes com os genótipos UGT1A1\*6/\*6, \*6/\*28 ou \*28/\*28 devido a problemas de toxicidade. Como demonstrado pela FIGURA 17, apenas 1/3 dos pacientes estava atingindo a dose de 800 ng.mL<sup>-1</sup> com a dose inicial de 300 mg duas vezes ao dia. Por outro lado, a dose de 400 mg foi suficiente para atingir a meta em metade dos indivíduos simulados, quando nenhum outro tratamento estava presente.

Em pacientes com insuficiência hepática, a dose de 300 mg atingiu  $C_{min}$  em quase 75% dos indivíduos. O uso de antiácido 2 horas após o nilotinibe permitiu que um maior número de pacientes atingisse a concentração mínima desejada, porém, o uso de antiácido antes, o uso de carbonato de cálcio, o uso de famotidina e o uso de esomeprazol reduziram progressivamente o PTA. Considerando a dose de 300 mg, o PTA melhorou para 77% com o antiácido após a administração do nilotinibe, enquanto caiu para cerca de 23 e 6% com o carbonato de cálcio e o antiácido antes, respectivamente. Com famotidina, 400 mg são necessários para atingir o  $C_{min}$  em 12% dos pacientes simulados. Com base nos parâmetros publicados por Yin (2010) [412], uma dose alta ( $\approx 700$  mg) seria necessária para que pelo menos alguns pacientes obtivessem os níveis mínimos de  $800 \text{ ng.mL}^{-1}$  na presença de esomeprazol.

A administração concomitante de toranja e midazolam é considerado uma situação extrema, em que a administração de 400 mg fez com que apenas cerca de 5% dos pacientes atingissem a concentração de  $800 \text{ ng.mL}^{-1}$  como  $C_{min}$ . Como esperado, o cetoconazol, que é um inibidor do CYP, reduz a dose necessária para atingir a concentração alvo, uma vez que 200 mg foram suficientes para quase 90% dos indivíduos simulados. O PTA no uso concomitante de rifampicina mostra o motivo pelo qual sua coadministração deve ser evitada, uma vez que quase 3000 mg foram necessários para atingir a  $C_{min}$  de  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  em metade dos pacientes simulados, porém, devido à limitação da faixa linear e os problemas de farmacocinética do nilotinibe [406], isso não deve acontecer em pacientes reais.

## **17.5. Ponatinibe**

### **17.5.1. Análise dos parâmetros farmacocinéticos do ponatinibe**

Foram incluídos cinco estudos com ponatinibe [417-421], tanto com indivíduos saudáveis [417-420], quanto com pacientes com lesão hepática [419] e pacientes com LMC [421]. A dose usada nos estudos foi de 15 mg [418, 421], 30 mg [419, 421] e 45 mg [417, 420, 421].

Os parâmetros farmacocinéticos são apresentados na TABELA 30. Os parâmetros  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  e  $AUC_{0-t}$  foram relatados em todos os estudos. A  $AUC_{0-t}$  e  $C_{max}$  de PON é dependente da dose. O  $T_{max}$  variou entre 3 e 6 horas. Ao



comparar ponatinibe sozinho com o ponatinibe associado ao cetoconazol, a  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  (valor de  $p < 0,001$  para ambos, TABELA 31) e  $C_{max}$  aumentaram com a combinação [418]. Quando nilotinibe foi associado à rifampicina esses parâmetros diminuíram ( $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-\infty}$ ,  $p < 0,001$ , TABELA 31) [420].

O Cl/F (L/h) aumentou quando o ponatinibe foi associado à rifampicina e diminuiu quando combinado com o cetoconazol. Em pacientes com lesão hepática, o grau de complexidade da doença mostrou-se diretamente relacionado ao aumento de Cl/F. O volume de distribuição aparente médio (Vd/F) foi relatado entre 31,4 a 35,4 L em doses únicas, enquanto este valor foi aumentado em pacientes com doença hepática. A quantidade de lipídios nas refeições não afetou a farmacocinética do ponatinibe em indivíduos saudáveis. Em pacientes com LMC, a depuração foi semelhante à de voluntários saudáveis (TABELA 30).

A meia-vida da ponatinibe variou de 24,2 a 36,4 h em indivíduos saudáveis, porém aumentou quando avaliada em pacientes com danos hepáticos (43,4-47,0 h) e diminuiu quando administrada simultaneamente com rifampicina (19,6 h). Embora o cetoconazol tenha reduzido o nível do *clearance*, a meia-vida mostrou-se similar ao ponatinibe isolado. O estudo em pacientes com LMC não relatou  $t_{1/2}$ , uma vez que a concentração estava disponível apenas até 24 horas, mas um dado interessante que os autores mostraram em pacientes com LMC foram as concentrações mínimas após 28 dias de dose diária. A  $C_{min}$  no estado de equilíbrio foi de  $25,6 \pm 21,1$ ,  $25,8 \pm 73,2$  e  $39,1 \pm 51,8$ , a 15, 30 e 45  $mg \cdot dia^{-1}$ , respectivamente.

TABELA 30. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE PONATINIBE

Referência	Medicamento	Paciente	N	AUC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	AUC <sub>0-inf</sub> (ng.h/mL)	R areas	Cmax (ng.mL <sup>-1</sup> )	Tmax (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	CI/F (L/h)	Vd/F (L)
Narasimhan, 2015 [420]	PONA 45 mg + rifampicina 600 mg	Saudável	19	1242±402	1441±487	0,86	56,4±17,4	6 (5-8)	27±16,2	35,1±13,0	1367,5
			19	507,6±170	540±182	0,93	32,3±8,5	6 (5-6)	19,6±19,6	93,8±35,0	2652,9
Narasimhan, 2014 [419]	PONA 30 mg	Saudável	8	1071±405,6	1214±428,8	0,88	44,7±17,8	5 (5-6)	36,4±8,3	28,3±12,1	1433±520,6
			6	1473±602,6	1541±621,6	0,96	46,1±14,6	6 (5-6)	43,4±7,9	24,5±16,3	1412±625,2
			6	937,6±330,3	1071±321	0,88	27,8±13	5 (2-8)	47±10,3	30,1±8,5	2022±662,6
			4	816,8±297,2	947,2±312,2	0,86	29,3±15,3	3 (1-5)	44,1±5,9	34,8±13	2160±651,1
Narasimhan, 2013 (a) [417]	PONA 45 mg + refeição rica em gordura	Saudável	22	1203±323	1273±360	0,95	54,7±14,3	6 (5-8)	24,2±3,6	35,4	1242±373
			22	1315±361	1392±405	0,94	51,5±13,5	6 (4-12)	23,5±3,8	32,3	1104±318
			22	1175±337	1244±369	0,94	51,6±14,0	5 (5-8)	23,3±3,5	36,2	1278±481
Narasimhan, 2013 (b) [418]	PONA 45 mg + cetozonazol 400 mg	Saudável	22	413,5±148,0	472,2±179,4	0,87	16,1±5,7	6 (2-8)	35,3±4,4	31,8±14,5	1604±818
			22	700,7±241,0	785,3±274,9	0,89	23,6±7,2	6 (5-8)	37,4±5,4	19,1±6,5	1001±335
Tojo, 2017 [421]	PONA 15 mg	LMC	3	316±122	NR	NR	22,8±6,9	4 (4-6,2)	NR	NR	NR
	PONA 30 mg		6	477±148	NR	NR	30,4±8,8	6,8 (3,9-8,1)	NR	NR	NR
	PONA 45 mg		6	1333±439	NR	NR	86,4±23,8	5 (4-6)	NR	NR	NR

Nota: NR, não reportado; PONA, ponatinibe; FONTE: O autor (2020)

TABELA 31. META-ANÁLISE DE AUC<sub>0-t</sub> E AUC<sub>0-∞</sub> PARA PONATINIBE

Variável	n	AUC <sub>0-t</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>	N	AUC <sub>0-∞</sub>	Erro padrão	IC 95%	Valor de p	I <sup>2</sup>
<b>Pacientes</b>												
Saudável e sem interação	5	1230,708	35,341	1161,441-1299,975	-	0,000	5	1330,412	40,136	1251,746-1409,077	-	0,000
LMC	3	979,178	199,693	587,787-1370,568	0,215	79,338	-	-	-	-	-	-
Comprometimento hepático	4	1531,059	165,389	1206,903-1855,215	0,076	47,133	3	2355,900	175,798	2011,343-2700,457	0,015	33,319
<b>Coadministração com outros fármacos</b>												
Com cetozonazol	1	2102,100	154,179	1799,931-2404,269	<0,001	0,000	1	2355,900	175,798	2011,343-2700,457	<0,001	0,000
Com rifampicina	1	507,600	39,128	430,911-584,289	<0,001	0,000	1	540,300	41,772	458,428-622,172	<0,001	0,000

Nota: LMC, leucemia mieloide crônica; IC, intervalo de confiança; n, número de estudos; em azul os valores de p significativo; I<sup>2</sup>, heterogeneidade; FONTE: O autor (2020)

### 17.5.2. Simulação de Monte-Carlo para ponatinibe

Apenas quatro estudos [417-420] foram agrupados para obter os parâmetros de indivíduos saudáveis, em jejum sem outros tratamentos. O estudo de Narasimhan (2014) [419] incluiu três grupos de pacientes com insuficiência hepática. A TABELA 32 apresenta os parâmetros ponderados de ponatinibe e a FIGURA 18 mostra seu uso para obter a PTA considerando uma concentração mínima no estado estacionário de 23 ng.mL<sup>-1</sup>.

TABELA 32. PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE PONATINIBE

Referência	Pacientes	n	t <sub>1/2</sub> (h)	SD	Cl/F (L/h)	SD	Vd/F (L)	SD
Narasimhan, 2015 [420] Narasimhan, 2014 [419] Narasimhan, 2013 (a) [417] Narasimhan, 2013 (b) [418]	Saudável	71	29,76	9,36	33,40	13,22	1424,54	620,49
Narasimhan, 2014 [419]	Com dano hepático	16	44,93	8,53	29,18	13,00	1827,75	645,78
Narasimhan, 2013 (b) [418]	Com cetoconazol	22	37,4	5,50	19,10	6,47	1001,00	335,34
Narasimhan, 2015 [420]	Com rifampicina	19	19,6	19,6	93,80	34,99	2652,93	---
Narasimhan, 2013 (a) [417]	Saudável e alimentado	44	23,40	3,63	34,25	12,60	1191,00	62,87

FONTE: O autor (2020)

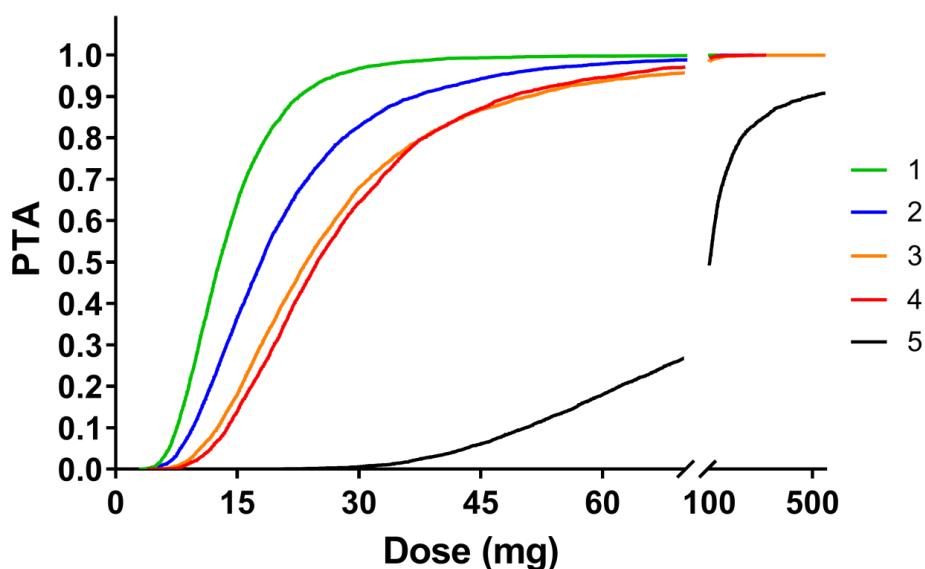


FIGURA 18. A PROBABILIDADE DE ALCANCE DA META FOI CALCULADA COM BASE EM UMA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE 23 NG.ML<sup>-1</sup>

Nota: 1, saudável mais cetoconazol, 2, insuficiência hepática; 3, saudável e nenhum outro tratamento; 4, saudável e alimentado; 5, saudável mais rifampicina

FONTE: O autor (2020)

A dose inicial usual para o ponatinibe é de 45 mg, cuja eficácia foi demonstrada pelo estudo principal de fase II PACE [431] e foi confirmada por outros estudos [432, 433]. No entanto, devido a preocupações de risco aumentado de eventos adversos cardiovasculares, mais atenção tem sido direcionada ao uso de doses mais baixas, como 15 e 30 mg [434]. Além disso, com base na concentração mínima efetiva de ponatinibe ( $23 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) Abumiya (2018) [380] propôs o uso de TDM para apoiar a farmacoterapia, visando a iniciar com uma dose mais baixa (15 mg) e aumentando para 30 mg, ou mesmo 45 mg, somente se os níveis mínimos estivessem abaixo de  $23 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Porém a limitação dessa estratégia é a obtenção da  $C_{\min}$  do paciente atual. Portanto, embora nem todas as situações possíveis pudessem ser avaliadas, todas as três doses proposta foram testadas em nossos indivíduos simulados (FIGURA 18). Indivíduos saudáveis com monoterapia de ponatinibe alcançaram cerca de 65% com 30 mg e quase 90% com 45 mg, sem diferença se alimentados ou não. Como visto anteriormente para outros ITK, a rifampicina aumenta muito a dose necessária para atingir os níveis mínimos em uma porção significativa dos indivíduos. Por outro lado, o cetoconazol o reduz e, na presença de cetoconazol, 15 mg é capaz de atingir a mesma proporção de indivíduos (cerca de 65%) que a dose de 30 mg em indivíduos saudáveis usando ponatinibe sozinho.

Além disso, o comprometimento hepático aumentou a probabilidade de atingir a meta em comparação com indivíduos saudáveis usando apenas o ponatinibe, mas não tanto quanto o cetoconazol. Com base nesta simulação, 45 mg é a única dose capaz de atingir os níveis mínimos alvo, perto de 90%, a menos que haja insuficiência hepática ou combinação com cetoconazol.

## 18. DISCUSSÃO

Pacientes diagnosticados com câncer tendem a ser polimedicados, tanto por receberem tratamento de suporte ou por necessitarem de tratamento para os eventos adversos relacionado ao tratamento antineoplásico. Assim, estes pacientes são suscetíveis a terem interações medicamentosas, que é definido como alguma alteração na resposta farmacológica ou clínica de um paciente ao medicamento devido a coadministração com outro medicamento. Esta interação

pode ser resultante da alteração em uma das seguintes etapas farmacocinéticas: absorção, distribuição, metabolismo e eliminação [435].

Os ITK são fármacos lipofílicos que tendem a ser majoritariamente eliminados a nível hepático e que passam pelo efeito de primeira passagem, sendo metabolizados principalmente através da subfamília das isoenzimas CYP3A. Desta forma, somente uma fração da dose administrada atinge a circulação sanguínea, ou seja, a biodisponibilidade do fármaco administrado é inversamente proporcional à atividade do CYP3A [435-437].

Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo dos ITKs, destaca-se a enzima CYP3A4, que pode apresentar alteração na sua atividade, e conseqüentemente na biodisponibilidade do ITK devido à administração concomitante com fármacos indutores ou inibidores enzimáticos [436]. Nos estudos incluídos na presente revisão sistemática foi avaliada a coadministração dos ITKs com os seguintes indutores enzimáticos: cetoconazol (forte), midazolam (forte), aprepitanto (moderado) e suco de toranja (moderado) [438-440].

A coadministração com cetoconazol leva a um aumento significativo do  $AUC_{0-t}$  e  $AUC_{0-\infty}$  dos ITKs, sendo assim recomendado o ajuste de dose para todos os ITKs avaliados (bosutinibe PTA em 80% com 100 mg, imatinibe: PTA em 83% com 600 mg, nilotinibe: PTA em 90% com 200 mg; ponatinibe: PTA em 65% com 15 mg). Já a coadministração com os inibidores aprepitanto, suco de toranja e midazolam foram reportadas somente para o bosutinibe e nilotinibe, respectivamente. O aprepitanto apresentou interação significativa com o bosutinibe, sendo recomendado um ajuste de dose para 300 mg para alcançar PTA em 70% dos pacientes. Enquanto o suco de toranja e o midazolam, apesar de ambos não terem apresentado resultados significativos na meta-análise, através da simulação de Monte-Carlo, evidenciou-se uma necessidade de ajuste de dose para o nilotinibe (PTA em 5% com 400 mg).

Ainda, metoprolol é um inibidor enzimático de CYP2D6, sendo que tanto o imatinibe, quanto o ponatinibe são metabolizados minoritariamente por esta enzima. Por isso, houve um aumento significativo de  $AUC_{0-t}$  quando metoprolol foi combinado com imatinibe [404].

Com relação aos indutores enzimáticos, erva de São João e rifampicina, houve uma redução nas concentrações plasmáticas dos ITKs ( $C_{max}$  e AUC

reduzido), sendo recomendado um aumento da dose administrada para garantir a efetividade dos fármacos para LMC.

Adicionalmente, como a eliminação dos fármacos é principalmente pelo metabolismo hepático e excreção biliar, e os ITKs apresentam uma alta ligação proteica, pacientes com insuficiência hepática tendem a apresentar maiores níveis séricos destes medicamentos. Portanto, recomenda-se em casos de disfunção moderada ou grave (Child-Pugh B ou C) que os ITKs sejam iniciados em doses menores e que seja realizado o monitoramento terapêutico [437].

Outro aspecto que pode comprometer a concentração plasmática livre dos ITKs é o pH gástrico. Fármacos que tendem a aumentar o pH gástrico como antiácidos, inibidores da bomba de prótons (esomeprazol, lansoprazol e omeprazol) e antagonistas H<sub>2</sub> (famotidina) podem prejudicar a lipossolubilidade destes fármacos. Portanto, é recomendado que o antiácido seja administrado pelo menos 4 horas antes ou 2 horas após a ingestão do medicamento. Os inibidores de bomba de prótons e anti-H<sub>2</sub> devem ser evitados [437, 439, 441].

Uma vez que muitos ITKs são altamente lipofílicos e exibem solubilidade dependente do pH, o impacto do consumo de alimentos na absorção é complexo e dependente de uma série de variáveis, como volume e tempo da refeição, conteúdo calórico, líquido, lipídios e carboidratos. Consistente com essa complexidade, existem relatos sobre o impacto do consumo de alimentos na absorção de ITK. Contudo, apesar de nos estudos incluídos não haver diferença entre resultados de paciente alimentado e não alimentado, é importante reconhecer a complexidade de caracterizar essas variáveis mesmo em condições controladas [437, 439, 441].

Como a concentração plasmática adequada pode afetar a eficácia e segurança do medicamento e muitos pacientes não conseguem alcançar uma exposição adequada, recomenda-se a realização do TDM, que permite corrigir e monitorar a exposição sistêmica de um paciente [404]

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que em alguns casos é necessário o ajuste de dose para garantir a exposição ideal ao medicamento e, portanto, a eficácia e segurança do medicamento em cada paciente. Ou ainda, algumas combinações podem ser contraindicadas [436, 439].

Nosso estudo não é isento de certas limitações. Destacam-se como limitações o número limitado de estudos para alguns medicamentos e a heterogeneidade entre os desenhos de estudo e as populações incluídas.

## **19. CONCLUSÃO**

O presente estudo evidenciou a existência de possíveis interações entre ITK e outros fármacos ou alimentos e avaliou os casos em que há necessidade do ajuste, monitoramento terapêutico ou contraindicação para o uso concomitante.

Destaca-se que as combinações dos ITKs com os inibidores enzimáticos (cetoconazol, midazolam, aprepitanto, metoprolol e suco de toranja), inibidores de bomba de prótons (esomeprazol, lansoprazol, omeprazol), antiácidos, antagonistas H2 (famotidina) e os indutores enzimáticos, erva de São João e rifampicina, devem ser consideradas com cautela, sendo recomendado em alguns casos a redução ou o aumento da dose.. O monitoramento terapêutico de paciente em uso de ITK e com insuficiência hepática é essencial para manutenção da eficácia e segurança do tratamento

# CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO



## 20. INTRODUÇÃO

O monitoramento terapêutico tornou-se uma ferramenta fundamental para o manejo de pacientes com LMC. Este possibilita correlacionar a dose administrada com a concentração plasmática do medicamento, baseando-se tanto nos princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos, quanto na otimização do tratamento e na individualização posológica [442].

A mensuração das concentrações plasmáticas dos ITKs pode ser útil para avaliar a adesão do paciente à terapia oral diária, para avaliar potenciais interações medicamentosas, eficácia do tratamento e eventos adversos graves relacionados ao medicamento. Ainda, é importante destacar, que concentrações subterapêuticas e tratamento sequencial com múltiplos ITKs podem promover a seleção de mutações no domínio da quinase BCR-ABL em pacientes com LMC [441].

Considerando a importância do monitoramento terapêutico, vários métodos bioanalíticos são descritos na literatura para a quantificação desses fármacos antileucêmicos em matrizes biológicas, utilizando principalmente a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial [443-452]. Com o avanço tecnológico, novas técnicas analíticas se destacam. Dentre elas, temos a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS), como o quadrupolo-tempo de voo (QTOF). Esta técnica permite associar as vantagens do UPLC, como o aumento na resolução e na detectabilidade, e a redução do tempo das análises com as vantagens do espectrômetro de massas de alta resolução, que fornece informações sobre a estrutura molecular com a precisão e exatidão necessária aos métodos bioanalíticos.

Além disso, abordagens quimiométricas podem complementar as práticas cromatográficas, visto que um grande número de variáveis pode ser controlado simultaneamente para alcançar resultados adequados por meio de ensaios experimentais limitado [453].

Considerando a importância de métodos bioanalíticos para monitorar os ITKs em plasma humano, a vantagem da UPLC-HRMS e a utilidade das abordagens quimiométricas, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver

e validar um método através de *Analytical Quality-by-Design* utilizando a técnica UPLC-HRMS para quantificar simultaneamente bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe em plasma humano.

## 21. OBJETIVO

### 21.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método bioanalítico através de *Analytical Quality-by-Design* utilizando a técnica UPLC-HRMS para a quantificação simultânea de bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe em plasma humano.

### 21.2. Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros espectrométricos;
- Selecionar os parâmetros cromatográficos através da técnica de *Quality-by-Design*;
- Realizar um planejamento experimental de misturas do tipo Centróide-Simplex para otimizar o método de extração dos analitos;
- Validar o método bioanalítico desenvolvido de acordo com as normas vigentes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e pela *Food and Drug Administration*.

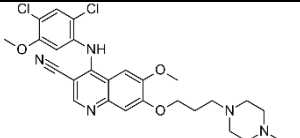
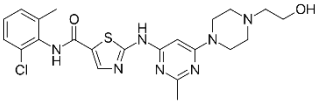
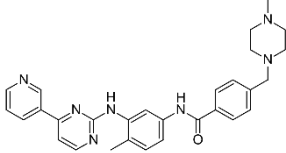
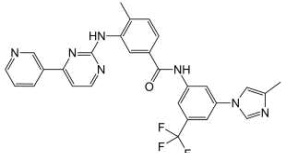
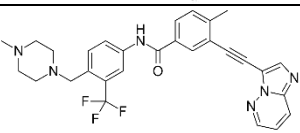
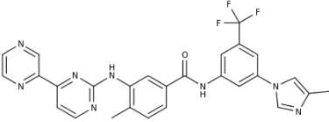
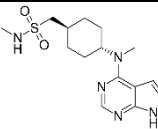
## **22. MATERIAL E MÉTODOS**

### **22.1. Padrões analíticos**

Os padrões analíticos de bosutinibe, dasatinibe, mesilato de imatinibe, nilotinibe foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA), todos com pureza superior a 98%. Já os padrões de ponatinibe, radotinibe e oclacitinibe foram obtidos pela Apexbio (Hsinchu, Taiwan), todos com pureza superior a 99%.

O oclacitinibe foi selecionado como padrão interno (PI) por este ser um ITK que não é usado para o tratamento em humanos. As estruturas químicas e algumas informações dos analitos são apresentados na TABELA 33.

TABELA 33. ESTRUTURA QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANALITOS E PADRÃO INTERNO

Fármaco	Fórmula molecular	Estrutura	[M] / [M+H] <sup>+</sup>	Log P	pKa
<b>Bosutinibe</b>	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>		[M]: 529,1647 [M+H] <sup>+</sup> : 530,1725	4.09	Fort. ác: 15.48 Fort. Bás: 8.43
<b>Dasatinibe</b>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S		[M]: 487,1557 [M+H] <sup>+</sup> : 488,1635	2.77/3.82	Fort. ác: 8.49 Fort. Bás: 7.22
<b>Imatinibe</b>	C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O		[M]: 493,2590 [M+H] <sup>+</sup> : 494,2668	3.47	Fort. ác: 12.45 Fort. Bás: 8.27
<b>Nilotinibe</b>	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> N <sub>7</sub> O		[M]: 529,1838 [M+H] <sup>+</sup> : 530,1916	4.51	Fort. ác: 12.38 Fort. Bás: 5.92
<b>Ponatinibe</b>	C <sub>29</sub> H <sub>27</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O		[M]: 532,2198 [M+H] <sup>+</sup> : 533,2276	3.94/4.97	Fort. ác: 11.36 Fort. Bás: 8.03
<b>Radotinibe</b>	C <sub>27</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>8</sub> O		[M]: 530,1790 [M+H] <sup>+</sup> : 531,1868	3.77/4.53	Fort. ác: 12.22 Fort. Bás: 6.29
<b>Oclacitinibe (PI)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S		[M]: 337,1572 [M+H] <sup>+</sup> : 338,1650	1.7	Fort. ác: 11.59 Fort. Bás: 6.74

Nota: log P, coeficiente de partição; FONTE: O autor (2020)

## 22.2. Solventes e reagentes

Tanto para o desenvolvimento quanto para a validação do método foram usados os seguintes solventes e sais: acetonitrila da marca J.T. Baker (New Jersey, EUA), ácido fórmico e formiato de amônio, ambos da Sigma Aldrich (Missouri, USA) e metanol da J.T. Baker (New Jersey, EUA). Água ultrapura foi adquirida por meio de um sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA).

## 22.3. Preparo da solução estoque

Para o preparo dessa solução, todas as substâncias foram pesadas em balança analítica. Em seguida essas foram dissolvidas em metanol, em ordem a obter soluções de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dos analitos e padrão interno, e foram mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos. Todas as soluções foram armazenadas em freezer a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante todo o processo analítico de desenvolvimento e validação do método.

## 22.4. Preparo da solução de trabalho

Para o preparo das amostras usadas no desenvolvimento e validação do método, foram elaboradas soluções de trabalho nas concentrações de  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para isso foi realizada diluição seriada da solução mãe, diluindo em acetonitrila: água, 70:30, v/v. A escolha do diluente foi de acordo com a fase móvel do método analítico.

## 22.5. Otimização dos parâmetros espectrométricos

Para o desenvolvimento deste método, foi utilizado o espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA) com fonte de ionização *Electrospray* (ESI). O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás do cone e de dessolvatação foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza  $>99,998\%$  da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil).

De acordo com a intensidade dos analitos e do PI foram otimizados os seguintes parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar e do cone, *source offset*, temperatura da fonte de ionização e de dessolvatação, fluxo do gás do cone e do gás de dessolvatação.

Para garantir a exatidão de massas, durante a corrida analítica, as massas adquiridas foram corrigidas por meio do Lockspray, composto por leucina encefalina na concentração de 1 ng.mL<sup>-1</sup> e com fluxo de 10 µL.min<sup>-1</sup>.

Durante todo o desenvolvimento do método foi realizado diariamente a checagem da calibração, utilizando como calibrante formiato de sódio 0,05 mmol.L<sup>-1</sup> produzido a partir de hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os dados obtidos foram processados por meio dos softwares MassLynx V 4.1 e Quanlynx da Waters Corporation (Milford, EUA), sendo adquiridos os dados no modo centroide e *sensitivity*.

## **22.6. Analytical Quality by design (AQbD)**

Considerando que ao desenvolver o método bioanalítico por tentativa e erro há uma compreensão limitada das capacidades e robustez do método, o nosso método foi elaborado com o auxílio da ferramenta *Analytical Quality-by-Design*. Para isso, utilizamos como base a diretriz da ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) [454].

### 22.6.1. Definindo o ATP e CQA

Para o desenvolvimento de método com base no *Analytical Quality by Design (AQbD)*, inicialmente foi definido o Perfil Analítico Alvo (ATP, do inglês *Analytical Target Profile*). Este identifica quais os parâmetros que são necessários para alcançar a qualidade desejada do produto, *i.e.*, que seja capaz de quantificar os ITKs com confiabilidade, sem a interferência de matriz e com ausência de supressão de sinal. Na TABELA 34 são apresentados os elementos ATP para a obtenção de método eficiente para quantificação dos ITKs.

TABELA 34. ATP PARA MÉTODO UPLC-HRMS DE ITKS

<b>Elemento ATP</b>	<b>Alvo</b>	<b>Justificativa</b>
Amostra	Plasma humano	O desenvolvimento de método bioanalítico para ITK é essencial para o monitoramento terapêutico e estudos farmacocinéticos destes medicamentos
Tipo de método	Fase reversa	A seleção de uma fase estacionária hidrofóbica na cromatografia de fase reversa tem a vantagem de uma boa retenção para a maioria das moléculas
Instrumento	UPLC-HRMS	Baseado na alta resolução da técnica analítica
Característica da amostra	Técnica de extração	Realizada para diminuir o número de interferentes e tornar a amostra compatível ao instrumento analítico
Preparação do padrão e amostras	Tornar compatível ao sistema	Justificado pela complexidade da amostra (plasma)

FONTE: O autor (2020)

Para alcançar o ATP desejado, vários atributos críticos de qualidade – (CQA, do inglês *Critical Quality Attribute*) foram identificados. Como a área do pico dos analitos (indicador de concentração do analito), tempo de retenção do primeiro e último analito da corrida (indicador da capacidade de separação do composto), formato do pico/ largura (indicador da eficiência do método). Os CQA são propriedades ou características que tem impacto direto no ATP e que devem estar dentro de um intervalo ou distribuição adequados para garantir a qualidade desejada para o produto.

#### 22.6.2. Análise de risco

Foram realizados estudos de avaliação de risco para identificar os parâmetros críticos do método (CMP, do inglês, *Critical method parameters*), que possuem alto risco em função de sua criticidade e influência para afetar os CQAs. Para isso, foi construído o diagrama de Ishikawa e foi realizado um estudo de priorização para selecionar os parâmetros de método críticos com alto risco através da construção de matriz de estimativa de risco, atribuindo níveis de risco baixo, médio e alto.



## 22.7. Desenvolvimento cromatográfico através de AQbD

O desenvolvimento cromatográfico foi conduzido em cinco etapas utilizando um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas. As etapas consistiram em seleção das variáveis categóricas (1), otimização do preparo de amostra (2), verificação dos efeitos das variáveis contínuas (3), geração da superfície de resposta (4) e verificação da concordância dos resultados (5), com o auxílio do software Design Expert 11.

### 22.7.1. Seleção das variáveis categóricas

Foram testados diferentes gradientes exploratórios (de aquoso para orgânico e vice-versa) para os analitos. Para isso foi preparada uma mistura dos analitos e padrão interno, todos na concentração de 100 ng.mL<sup>-1</sup>. A partir disso, foi definido o seguinte método para a etapa de seleção das variáveis categóricas:

- Fase móvel: A (aquoso) e B (orgânico), eluida em modo gradiente, conforme segue:  $t_{0,0-3,0}$ : 5-90% B;  $t_{3,0-3,1}$ : 90-5% B;  $t_{3,1-6}$ : 5% B;
- Fluxo da fase móvel: 300  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;
- Temperatura de forno: 30°C;
- Volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ .

Para a seleção das variáveis categóricas do método cromatográfico foi aplicado o desenho experimental de fatorial completo para fase estacionária, solvente orgânico e aditivo da fase móvel, totalizando 18 experimentos. Foram testadas três colunas com diferentes polaridades (Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100x2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), Acquity UPLC HSS Cyano (100x2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) e Acquity UPLC BEH C8 (100x2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), dois solventes orgânicos da fase móvel (água: acetonitrila e água: metanol) e diferentes aditivos (0,1% de ácido fórmico, 0,1% de ácido fórmico + 3 mM de formiato de amônio, e 3 mM de formiato de amônio). A escolha das variáveis categóricas foi estabelecida de acordo com o tempo de retenção do último analito, o fator de retenção ( $K'$ ), a largura do pico e a área de cada analito (bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe).

## 22.7.2 Otimização do preparo de amostra utilizando o planejamento experimental de mistura centroide simplex

### *22.7.2.1. Triagem inicial*

Para esta etapa foram preparadas uma solução de trabalho com todos os analitos na concentração de  $1.000 \text{ ng.mL}^{-1}$ , assim como uma solução do padrão interno na mesma concentração. Os analitos e PI foram diluídos em plasma para alcançar uma concentração final de  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

As técnicas de precipitação e extração líquido-líquido foram testadas. Com isso, alíquotas de  $200 \mu\text{L}$  de plasma branco foram fortificadas com  $20 \mu\text{L}$  da solução de trabalho e  $20 \mu\text{L}$  do PI. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e em seguida foram adicionados  $760 \mu\text{L}$  dos agentes precipitantes ou extratores. Foram testados os seguintes agentes precipitantes: acetonitrila, acetonitrila contendo 1,0% de ácido fórmico, metanol e metanol com 1,0% ácido fórmico. Para a técnica líquido-líquido foram testados os solventes extratores terc-butil-metil-éter (TBME), acetato de etila e dietil-éter. Em seguida as amostras foram novamente agitadas por 3 minutos e foram submetidas à centrifugação por 10 minutos, a 14.000 rotações por minuto (rpm) a  $4^\circ\text{C}$ . Após,  $600 \mu\text{L}$  de cada sobrenadante foi coletado. Por fim, algumas amostras de precipitação de proteínas foram diretamente injetadas no UPLC-HRMS, enquanto outras amostras da precipitação de proteínas e do líquido-líquido foram submetidas a secagem em centrivap a  $50^\circ\text{C}$ , até a secura total. Essas amostras foram em seguidas ressuspensas com metanol:acetonitrila, 50:50, v/v.

Para cada solvente foi feito triplicata de amostra, visando selecionar o solvente de acordo com a recuperação e a precisão, sendo considerado satisfatório desvio padrão relativo (DPR) inferior a 15%.

### *22.7.2.2. Planejamento da mistura*

Para avaliar como diferentes solventes e suas misturas influenciam na variação da extração dos analitos foi feito um planejamento experimental de mistura centroide simplex. Este permite identificar quais as proporções de cada solvente são necessárias para obter uma melhor resposta. Considerando que a melhor técnica de extração foi líquido-líquido, foram incluídos no planejamento

os seguintes solventes: acetato de etila, dietil éter e TBME. Para uma mistura de três componentes ( $q=3$ ), de acordo com o planejamento em centroide simplex ampliada, há um total de doze experimentos, como demonstrado na TABELA 35.

TABELA 35. PLANEJAMENTO CENTROIDE SIMPLEX AMPLIADA

Testes	Modelo	A	B	C
1	A	1,00	-	-
2	B	-	1,00	-
3	C	-	-	1,00
4	AB	0,50	0,50	-
5	AC	0,50	-	0,50
6	BC	-	0,50	0,50
7a	ABC	0,33	0,33	0,33
7b	ABC	0,33	0,33	0,33
7c	ABC	0,33	0,33	0,33
8	A <sup>2</sup> BC	0,67	0,17	0,17
9	AB <sup>2</sup> C	0,17	0,67	0,17
10	ABC <sup>2</sup>	0,17	0,17	0,67

Nota: Em azul, ponto central em triplicata; FONTE: O autor (2020)

Para essa análise as respostas de interesse (CQA) foram as áreas dos picos obtidas para cada analito e PI, havendo sete respostas avaliadas (área do bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe, radotinibe e oclacitinibe).

A escolha da mistura que proporciona uma melhor extração foi feita através da construção das superfícies de resposta. Sendo realizado análise de variância (ANOVA), para avaliar a significância do ajuste de modelo, assim como a falta de ajuste, para verificar a adequabilidade da superfície de resposta da mistura. Com base nos resultados adquiridos para cada teste, foram calculados os coeficientes para as variáveis estudadas, utilizando um IC de 95%.

### 22.7.3. Variáveis contínuas

#### *22.7.3.1 Triagem das variáveis contínuas através do fatorial fracionado*

Após definir as variáveis categóricas e a melhor técnica de extração, foram avaliadas as variáveis contínuas. Para isso, foi usado branco plasma normal fortificado com os analitos na concentração de 100 ng.mL<sup>-1</sup>.

O desenho experimental fatorial fracionado de dois níveis ( $2^{4-1}$ ) foi aplicado. O conjunto de experimentos foi construído variando os parâmetros em níveis negativo (-1), central (0) e positivo (+1). As variáveis contínuas testadas neste experimento foram: temperatura do forno da coluna (25°C, 35°C e 45°C), vazão de fluxo (0,2 mL.min<sup>-1</sup>, 0,3 mL.min<sup>-1</sup> e 0,4 mL.min<sup>-1</sup>), proporção de ácido fórmico (0,05%, 0,10% e 0,15%) e proporção de formiato de amônio (1 mM, 3 mM e 5 mM). Na TABELA 36 é apresentado como foram conduzidos os testes para a seleção das variáveis contínuas do método.

TABELA 36. FATORIAL FRACIONADO PARA AS VARIÁVEIS CONTÍNUAS

Testes	Temperatura (°C)	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Ácido fórmico (%)	Formiato de amônio (mM)
1	25 (-1)	0.2 (-1)	0.15 (1)	5 (1)
2	45 (1)	0.2 (-1)	0.05 (-1)	5 (1)
3a	35 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	3 (0)
3b	35 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	3 (0)
3c	35 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	3 (0)
4	45 (1)	0.4 (1)	0.05 (-1)	1 (-1)
5	45 (1)	0.2 (-1)	0.15 (1)	1 (-1)
6	25 (-1)	0.4 (1)	0.15 (1)	1 (-1)
7	25 (-1)	0.4 (1)	0.05 (-1)	5 (1)
8	25 (-1)	0.2 (-1)	0.05 (-1)	1 (-1)
9	45 (1)	0.4 (1)	0.15 (1)	5 (1)

Nota: Em azul, ponto central em triplicata; FONTE: O autor (2020)

As variáveis foram selecionadas de acordo com suas significâncias nos gráficos de Pareto, considerando as áreas dos analitos (que pode ser influenciada pelos aditivos) e o perfil cromatográfico (mais especificamente a largura do pico) como CQAs. As variáveis significativas foram incluídas no modelo para superfície de resposta.

#### 22.7.3.2. Planejamento experimental – Box-Behnken (superfície de resposta).

Após avaliar quais variáveis são importantes para o desempenho do método através do fatorial fracionado, foi feito o planejamento experimental por Box Behnken. Este planejamento possibilita a construção de um modelo polinomial visando caracterizar ou otimizar um processo com um número limitado

de experimentos. O número de experimentos necessários é definido através da seguinte equação:

$$n=2K (K-1) + C_0$$

onde n corresponde ao número de experimentos, K é o número de variáveis, e  $C_0$  é o número de pontos centrais. Considerando que todas as variáveis (n=4) apresentaram resultados significativos para os analitos e que foi realizado a repetição do ponto central para avaliar a variabilidade experimental, foram conduzidos 27 experimentos, conforme demonstrado na TABELA 37. As áreas/formato dos picos dos analitos foram as variáveis de desfecho monitoradas.

TABELA 37. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL BOX BEHNKEN

Corrida	Temperatura (°C)	Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> )	Ácido fórmico (%)	Formiato de amônio (mM)
1	35	0,4	0,15	3
2	25	0,3	0,15	3
3	35	0,2	0,1	1
4	45	0,2	0,1	3
5	35	0,3	0,1	3
6	35	0,3	0,15	5
7	35	0,4	0,1	5
8	45	0,4	0,1	3
9	35	0,4	0,1	1
10	25	0,4	0,1	3
11	35	0,3	0,05	5
12	25	0,3	0,05	3
13	45	0,3	0,15	3
14	35	0,3	0,15	1
15	35	0,2	0,1	5
16	35	0,3	0,1	3
17	45	0,3	0,1	1
18	45	0,3	0,05	3
19	35	0,2	0,05	3
20	35	0,3	0,1	3
21	25	0,3	0,1	1
22	45	0,3	0,1	5
23	35	0,4	0,05	3
24	25	0,3	0,1	5
25	35	0,3	0,05	1
26	25	0,2	0,1	3
27	35	0,2	0,15	3

Nota: Em azul, ponto central em triplicata; FONTE: O autor (2020)

Após estabelecer quais são as melhores condições para o método analítico foi realizada a confirmação dos resultados através da análise de amostras em quadruplicata na condição otimizada.

## **22.8. Preparação das amostras para validação do método**

Para validar e monitorar o desempenho do método bioanalítico foram preparadas as seguintes amostras: amostra de plasma fortificada antes da extração (FA), amostra de plasma fortificada após a extração (FD) e amostras de controle de qualidade (CQ)

### 22.8.1. Amostras fortificadas antes da extração

Para a preparação dessas amostras, alíquotas de 200 µL de plasma branco contidas em eppendorf de 2 mL foram fortificadas com 40 µL da mistura dos analitos e PI. Estes tubos foram agitados em vórtex por um minuto e então foi adicionado 760 µL do solvente extrator (acetato de etila: dietil éter, 58: 42, v/v). Em seguida, essas amostras foram agitadas por 3 minutos em vórtex e foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. Com isso, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo plástico e foram submetidos a um concentrador de amostras para evaporação (CentriVap Labconco, Kansas City, EUA) a 50°C, até a secagem total. O resíduo remanescente foi ressuscitado com 100 µL de acetonitrila:água (50:50, v/v) mediante agitação em vórtex por 5 minutos.

### 22.8.2. Amostras fortificadas depois da extração

Para a preparação dessas amostras, foi adicionado 40 µL de diluente (acetonitrila:água, 50:50, v/v) nas alíquotas de 200 µL de plasma branco. Estes tubos foram agitados em vórtex por um minuto e em seguida foi adicionado 760 µL do solvente extrator (acetato de etila: dietil éter, 58: 42, v/v). Então, essas amostras foram agitadas por 3 minutos em vórtex e foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, a 4°C. Assim, 600 µL do sobrenadante foram transferidos

para um novo tubo plástico e foram submetidos a um concentrador de amostras para evaporação (CentriVap Labconco, Kansas City, EUA) a 50°C, até a secagem total. O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100 µL de mistura dos analitos e PI, mediante agitação em vórtex por 5 min. A concentração final dessas amostras era similar a concentração teórica das amostras fortificadas antes.

### 22.8.3. Amostras de controle de qualidade

Amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em cinco níveis: CQ-LIQ (controle de qualidade limite inferior de quantificação) (5 ng.mL<sup>-1</sup>), CQB (controle de qualidade baixo) (25 ng.mL<sup>-1</sup>), CQM (controle de qualidade médio) (100 ng.mL<sup>-1</sup>), CQA (controle de qualidade alto) (300 ng.mL<sup>-1</sup>) e CQD (controle de qualidade de diluição) (1.000 ng.mL<sup>-1</sup>).

A concentração das amostras CQD foi estabelecida como 10 vezes maior que o ponto intermediário da curva (CQM), de modo a obter concentração que ultrapassasse o limite superior de quantificação (LSQ). Para o preparo da amostra CQD, alíquotas de plasma branco (200 µL) foram fortificadas com 40 µL da solução de trabalho dos analitos e agitadas em vórtex por um minuto. Então, foi feito a diluição 1:10 com plasma branco e as amostras foram novamente agitadas por um minuto. Em seguida, essa amostra foi aliquotada (200 µL) em eppendorf de 2 mL, às quais foram adicionados 40 µL somente com o padrão interno, e então extraídas e processadas como descrito no tópico 22.8.1.

## **22.9. Validação do método bioanalítico**

Após o desenvolvimento do método bioanalítico, foi conduzida a validação conforme os critérios estabelecidos pela resolução nacional RDC 27/ 2012 da ANVISA [225] e pelo guia internacional de validação de método bioanalítico da FDA de 2018 [226].

### 22.9.1. Limite inferior de quantificação

Para este ensaio, foram preparadas amostras fortificadas em concentrações decrescentes dos analitos (todas em triplicata). O limite inferior de quantificação (LIQ) foi estabelecido com base na relação sinal/ruído superior a 10/1 e na reprodutibilidade ( $DPR < 20\%$ ) [225, 226].

### 22.9.2. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram utilizadas seis amostras de plasma branco (isentas de analitos) de diferentes fontes, sendo quatro plasmas normais, uma hemolisada e uma lipêmica. Essas amostras foram comparadas com uma matriz de plasma fortificada com analitos nas concentrações correspondentes aos LIQs e PI (preparadas conforme o tópico 22.8.1).

Com isso, foi realizada a sobreposição e comparação da resposta dos analitos no cromatograma branco e no cromatograma da amostra fortificada. O método foi considerado seletivo se as respostas de picos interferentes na matriz isenta de analitos eram inferiores a 20% da área obtida no LIQ dos analitos e 5% da área do PI presente na amostra fortificada [225, 226].

### 22.9.3. Curva de calibração

A curva de calibração foi estabelecida através do método de padronização interna, utilizando o oclacitinibe como PI na concentração fixa de  $200 \text{ ng.mL}^{-1}$ . As curvas foram construídas com sete níveis de concentração, no intervalo de 5 a  $400 \text{ ng.mL}^{-1}$ , em triplicata, durante três dias consecutivos. O intervalo da curva de calibração foi definido com base na aplicabilidade do método, utilizando dados da literatura [444-452].

Em cada curva, foram analisadas também as amostras branco plasma normal (BPN) e branco plasma zero (BPZ). A construção das curvas foi feita utilizando regressão linear. A curva foi considerada satisfatória se no mínimo 75% dos padrões de calibração atendessem as seguintes especificações: desvio menor ou igual a 20% para a concentração nominal do LIQ e menor ou igual a 15% para os demais níveis da curva [225, 226].

Além disso, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para investigar o ajuste do modelo de regressão das curvas de calibração dos analitos. O teste



t de Student foi usado para investigar a significância dos coeficientes da equação para todas as curvas de calibração do analito. A normalidade e homocedasticidade dos resíduos da regressão foram avaliadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Além disso, o teste de Durbin-Watson foi utilizado para a análise de autocorrelação dos resíduos de regressão.

#### 22.9.4. Precisão e exatidão

Para a avaliação destes parâmetros foram preparadas cinco réplicas das amostras CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A precisão e a exatidão foram conduzidas em três dias consecutivos, com duas abordagens: intracorrida e intercorrida. A precisão e a exatidão foram mensuradas pelo desvio padrão relativo (DPR) e erro padrão relativo (EPR), respectivamente. Ambos os valores devem ser inferiores a 15%, com exceção do CQ-LIQ, que deve ser inferior a 20% [225, 226]. Ainda, para a análise de precisão interdia foi feito one-way ANOVA.

#### 22.9.5. Recuperação

Para avaliar a quantidade dos analitos recuperada durante o processo de preparação amostral, foi feito a comparação de amostras de matriz de plasma fortificadas com os analitos e PI antes da extração (FA) com amostra de matriz fortificadas após a extração (FD) (que representam 100% de recuperação). Para cada tipo de amostra (FA e FD) foram preparadas três concentrações (CQB, CQM e CQA) em cinco réplicas.

As amostras FA foram preparadas de acordo com o tópico 22.8.1 enquanto as amostras de FD de acordo com o tópico 22.8.2.

#### 22.9.6. Efeito matriz

Para verificar a presença do efeito matriz foram preparadas oito réplicas de CQB e CQA tanto em solução quanto como amostra de plasma FD (preparado conforme o tópico 22.8.2). As amostras de matriz foram obtidas de oito fontes distintas, sendo quatro plasmas normais, dois hemolisados e dois lipêmicos.

Para cada nível de concentração foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN) por padrão interno, comparando-se as respostas do analito e PI nas amostras FD com as respostas em solução.

#### 22.9.7. Carryover (efeito residual)

Para determinar se havia contaminação de uma corrida e outra, foi realizada a injeção de uma amostra branco de plasma seguida pela injeção de uma amostra de plasma fortificado na concentração do LSQ. Após, a amostra branca foi novamente injetada mais duas vezes.

O efeito residual foi estabelecido pela comparação dos picos interferentes nas amostras reinjetadas, nos mesmos tempos de retenção dos analitos, com a resposta dos analitos nas amostras de LIQ. Foi considerado satisfatório quando os picos interferentes eram inferiores a 20% das respostas dos analitos e para o PI, quando eram inferiores a 5% da sua resposta.

#### 22.9.8. Estabilidade

##### *22.9.8.1. Estabilidade dos analitos em plasma*

Para cada ensaio de estabilidade foram preparadas em triplicata amostras nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA. Foram conduzidos os seguintes testes de estabilidade: estabilidade de curta duração, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento.

No teste de estabilidade de curta duração, as amostras permaneceram na bancada, por 6 horas, em temperatura ambiente. No teste de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras fortificadas foram congeladas por 24 horas (-40 °C) e, então, descongeladas à temperatura ambiente. Este ciclo foi repetido por três vezes. No teste de estabilidade de longa duração, as amostras fortificadas foram congeladas a -40 °C por 30 dias. Após todos esses processos, as amostras foram submetidas ao processo de extração, descrito no tópico 22.8.1, e então injetadas no sistema UPLC-HRMS.

Para a análise de estabilidade pós-processamento, amostras já injetadas no equipamento, permaneceram armazenadas no gerenciador de amostras

(25°C) por 24 horas. Após esse período, essas amostras foram reinjetadas no sistema.

Os resultados dessas amostras foram comparados com os resultados de amostras recém preparadas, sendo considerado estável quando o DPR era inferior a 15% ou se o valor de p no teste t de Student fosse maior que 0,05.

#### 22.9.8.2. Estabilidade dos analitos em solução

Para este ensaio, foram preparadas soluções de trabalho (100 µg.mL<sup>-1</sup>) de acordo com o tópico 22.4, respectivamente (preparado em triplicata).

As soluções foram armazenadas tanto em *freezer* a -40 °C por 30 dias quanto em bancada por 6 horas em temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram diluídas para obter os mesmos níveis de concentração do CQM (100 ng.mL<sup>-1</sup>).

As amostras foram comparadas com soluções recém-preparadas (triplicata), e foram consideradas estáveis quando as respostas se apresentaram inferior a 10% do valor nominal ou se o valor de p no teste t de Student fosse maior que 0,05.

## 23. RESULTADOS

### 23.1. Otimização dos parâmetros espectrométricos

Inicialmente foi feito a otimização dos parâmetros espectrométricos por infusão direta de soluções contendo os analitos, visando a obter a melhor intensidade de sinal analítico para todos os analitos e PI.

O modo positivo de ionização foi escolhido uma vez que estes analitos apresentam grupos funcionais que facilmente aceitam um próton, H<sup>+</sup>. Foi feita a otimização dos parâmetros da fonte de ionização, tendo sido definidas as seguintes condições:

- Voltagem do capilar: +400 V;
- Voltagem do cone: 40 V;
- Source offset: 80 V;
- Temperatura da fonte: 150°C;
- Temperatura de dessolvatação: 400°C;

- Gás do cone: 50 L/h;
- Gás de dessolvatação: 600L.h<sup>-1</sup>
- Energia de colisão em baixa energia: 4 V
- Energia de colisão em alta energia: 20 a 40 V

## 23.2. Analytical Quality-by-Design

### 23.1.1. Análise de risco

A identificação dos CMP faz parte do gerenciamento de risco. Na FIGURA 19 são apresentados os riscos deste método através do diagrama de Ishikawa para estruturar o plano de operação de risco. Os estudos de avaliação de risco sugeriram que parâmetros como composição de fase móvel, vazão de fluxo, temperatura do forno de coluna e tipo de coluna foram considerados associados a alto risco, enquanto volume de injeção e dimensão de coluna exibiram nível de risco médio.



FIGURA 19. DIAGRAMA DE ESPINHA DE PEIXE DE ISHIKAWA QUE DESCREVE A RELAÇÃO ENTRE CAUSA E EFEITO NOS CQA POTENCIAIS DO MÉTODO BIOANALÍTICO DE ITKS

FONTE: O autor (2020)

## 23.2. Desenvolvimento cromatográfico através de AQbD

### 23.2.1. Seleção das variáveis categóricas

Na TABELA 38 e FIGURA 20 são apresentados os resultados obtidos para cada experimento, sendo que o melhor resultado foi obtido com coluna

ciano, com a mistura de fase móvel água:acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mM de formiato de amônio.

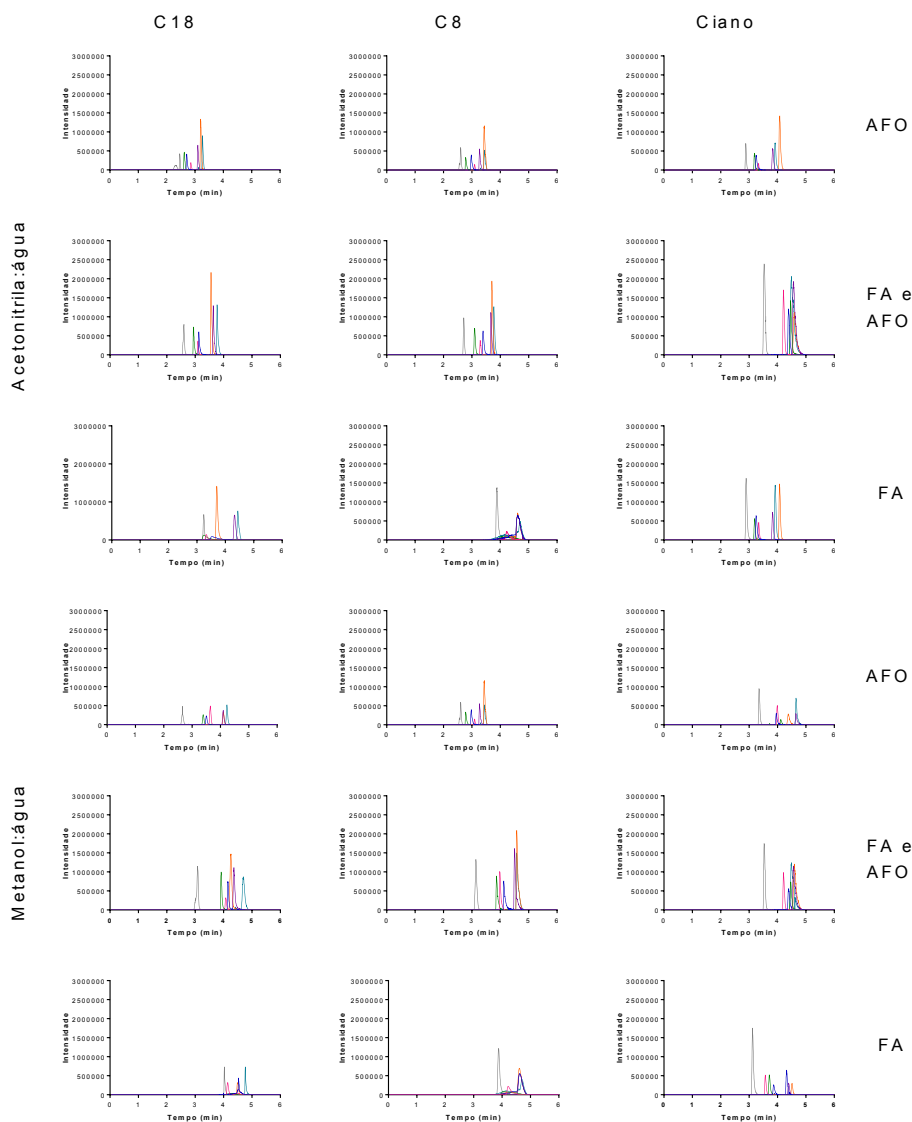


FIGURA 20. CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA CADA CONDIÇÃO TESTADA

Nota: C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100x2,1 mm, 1,7  $\mu$ m); Ciano, Acquity UPLC HSS Cyano (100x2,1 mm, 1,8  $\mu$ m); C8, Acquity UPLC BEH C8 (100x2,1 mm, 1,7  $\mu$ m); ACN, acetonitrila; MeOH, metanol; FA, formiato de amônio; AFO, ácido fórmico; FONTE: O autor (2020)

TABELA 38. VARIÁVEIS CATEGÓRICAS TESTADAS E RESULTADOS

Teste	Coluna	Fase móvel	Aditivo	K'	Tempo último	Bosu	Dasa	Ima	Nilo	Pona	Rado
1	Ciano	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%)	3,19	4,08	24368	6835	22687	33951	88202	44196
2	Ciano	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	3,52	4,46	48535	<b>54091</b>	47925	<b>117216</b>	<b>139365</b>	<b>149935</b>
3	Ciano	Água:ACN	FA (3mM)	3,53	4,51	38217	42017	58820	21205	18206	44790
4	Ciano	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%)	3,96	4,65	13897	25164	6869	19437	21940	42226
5	Ciano	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	4,21	4,59	35672	18433	43156	92197	116226	120931
6	Ciano	Água:MeOH	FA (3mM)	4,28	4,62	8818	7428	7124	15039	5083	6980
7	C8	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%)	2,78	3,44	19858	5881	15494	26339	62889	26701
8	C8	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	3,09	3,78	37781	16494	38107	60136	110354	70952
9	C8	Água:ACN	FA (3mM)	4,04	4,70	38302	25674	27679	86752	94251	61438
10	C8	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%)	3,18	4,07	40100	21612	25399	36281	66052	81784
11	C8	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	3,87	4,59	46618	49309	<b>52321</b>	110486	136639	115285
12	C8	Água:MeOH	FA (3mM)	4,15	4,69	31143	30824	26420	49615	90510	29645
13	C18	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%)	2,62	3,26	16704	6458	19596	27175	57380	35704
14	C18	Água:ACN	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	2,95	3,78	31381	13205	31796	57095	108899	63551
15	C18	Água:ACN	FA (3mM)	4,15	4,71	<b>53156</b>	35291	29763	53909	90518	37318
16	C18	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%)	3,49	4,23	13130	22374	13507	20757	16599	27663
17	C18	Água:MeOH	Ácido fórmico (0,1%) FA (3mM)	3,93	4,70	37311	40856	51179	86177	122442	78260
18	C18	Água:MeOH	FA (3mM)	3,14	4,44	17259	11510	24793	45148	102509	48782

Nota: C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100x2,1 mm, 1,7 µm); Ciano, Acquity UPLC HSS Ciano (100x2,1 mm, 1,8 µm); C8, Acquity UPLC BEH C8 (100x2,1 mm, 1,7 µm); ACN, acetonitrila; MeOH, metanol; FA, formiato de amônio; K', fator de retenção (grifado em rosa); t último, tempo do último analito a sair na corrida (em azul); bosu, bosutinibe; dasa, dasatinibe; ima, imatinibe; nilo, nilotinibe; pona, ponatinibe; rado, radotinibe. Em negrito a maior relação área/largura para cada analito; FONTE: O autor (2020)

## 23.2.2 Otimização do preparo de amostra utilizando o planejamento experimental de mistura centroide simplex

### 23.2.2.1. Triagem inicial

Como resultado da triagem inicial para a seleção da técnica de extração, observou-se que a técnica líquido-líquido é a que apresentou maior recuperação dos analitos como demonstrado na FIGURA 21 e TABELA 39.

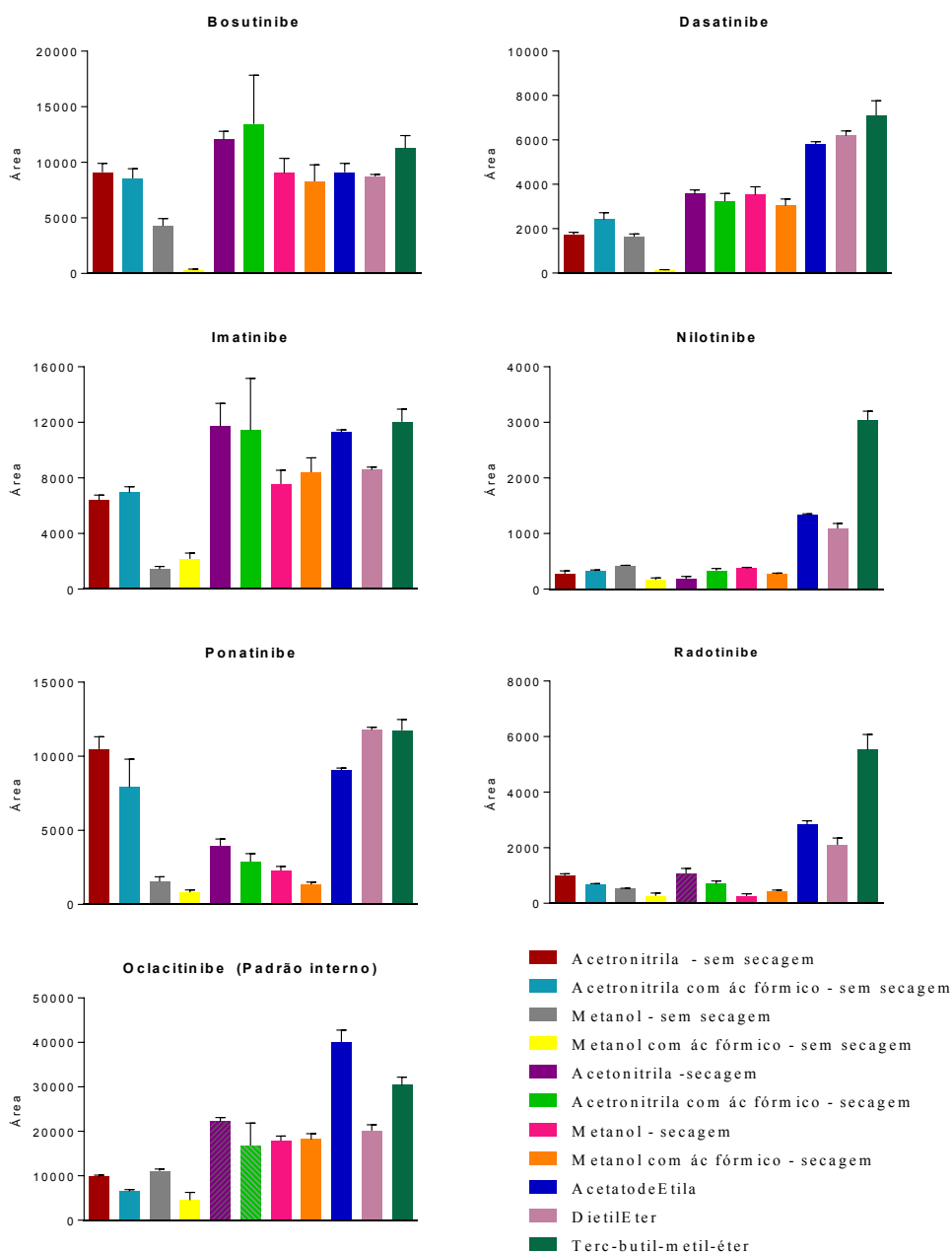


FIGURA 21. RESULTADO DA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRAÇÃO/PRECIPITAÇÃO

FONTE: O autor (2020)

TABELA 39. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA

Solvente	Secagem	Bosutinibe		Dasatinibe		Imatinibe		Nilotinibe		Ponatinibe		Radotinibe		Oclacitinibe	
		Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)	Rec (%)	Rep (%)
ACN	N	63,5	8,9	21,9	6,0	52,9	5,9	8,5	19,9	83,3	8,0	16,1	5,8	24,1	3,9
ACN +AFO	N	59,8	10,2	30,4	13,1	57,6	6,1	10,1	5,4	62,9	23,9	11,0	4,3	16,0	5,9
MeOH	N	29,9	15,3	20,7	7,9	11,8	14,7	12,9	2,2	12,3	19,9	8,6	2,1	27,3	3,9
MeOH+ AFO	N	2,4	15,4	1,7	19,4	18,0	19,3	5,2	19,8	6,5	20,0	4,4	36,6	11,1	38,9
ACN	S	84,3	6,0	45,0	5,2	97,0	14,2	5,8	22,2	31,4	11,7	17,1	18,0	54,6	4,2
ACN +AFO	S	93,9	32,7	40,9	11,1	94,8	32,6	10,4	10,2	23,0	20,0	11,3	14,2	41,5	29,8
MeOH	S	63,2	14,5	44,5	10,5	62,6	13,1	11,4	5,6	18,2	11,8	4,2	30,2	44,1	5,7
MeOH + AFO	S	57,9	17,9	38,4	9,8	69,6	12,5	8,3	7,0	10,6	12,1	7,0	9,8	44,9	7,0
Acetato de Etila	S	63,6	8,8	73,5	2,0	93,5	1,6	41,1	1,8	72,0	1,5	45,5	4,7	98,6	6,9
DietilEter	S	61,0	1,9	78,2	3,5	71,1	2,2	33,7	8,3	93,6	1,5	33,8	11,8	49,6	6,6
TBME	S	78,6	10,2	89,9	9,2	99,8	7,6	93,9	5,2	93,4	6,1	88,7	9,9	75,0	5,8

Nota: Rec, recuperação; Rep, Reprodutibilidade; ACN, acetonitrila; AFO, ácido fórmico; MeOH, metanol; TBME, terc-butil-metil-eter; S, sim; N, não; Em azul: desvio padrão relativo superior a 15%; FONTE: O autor (2020)



#### 14.2.2.2. Planejamento da mistura

Como a técnica de extração líquido-líquido foi a que apresentou melhores resultados na etapa de triagem, foram testadas diferentes misturas com três componentes (acetato de etila, dietil éter e terc butil metil éter), sendo a superfície de resposta expressa na forma de triângulo equilátero, em que os vértices do retângulo correspondem aos solventes puros, enquanto os lados correspondem as misturas binárias e os pontos centrais as misturas dos três solventes (FIGURA 22).

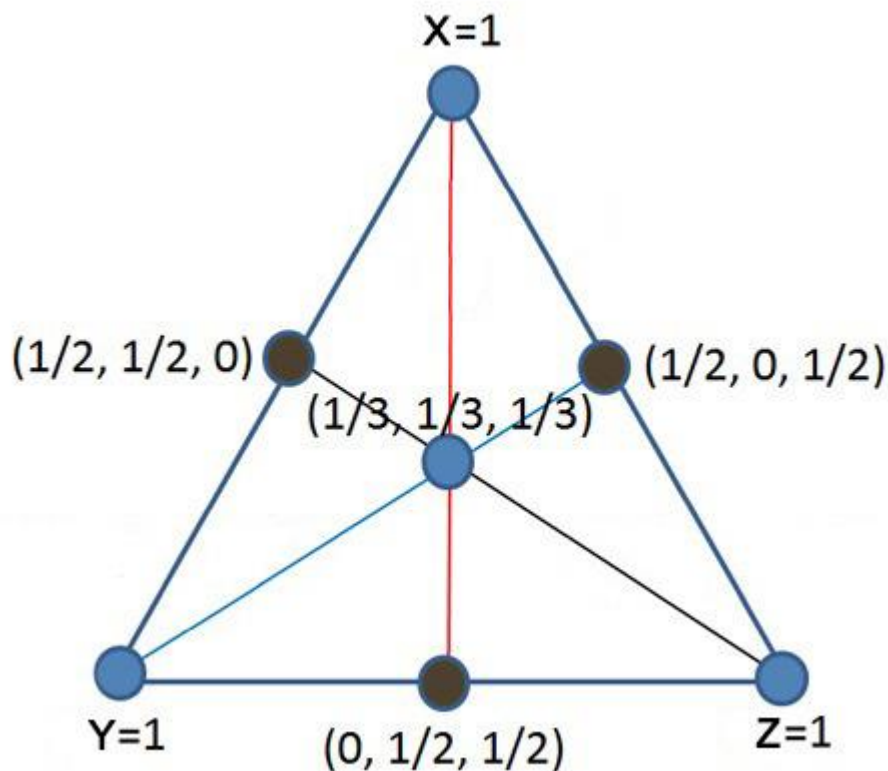


FIGURA 22. PLANEJAMENTO EM REDE SIMPLEX [3,3]

FONTE: O autor (2020)

Diferentes combinações de coeficientes foram testadas durante a modelagem com intuito de encontrar regressões que melhor explicam os dados, e gerar uma superfície de resposta confiável. A escolha do modelo foi de acordo com os resultados da ANOVA. Como demonstrado pela TABELA 40, os modelos apresentaram-se significativos ( $p < 0,05$ ), com ausência de falta de ajuste ( $p > 0,05$ ) e  $R^2$  satisfatório para os analitos (0,9566-0,9979).

TABELA 40. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA

Analito	Modelo	Valor de p do modelo	Falta de ajuste	R <sup>2</sup>
Bosutinibe	<i>Special quartic</i>	0,0217	0,8118	0,9772
Dasatinibe	<i>Reduced Quartic model</i>	0,0138	0,0720	0,9566
Imatinibe	<i>Reduced Quartic model</i>	0,0400	0,7417	0,9652
Nilotinibe	<i>Reduced Quartic model</i>	0,0062	0,6653	0,9903
Ponatinibe	<i>Reduced Quartic model</i>	0,0006	0,8975	0,9979
Radotinibe	<i>Special Quartic model</i>	0,0002	0,8611	0,9860
Oclacitinibe	<i>Reduced Quartic model</i>	0,0139	0,7508	0,9832

Nota: R<sup>2</sup>, coeficiente de determinação; FONTE: O autor (2020)

Com isso, a mistura que apresentou resultado mais adequado para a extração dos analitos foi acetato de etila: dietil éter, 58: 42, v/v (FIGURA 23).

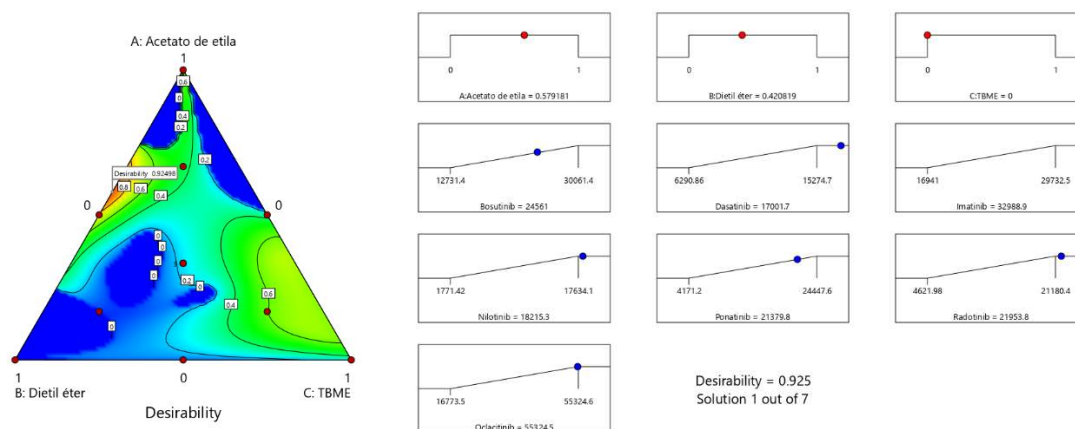


FIGURA 23. RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DE MISTURA

FONTE: O autor (2020)

### 23.2.3. Variáveis contínuas

#### 23.2.3.1 Triagem das variáveis contínuas através do fatorial fracionado

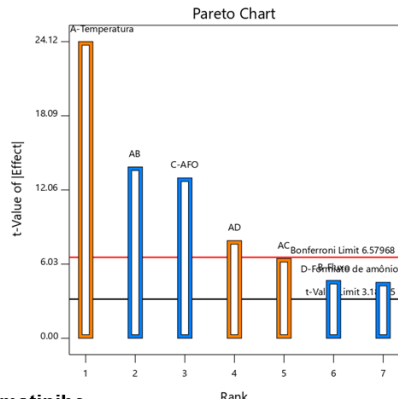
Na TABELA 41 e FIGURA 24 são apresentados os efeitos para esse modelo. A análise dos valores de p dos coeficientes nos permite identificar quais os fatores são relevantes para explicar o comportamento da resposta. Nota-se que apesar das quatro variáveis testadas (temperatura; fluxo, concentração de ácido fórmico e concentração de formiato de amônio) não terem efeitos para todos os analitos, como é uma análise em conjunta (todos os ITKs), foi considerado que todas as variáveis possuem efeitos de primeira e segunda ordem para o modelo.

TABELA 41. VALORES DE P NO FATORIAL FRACIONADO

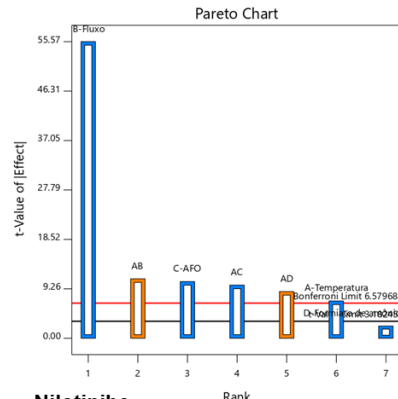
Fatores	BOS	DAS	IMA	NILO	PONA	RADO	PI
<b>A</b>	0,0017	0,0200	0,3515	0,5832	0,9558	0,3768	0,0090
<b>B</b>	0,0425	0,0003	0,0119	0,0315	0,2372	0,0633	0,0011
<b>C</b>	0,0058	0,0088	0,0331	0,0291	0,4219	0,8947	0,0012
<b>D</b>	0,0452	0,1499	0,1313	0,3648	0,3534	0,0490	0,7683
<b>AB</b>	0,0051	0,0080	0,6209	0,7510	0,6395	0,0703	0,0612
<b>AC</b>	0,0230	0,0100	0,3567	0,4663	0,5366	0,0403	0,0332
<b>AD</b>	0,0155	0,0128	0,0333	0,0458	0,3975	0,0405	0,0147
<b>CURVATURA</b>	0,0112	0,1235	0,0908	0,3860	0,3860	0,9133	0,0086

Nota: A, temperatura; B, fluxo; C, ácido fórmico; D, formiato de amônio; BOS, bosutinibe; DAS, dasatinibe; IMA, imatinibe; NILO, nilotinibe; PONA, ponatinibe; RADO, radotinibe; PI, padrão interno; Em azul: valores de  $p < 0,05$  que indicam que os termos do modelo são significativos; FONTE: O autor (2020)

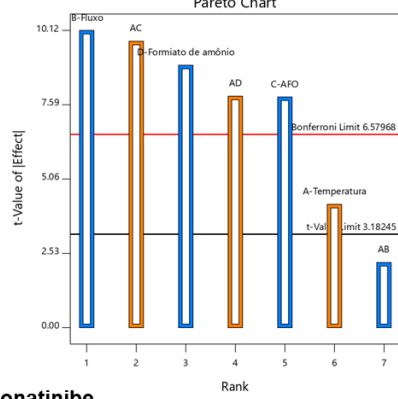
**Bosutinibe**



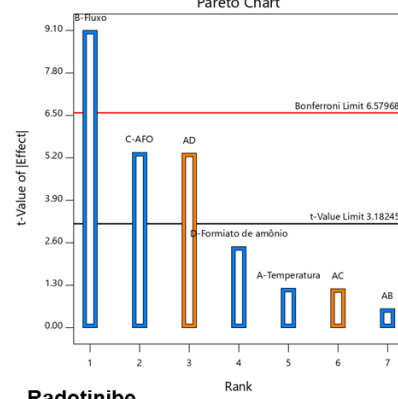
**Dasatinibe**



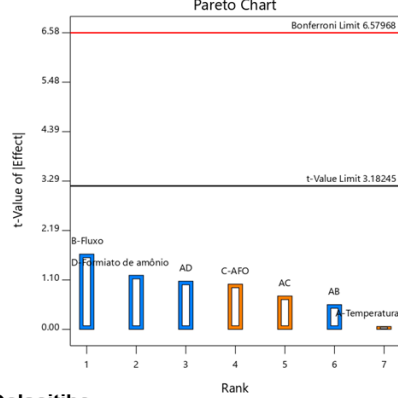
**Imatinibe**



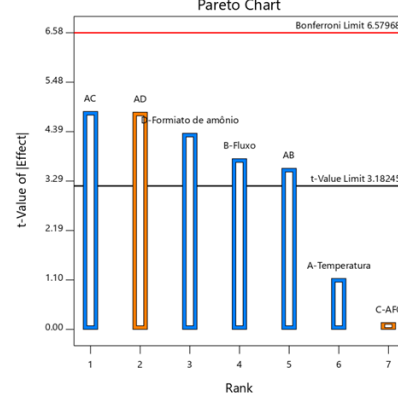
**Nilotinibe**



**Ponatinibe**



**Radotinibe**



**Oclacitibe**

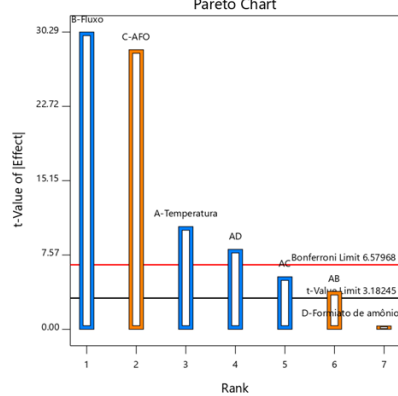


FIGURA 24. GRÁFICO DE PARETO DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS  
 Nota: A, temperatura, B, fluxo; C, ácido fórmico; D, formiato de amônio  
 FONTE: O autor (2020)

### 14.3.2. Planejamento experimental – Box-Behnken (superfície de resposta)

Após a análise por fatorial fracionado, foi realizado o planejamento experimental por Box-Behnken, visto que este permite gerar uma superfície de resposta com intuito de otimizar ou estimar o melhor ponto experimental a partir de diferentes combinações de CMPs definidos na etapa anterior. Na TABELA 42 é apresentado os valores de coeficiente de determinação para cada analito ( $R^2$ ), em que podemos observar que o nosso modelo de regressão explica >68% da variação do modelo. Associado ao  $R^2$ , temos o coeficiente de determinação ajustado, que é uma versão do  $R^2$  ajustada de acordo com o número de coeficientes, portanto, este é o mais adequado para comparar a melhora de um modelo a partir da inclusão ou exclusão de novos termos. Como demonstrado na TABELA 42, o  $R^2$  ajustado do modelo explica >49% dos dados do modelo. Todos os modelos se mostraram significativos ( $p < 0,05$ ), enquanto com ausência de falta de ajuste ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao sinal/ruído é desejável uma proporção maior que 4. Para todos os analitos os valores foram superiores a este limite, demonstrando um sinal adequado.

TABELA 42. MODELO DE REGRESSÃO DOS EXPERIMENTOS DE BOX-BEHNKEN

Analito	Modelo	Valor de p do modelo	Falta de ajuste	$R^2$	$R^2$ ajustado	S/R
Bosutinibe	2FI	0,0012	0,2880	0,7793	0,6414	8,7946
Dasatinibe	Quadrático	<0,0001	0,1691	0,9305	0,8493	11,3904
Imatinibe	Quadrático	<0,0001	0,2284	0,9297	0,8477	12,1326
Nilotinibe	Quadrático	0,0032	0,5133	0,8602	0,6971	7,4267
Ponatinibe	2FI	0,0084	0,2729	0,7056	0,5216	6,4970
Radotinibe	Linear	<0,0001	0,5520	0,8827	0,8614	19,6769
Oclacitinibe	2FI	0,0126	0,5251	0,6866	0,4907	6,1459

Nota: S/R, sinal ruído;  $R^2$ , coeficiente de determinação; FONTE: O autor (2020)

Na TABELA 43 são apresentadas as equações das regressões modeladas. Estas podem ser usadas para extrapolar os resultados dentro do

intervalo calibrado e gerar superfície de resposta, de maneira a encontrar a condição otimizada.

TABELA 43. COEFICIENTES DE REGRESSÃO DOS ITKS EM RELAÇÃO AOS FATORES

Fator	BOS	DAS	IMA	NILO	PONA	RADO	PI
Int.	96724,6	1,1E+05	1,1E+05	-87714,8	3113,7	1,0E+05	79163,7
A	-409,2	-197,2	-197,2	7623,0	-1978,6	24675,5	14198,6
B	-3549,2	-1,0E+05	-1,0E+05	2,2E+05	4,2E+05	3807,6	-1557,6
C	5,3E+05	-3,6E+05	-3,6E+05	-1,3E+05	1,1E+06	603,7	-2966,0
D	-39961,3	-12413,7	-12413,7	-6467,9	15987,0	-868,8	-2971,5
AB	5072,8	-1426,5	-1426,5	2324,8	9395,8		-1037,8
AC	-6309,0	699,0	699,0	4331,5	2042,5		-4499,5
AD	559,6	78,9	78,9	147,2	315,9		-1766,3
BC	-2,4E+06	9,7E+05	9,7E+05	8,1E+05	-5,0E+06		-6049,3
BD	20468,8	-5207,5	-5207,5	-390,0	-1,1E+05		1142,0
CD	1,4E+05	12510,0	12510,0	89902,5	77992,5		8308,8
A <sup>2</sup>		15,6	15,6	-117,1			
B <sup>2</sup>		1,7E+05	1,7E+05	-4,9E+05			
C <sup>2</sup>		1,2E+05	1,2E+05	-2,6E+06			
D <sup>2</sup>		1388,8	1388,8	-1125,3			

Nota: A, temperatura; B, fluxo; C, ácido fórmico; D, formiato de amônio; BOS, bosutinibe; DAS, dasatinibe; IMA, imatinibe; NILO, nilotinibe; PONA, ponatinibe; RADO, radotinibe; PI, padrão interno; FONTE: O autor (2020)

Como demonstrado, a melhor combinação de fatores consistiu na temperatura de 39 °C, com fluxo de 0,32 mL.min<sup>-1</sup>, e como aditivo ácido fórmico 0,06% e formiato de amônio 3,2 mM (FIGURA 25).

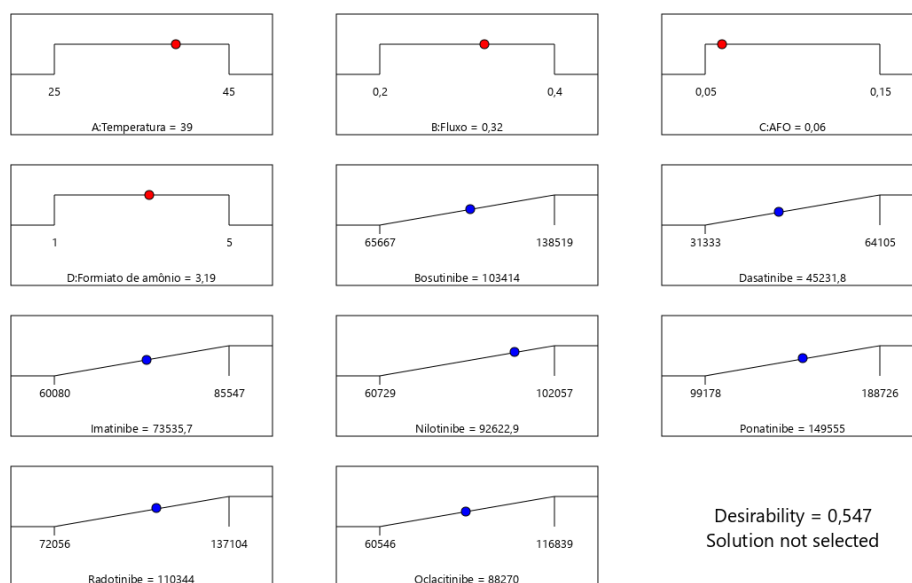


FIGURA 25. COMBINAÇÕES DE FATORES PARA A MAXIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ITKS

FONTE: O autor (2020)

Os resultados obtidos para a análise de confirmação demonstraram que as áreas mensuradas em amostras reais condizem com o predito pela equação (TABELA 44).

TABELA 44. RESULTADOS OBTIDOS PARA A CONFIRMAÇÃO

Resposta	Média predita	Média observada	DP	SE predito	IC 95%
Bosutinibe	103414	91923,8	11685,3	7328,13	87878,8-118949
Dasatinibe	45231,8	39804,8	3895,75	2771,84	39192,5-51271,1
Imatinibe	73535,7	73888,5	2827,79	2011,98	69152-77919,4
Nilotinibe	92622,9	103032	6779,52	4823,65	82113,1-103133
Ponatinibe	149555	135821	16964,3	10638,7	127002-172108
Radotinibe	110344	117907	6727,57	4024,13	101998-118689
Oclacitinibe	88270	81072,5	9533,02	5978,39	75596,3-100944

Nota: DP, desvio padrão, IC, intervalo de confiança; SE, erro padrão; FONTE: O autor (2020)

Após essa etapa de desenvolvimento do método bioanalítico obtivemos o cromatograma apresentado na FIGURA 26. Ainda, na FIGURA 27 são apresentados os espectros extraídos de cada analito e PI no seu respectivo tempo de retenção. Destaca-se a exatidão de massas obtida para o experimento

(erro <5ppm), permitindo a identificação dos analitos mesmo na presença de matriz complexa.

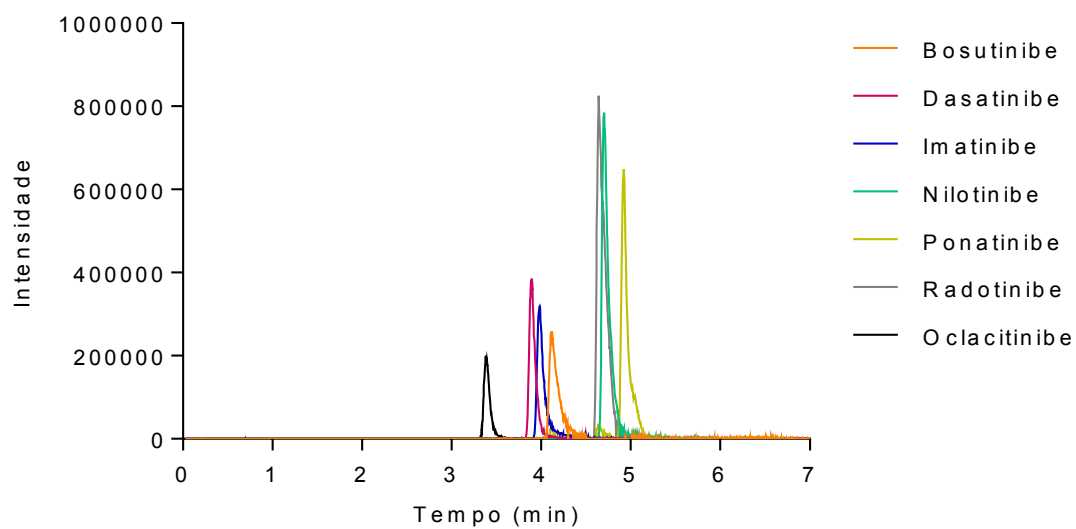


FIGURA 26. CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 100 NG.ML<sup>-1</sup> DOS ANALITOS BOSUTINIBE, DASATINIBE, IMATINIBE, NILOTINIBE, PONATINIBE, RADOTINIBE E OCLACITINIBE (PI)

FONTE: O autor (2020)



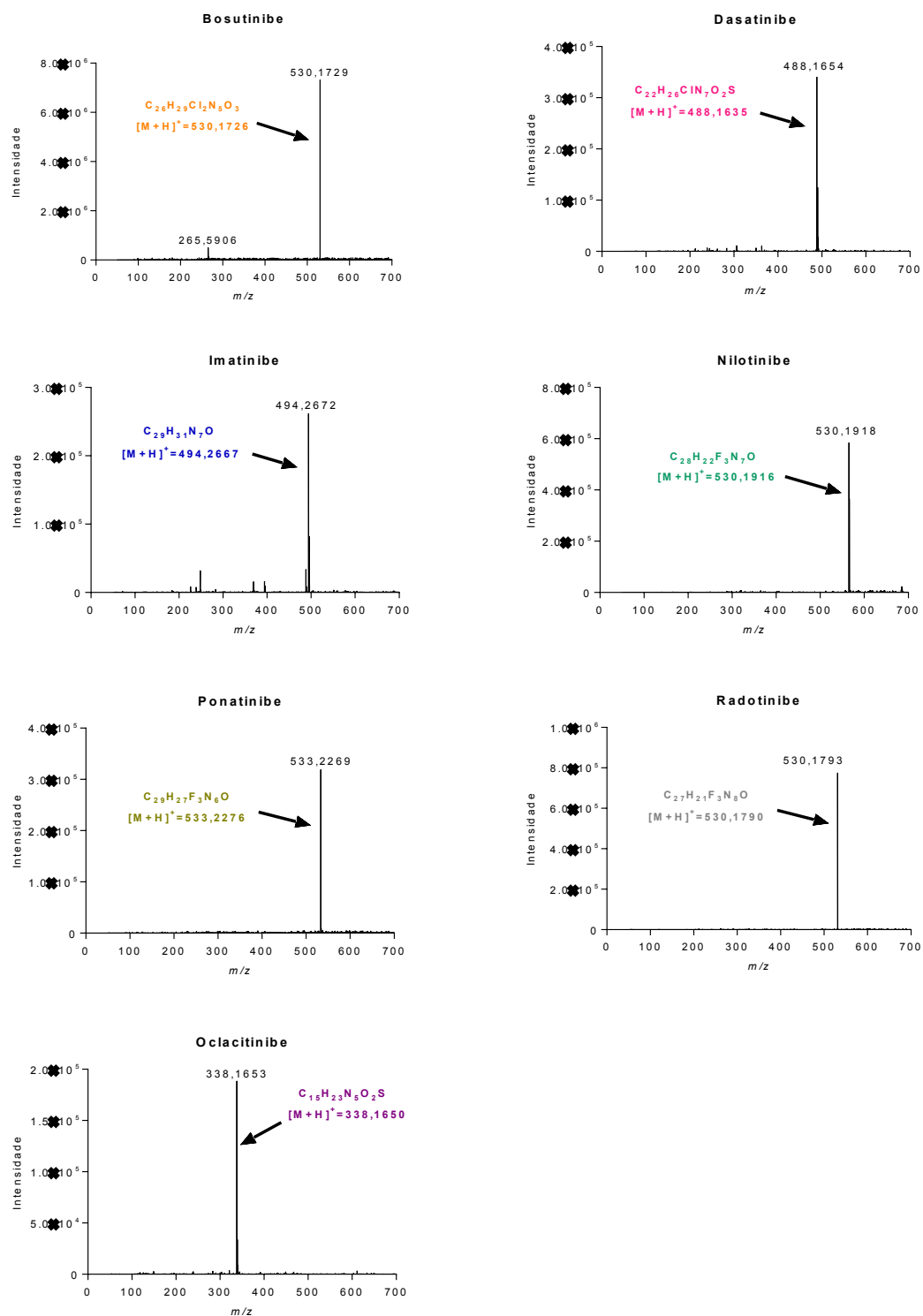


FIGURA 27. ESPECTRO OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM 100 NG.ML<sup>-1</sup> DOS ANALITOS BOSUTINIBE, DASATINIBE, IMATINIBE, NILOTINIBE, PONATINIBE, RADOTINIBE E OCLACITINIBE (PI)

FONTE: O autor (2020)

### **23.3. Validação do método bioanalítico**

#### 23.3.1. Limite inferior de quantificação

O valor obtido de LIQ (relação sinal ruído  $\geq 10$ ) foi de 5 ng.mL<sup>-1</sup> para todos os analitos, apresentando reprodutibilidade satisfatória (DPR < 20%). Desta forma, pode-se afirmar que o método apresenta alta sensibilidade para os fármacos em estudo. Ainda, é importante destacar que este LIQ, com base na literatura, é satisfatório para a condução de estudos de monitoramento terapêutico e farmacocinético destes fármacos.

#### 23.3.2. Seletividade

Como demonstrado na FIGURA 28, as respostas dos picos interferentes nos tempos de retenção dos compostos de interesse foram inferiores a 20% e 5% destes, respectivamente. Portanto, o método foi considerado seletivo.

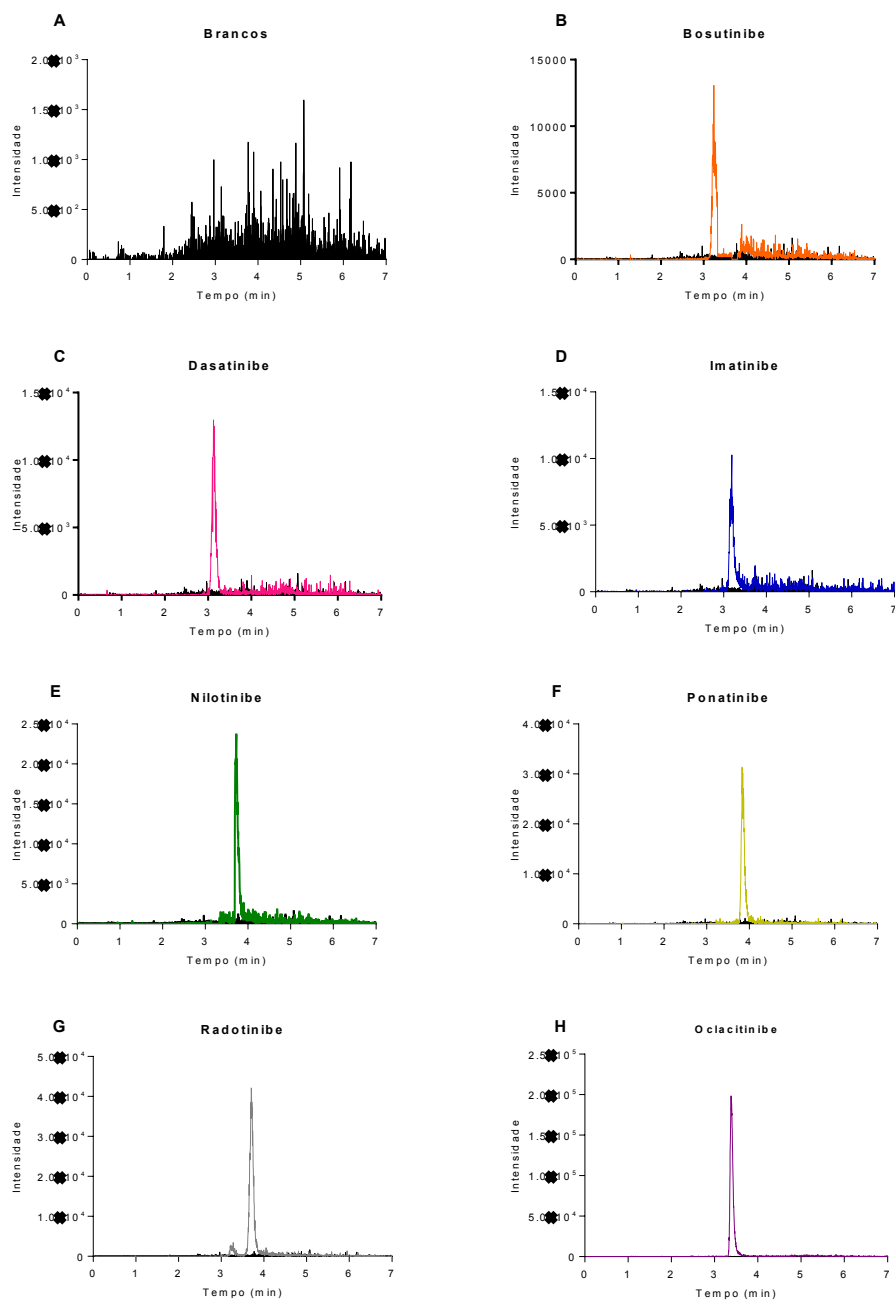


FIGURA 28. SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL, HEMOLISADO E LIPÊMICO (A), JUNTAMENTE COM BOSUTINIBE (B), DASATINIBE (C), IMATINIBE (D), NILOTINIBE (E), PONATINIBE (F), RADOTINIBE (G), E OCLACITINIBE (H)

FONTE: O autor (2020)

### 23.3.3. Curva de calibração

A curva de calibração comprovou que há relação linear entre as áreas dos picos dos analitos divididos pelas áreas dos picos do PI versus a relação da concentração dos analitos sobre a concentração do PI (Figuras FIGURA 28, FIGURA 29, FIGURA 30, FIGURA 31, FIGURA 32, FIGURA 33 e FIGURA 34). Nos três dias de análise a curva atendeu os critérios de aceitação, tendo no mínimo 75% dos níveis de calibração com desvios inferiores a 20% em relação à concentração nominal do LLOQ e 15% para os demais níveis da curva de calibração. Ainda, os índices de correlação foram superiores a 0,98.

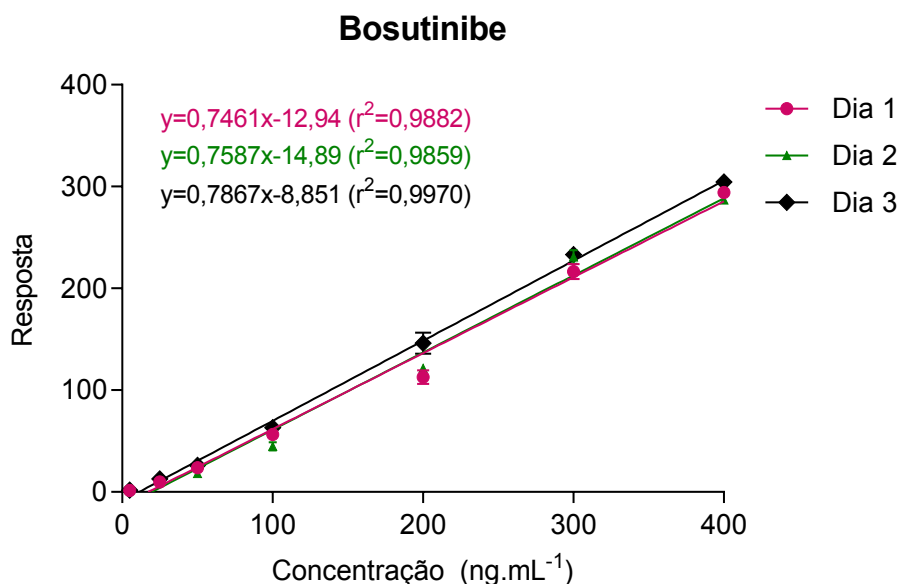


FIGURA 29. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO BOSUTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA

FONTE: O autor (2020)

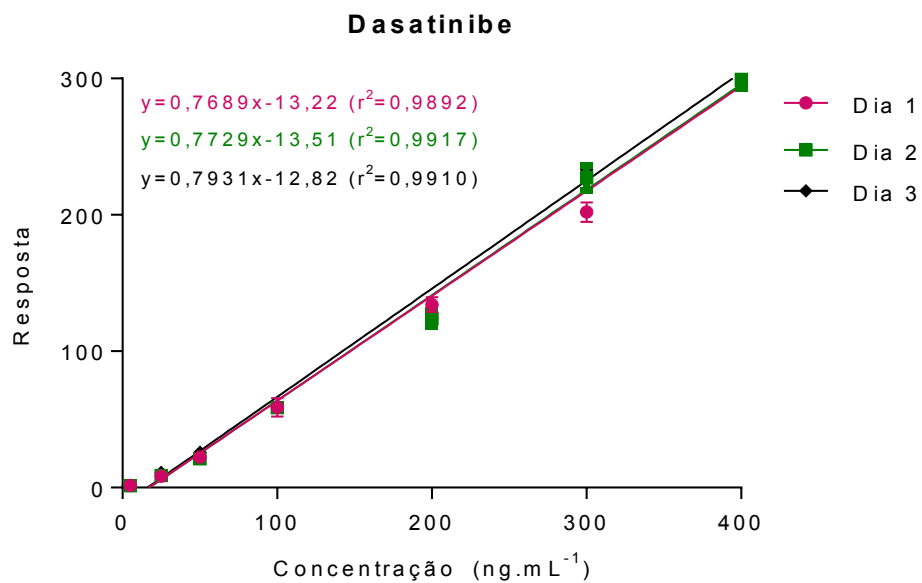


FIGURA 30. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO DASATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA  
 FONTE: O autor (2020)

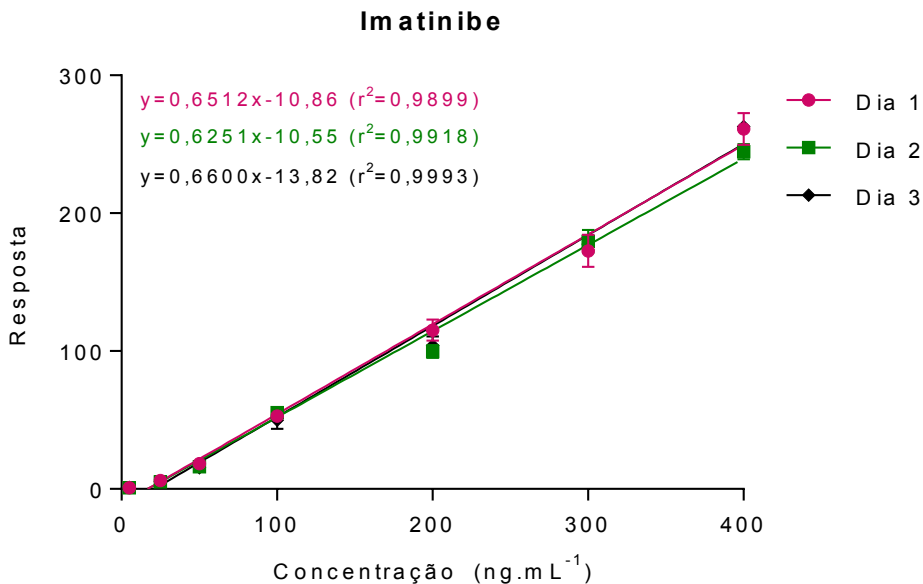


FIGURA 31. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO IMATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA  
 FONTE: O autor (2020)

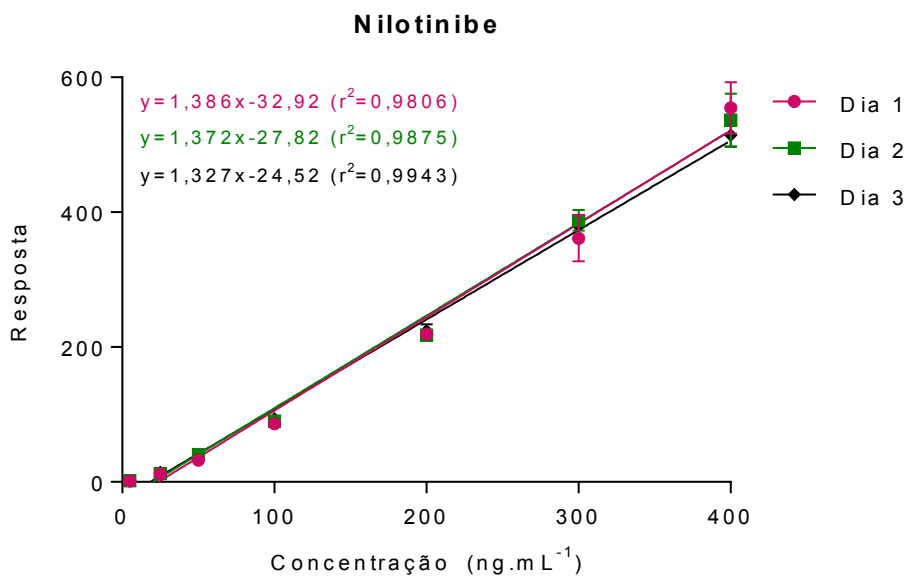


FIGURA 32. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO NILOTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA  
 FONTE: O autor (2020)

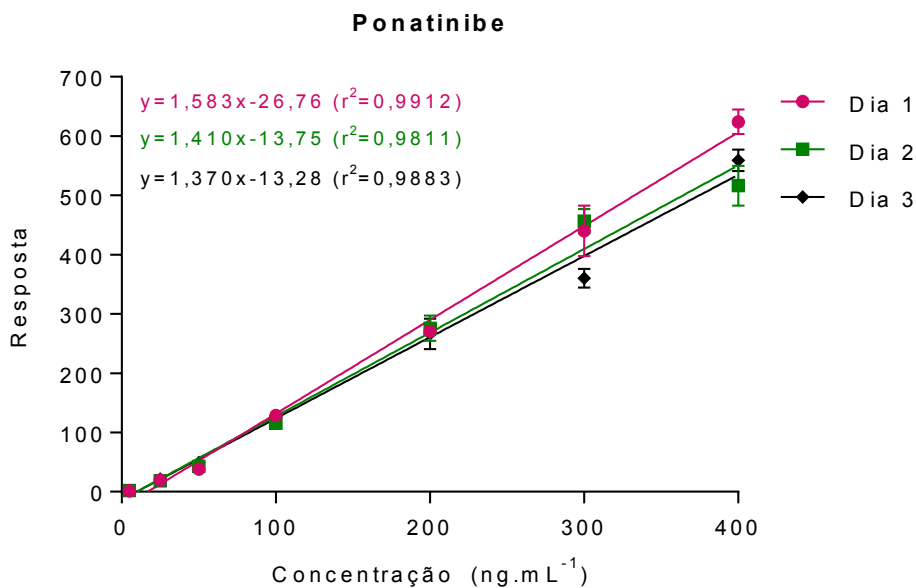


FIGURA 33. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO PONATINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA

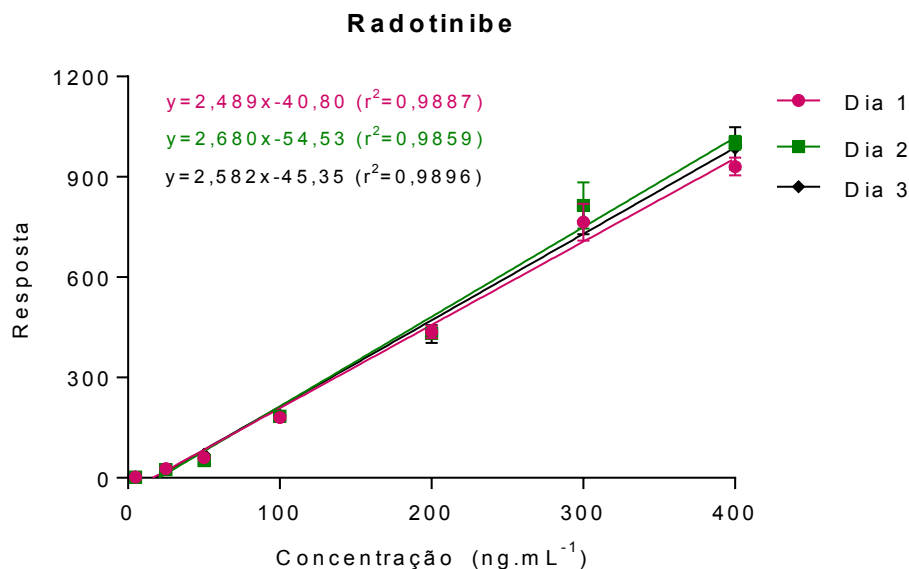


FIGURA 34. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO RADOTINIBE NO INTERVALO DE 5-400 NG.ML<sup>-1</sup> EM PLASMA  
 FONTE: O autor (2020)

Além disso, para todas as curvas de análise, o resultado da ANOVA foi  $p < 0,0001$ , garantindo que o ajuste do modelo de regressão foi estatisticamente significativo. Todas as curvas de calibração para todos os analitos apresentaram alta correlação ( $r=0,99$ ;  $p < 0,001$ ) e determinação ( $R^2=0,99$ ). Em todas as equações das curvas do analito, o coeficiente linear foi estatisticamente igual a zero ( $p > 0,05$ ) e a inclinação foi diferente de zero ( $p < 0,001$ ); portanto, a concentração dos analitos foi prevista apenas pela área. Todas as curvas de calibração apresentaram valores de  $p > 0,05$  para os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, comprovando que os resíduos tiveram distribuição normal e variâncias homogêneas, respectivamente. No teste de Durbin Watson todos os valores foram  $< 2,5$ , demonstrando a ausência do problema de autocorrelação entre os resíduos da regressão.

#### 23.3.4. Precisão e exatidão

O método foi considerado preciso e exato por apresentar valores de DPR e EPR inferiores a 15% para os controles de qualidade CQB, CQM, CQA e CQD e por apresentar valores inferiores a 20% para o CQ-LIQ, tanto na análise intracorrída quanto intercorrída. Os resultados são apresentados na TABELA 45.

TABELA 45. RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Analito	Controle de qualidade	Conc. (ng.mL <sup>-1</sup> )	Intradia – Dia 1 (n=5)		Intradia – Dia 2 (n=5)		Intradia – Dia 3 (n=5)		Interdia (n=15)		ANOVA (p-valor)
			Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	
Bosutinibe	CQ-LIQ	5	13,05	17,91	6,01	13,49	13,05	11,45	5,21	5,24	0,9037
	CQB	25	-3,57	13,85	5,11	7,99	-3,57	13,57	5,13	13,37	0,9757
	CQM	100	-10,99	8,23	-4,46	5,57	-5,48	2,27	3,98	17,97	0,9061
	CQA	300	8,88	6,00	-5,71	9,11	-5,63	4,93	3,01	17,06	0,7055
	CQD	1000	-4,16	3,45	12,57	1,73	-11,06	7,23	10,49	13,66	0,8417
Dasatinibe	CQ-LIQ	5	15,31	18,79	7,72	19,63	8,71	7,24	7,47	10,99	0,9491
	CQB	25	-7,35	11,49	8,89	6,60	-3,24	11,68	2,06	15,33	0,8823
	CQM	100	-9,14	11,48	9,80	3,27	-6,33	8,68	5,49	10,72	0,6255
	CQA	300	-2,08	4,09	13,13	4,78	-0,46	2,71	9,01	1,44	0,5810
	CQD	1000	0,86	3,57	11,94	4,83	14,86	4,02	10,35	4,51	0,7314
Imatinibe	CQ-LIQ	5	6,14	12,53	0,55	12,48553	16,53	13,69	11,77	11,25	0,9293
	CQB	25	-3,86	7,35	-1,62	9,661713	-12,12	5,29	9,82	9,06	0,7479
	CQM	100	-8,57	7,50	1,73	11,44861	-8,48	3,36	4,60	9,81	0,4386
	CQA	300	2,79	0,73	6,85	3,916041	5,31	6,46	1,99	5,15	0,7732
	CQD	1000	12,96	6,72	7,95	4,64	6,43	13,69	3,95	7,57	0,2870
Nilotinibe	CQ-LIQ	5	11,63	11,49	3,89	5,09	11,22	4,81	14,29	13,31	0,9220
	CQB	25	1,62	10,63	12,58	11,37	-14,30	2,63	12,20	11,44	0,6392
	CQM	100	-6,85	2,73	11,33	8,59	-6,14	9,02	0,98	13,39	0,7413
	CQA	300	-7,96	3,15	-11,72	5,94	-5,50	7,25	3,60	4,052	0,5100
	CQD	1000	6,38	1,68	12,96	0,50	9,87	4,20	3,76	1,544	0,2731

Nota: DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo; CQ, controle de qualidade; CQ-LIQ, amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD, amostra de controle de qualidade de diluição; ANOVA, análise de variância; FONTE: O autor (2020)



**Conclusão:** TABELA 45. RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Analito	Controle de qualidade	Conc. (ng.mL <sup>-1</sup> )	Intradia – Dia 1 (n=5)		Intradia – Dia 2 (n=5)		Intradia – Dia 3 (n=5)		Interdia (n=15)		ANOVA (p-valor)
			Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	
Ponatinibe	CQ-LIQ	5	4,45	2,76	17,10	13,87	11,48	9,31	12,28	14,00	0,4013
	CQB	25	-7,92	12,80	-5,59	6,57	1,60	3,28	9,58	7,48	0,3926
	CQM	100	-11,65	7,16	7,57	6,46	-6,49	6,28	8,01	13,16	0,9954
	CQA	300	14,98	6,39	-4,42	7,99	-4,41	6,33	9,34	5,83	0,7661
	CQD	1000	5,07	3,01	1,69	7,67	5,06	9,59	10,42	1,73	0,8022
Radotinibe	CQ-LIQ	5	2,19	16,80	17,42	12,67	8,15	4,48	16,42	16,32	0,7057
	CQB	25	-5,98	9,67	-2,91	11,23	-8,13	5,82	3,56	6,06	0,8104
	CQM	100	-9,29	13,17	7,58	5,15	9,88	7,50	3,85	15,74	0,7911
	CQA	300	2,84	8,98	0,12	4,10	-3,57	4,29	8,15	1,99	0,8228
	CQD	1000	3,77	4,23	10,52	1,62	6,12	6,07	10,48	0,68	0,3929

Nota: DPR, desvio padrão relativo; EPR, erro padrão relativo; CQ, controle de qualidade; CQ-LIQ, amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD, amostra de controle de qualidade de diluição; ANOVA, análise de variância; FONTE: O autor (2020)

### 23.3.5. Recuperação

A recuperação dos analitos foi considerada satisfatória com o método de extração por líquido-líquido com acetato de etila: dietil éter, 58: 42, v/v. Isso porque os valores de recuperação foram superiores a 83% e mostrou-se reprodutível, precisa e consistente (DPR <15%). Os resultados são apresentados na TABELA 46.

TABELA 46. RESULTADOS OBTIDOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ITKS

<b>Analitos</b>	<b>Controle de qualidade</b>	<b>Concentração nominal (ng.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>DPR (%)</b>
Bosutinibe	CQB	25	91,61	4,23
	CQM	100	87,73	10,32
	CQA	300	91,07	7,31
Dasatinibe	CQB	25	95,00	6,14
	CQM	100	96,83	7,03
	CQA	300	91,32	6,88
Imatinibe	CQB	25	85,01	4,77
	CQM	100	86,04	8,32
	CQA	300	90,29	12,20
Nilotinibe	CQB	25	91,91	8,35
	CQM	100	87,35	6,68
	CQA	300	88,66	8,75
Ponatinibe	CQB	25	85,45	9,68
	CQM	100	97,56	5,31
	CQA	300	88,97	7,83
Radotinibe	CQB	25	92,72	10,8
	CQM	100	83,07	9,67
	CQA	300	84,89	2,19
Oclacitinibe	-	200	91,20	4,37

Nota: DPR, desvio padrão relativo; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; FONTE: O autor (2020)

### 23.3.6. Efeito matriz

Através da comparação das áreas dos analitos nas amostras FD e em solução, nota-se que o método não apresentou efeito matriz que comprometa a

análise, pois os valores de FMN e DPR% foram próximos a 1 e inferiores a 15%, respectivamente. Os resultados deste ensaio são apresentados na TABELA 47.

TABELA 47. RESULTADOS OBTIDOS PARA O EFEITO MATRIZ

Analitos	Controle de qualidade	Concentração nominal (ng.mL <sup>-1</sup> )	Média do FMN ± DP	DPR (%)
Bosutinibe	CQB	25	0,938 ± 0,085	11,49
	CQA	300	0,891 ± 0,012	10,30
Dasatinibe	CQB	25	1,290 ± 0,139	8,93
	CQA	300	1,197 ± 0,093	10,23
Imatinibe	CQB	25	0,983 ± 0,074	9,58
	CQA	300	0,912 ± 0,103	5,70
Nilotinibe	CQB	25	1,117 ± 0,123	10,78
	CQA	300	1,102 ± 0,067	4,83
Ponatinibe	CQB	25	0,881 ± 0,043	3,99
	CQA	300	0,916 ± 0,085	13,41
Radotinibe	CQB	25	0,895 ± 0,106	8,52
	CQA	300	0,929 ± 0,088	7,49
Oclacitinibe	-	200	1,002 ± 0,501	2,31

Nota: FMN, fator matriz normalizado, DP, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; FONTE: O autor (2020)

### 23.3.7. Carryover (efeito residual)

O resultado deste ensaio demonstrou não haver *carryover*, visto que as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos e do PI na amostra branco reinjetada foram inferiores a 20% e 5% das respostas dos analitos e PI na amostra processada do LIQ, respectivamente. Os cromatogramas obtidos com plasma branco após as injeções de amostras processadas no LSQ estão apresentados na FIGURA 35.

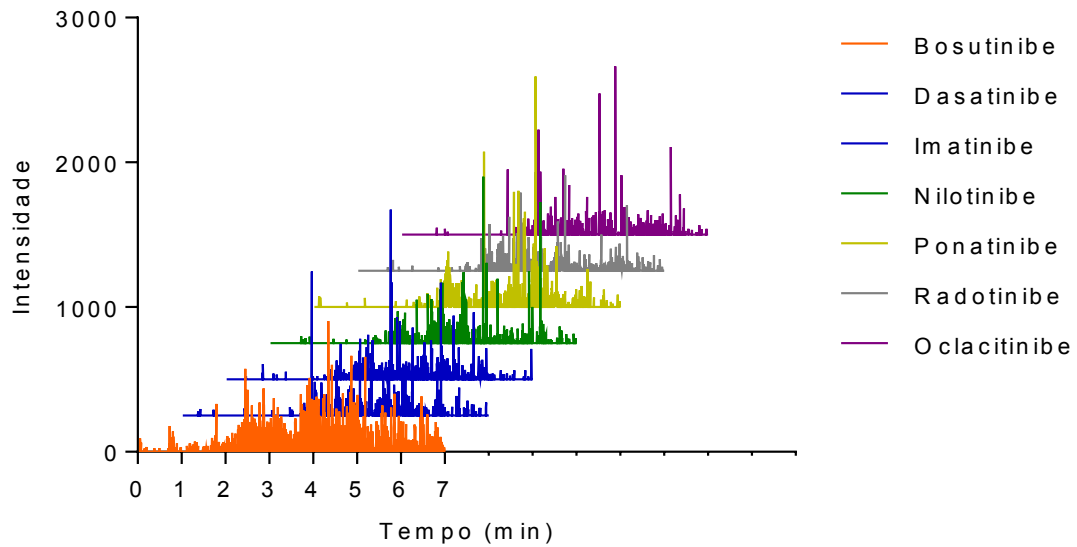


FIGURA 35. CROMATOGRAMAS EXTRAÍDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO NORMAL INJETADAS APÓS A AMOSTRA COM CONCENTRAÇÃO DO LIMITE SUPERIOR DE QUANTIFICAÇÃO

FONTE: O autor (2020)

#### 23.3.8. Estabilidade

Os resultados da avaliação da estabilidade dos ITKs em plasma e solução estão apresentados nas TABELA 48 e TABELA 49, respectivamente. Nota-se que todos os ITKs foram estáveis em matriz biológica na bancada, por 6 horas, em temperatura ambiente (estabilidade de curta duração), após ciclos de -40 °C e temperatura ambientes (estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento), a -40 °C por 30 dias (estabilidade de longa duração) e no gerenciador de amostras (25°C) por 24 horas (estabilidade pós-processamento).

Ainda, as soluções de ITKS foram estáveis tanto em *freezer* a -40 °C por 30 dias quanto em bancada por 6 horas em temperatura ambiente.

TABELA 48. RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS ITKS EM PLASMA

Analito	CQ	DPR (valor de p)			
		Estabil. de curta duração (n=3)	Estabil. após ciclos de congelamento/descongelamento (n=3)	Estabil. de longa duração (n=3)	Estabil. pós-processamento (n=3)
Bosutinibe	CQB	0,23	6,16 (0,43)	1,59 (0,06)	13,11 (0,14)
	CQA	0,04	0,79 (0,43)	3,47(0,10)	10,87 (0,09)
Dasatinibe	CQB	5,86	3,42 (0,39)	5,14 (0,21)	14,47(0,10)
	CQA	12,57	6,58 (0,32)	13,24 (0,32)	4,03(0,33)
Imatinibe	CQB	0,57	2,78 (0,28)	7,98 (0,12)	3,41 (0,22)
	CQA	3,23	5,52 (0,22)	0,58 (0,09)	3,91 (0,11)
Nilotinibe	CQB	4,60	0,79 (0,19)	3,87 (0,43)	2,86(0,33)
	CQA	10,13	5,11(0,44)	2,56 (0,52)	14,96 (0,45)
Ponatinibe	CQB	12,08	1,17 (0,17)	0,34 (0,37)	2,32 (0,49)
	CQA	7,16	11,88 (0,07)	5,29 (0,08)	13,41(0,26)
Radotinibe	CQB	12,65	3,61 (0,28)	9,19 (0,16)	3,96 (0,28)
	CQA	9,59	1,64 (0,40)	1,82 (0,50)	3,28 (0,25)

Nota: Estabil, estabilidade; DPR, desvio padrão relativo; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQ, controle de qualidade; Valor de p por teste t de Student. FONTE: O autor (2020)

TABELA 49. RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS ITKS EM SOLUÇÃO

Analito	Concentração avaliada	DPR (%) e valor de p	
		30 dias (-40 °C) (n=3)	Temperatura ambiente (6 horas) (n=3)
Bosutinibe	100 ng/mL <sup>-1</sup>	5,21 (0,36)	4,09 (0,34)
Dasatinibe		8,77 (0,16)	8,48 (0,15)
Imatinibe		9,96 (0,08)	4,87 (0,49)
Nilotinibe		6,07 (0,39)	4,60 (0,32)
Ponatinibe		3,77 (0,57)	9,11 (0,11)
Radotinibe		4,66 (0,31)	2,43 (0,60)

Nota: DPR, desvio padrão relativo; Valor de p por teste t de Student; FONTE: O autor (2020)

## 24. CONCLUSÃO

O método bioanalítico desenvolvido através do AQbD e validado de acordo com as normas nacionais e internacionais neste trabalho foi satisfatório para a quantificação simultânea dos ITKs (bosutinibe, dasatinibe, imatinibe, nilotinibe, ponatinibe e radotinibe) usados no tratamento da LMC.

A técnica de extração líquido-líquido com acetato de etila:dietil éter, 58:42 v/v, definida através do planejamento experimental do tipo centroide simplex proporcionou recuperação reprodutível e satisfatória para os analitos, além de ser uma técnica simples e rápida.

Através da etapa de validação nota-se que o método é seletivo, sensível, linear, preciso, exato e isento de efeito matriz e residual. Além disso, os ITKs foram estáveis em todas as condições testadas, tanto em matriz quanto em solução.

Este é o primeiro método bioanalítico para monitorização de ITKs desenvolvido com o auxílio do AQbD e que utiliza a técnica analítica de cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, com analisador do tipo quadrupolo tempo-de-voo.

Diante dos resultados adquiridos neste trabalho, este novo método poderá ser aplicado em futuros estudos farmacocinéticos e de monitoramento terapêutico dos ITKs, podendo ser uma ferramenta fundamental no tratamento terapêutico da LMC.

## REFERÊNCIAS

1. Advani AS, Pendergast AM. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res.* 2002;26(8):713-20.
2. Butturini A, Arlinghaus RB, Gale RP. BCR/ABL and leukemia. *Leuk Res.* 1996;20(6):523-9.
3. Vardiman JW. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(2):250-60.
4. Baccarani M, Pileri S, Steegmann JL, Muller M, Soverini S, Dreyling M, et al. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii72-7.
5. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *American journal of hematology.* 2016;91(2):252-65.
6. Kim SH, Menon H, Jootar S, Saikia T, Kwak JY, Sohn SK, et al. Efficacy and safety of radotinib in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica.* 2014;99(7):1191-6.
7. Pushpam D, Bakhshi S. Pharmacology of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia; a clinician's perspective. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2020;28(1):371-85.
8. Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 2015;38(5):645-54.
9. Fassoni AC, Baldow C, Roeder I, Glauche I. Reduced tyrosine kinase inhibitor dose is predicted to be as effective as standard dose in chronic myeloid leukemia: a simulation study based on phase III trial data. *Haematologica.* 2018;103(11):1825-34.
10. Miura M, Takahashi N. [Management using the plasma concentration of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myelogenous leukemia: an update]. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology.* 2019;60(9):1140-7.

11. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1031-7.
12. Rao KV, Iannucci A, Jabbour EMD. Current and Future Clinical Strategies in the LMC. *Pharmacotherapy*. 2010;30(9).
13. Finch SC. Radiation-induced leukemia: lessons from history. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(1):109-18.
14. Hamerschlag N. Leukemia: genetics and prognostic factors. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Suppl):S52-7.
15. Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt S, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000:90-109.
16. Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-30.
17. Fentie AM, Woldu MA, Worku BA. Current Management Approaches of Chronic Myeloid Leukemia. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 2017;9(8):595-607.
18. Society AC. Leukemia--Chronic Myeloid (Myelogenous). 2016.
19. Strom SS, Yamamura Y, Kantarjian HM, Cortes-Franco JE. Obesity, weight gain, and risk of chronic myeloid leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(5):1501-6.
20. Cortes JE, Silver RT, Khouri J, Jantarjian HM. Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer network*. 2016.
21. society Lel. Facts 2014-2015. 2015.
22. Society LL. Chronic Myeloid Leukemia. 2014.
23. MS. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adult - portaria n° 1.219, de 4 de novembro de 2013. 2015.
24. NCCN. Chronic Myelogenous Leukemia. 2016.
25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
26. MS I. Estimativa- incidência de Câncer no Brasil. 2016.
27. Vieira PC. Inibidores da tirosina quinase no tratamento da LMC: uma revisão narrativa 2016.



28. Croce CM, Huebner K, Isobe M, Fainstaint E, Lifshitz B, Shtivelmant E, et al. Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: Order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc Nat Acad Sci*. 1987;84:7174-8.
29. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(6):2343-55.
30. Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. *Genes Cancer*. 2012;3(5-6):436-46.
31. Chen S, Brier S, Smithgall TE, Engen JR. The Abl SH2-kinase linker naturally adopts a conformation competent for SH3 domain binding. *Protein Sci*. 2007;16(4):572-81.
32. Lamontanara AJ, Georgeon S, Tria G, Svergun DI, Hantschel O. The SH2 domain of Abl kinases regulates kinase autophosphorylation by controlling activation loop accessibility. *Nat Commun*. 2014;5:5470.
33. Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;315(3):971-9.
34. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.
35. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med*. 1999;131(3):207-19.
36. Grando AC, Wagner SC. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real-Time PCR. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(6):433-44.
37. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2004;18(3):545-68, vii-viii.
38. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*. 2000;5(5):405-15.
39. Pelletier SD, Hong DS, Hu Y, Liu Y, Li S. Lack of the adhesion molecules P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 accelerate the development of BCR/ABL-induced chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice. *Blood*. 2004;104(7):2163-71.

40. Salessé S, Verfaillie CM. Mechanisms underlying abnormal tracking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene*. 2002;21:8605-11.
41. Fredericks J, Ren R. The role of RAS effectors in BCR/ABL induced chronic myelogenous leukemia. *Front Med*. 2013;7(4):452-61.
42. Jagani Z, Singh A, Khosravi-Far R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1785(1):63-84.
43. Pavlu J, Andreasson C, Chuah C, Kaeda J, Goldman JM, Apperley JF, et al. Dual inhibition of ras and bcr-abl signalling pathways in chronic myeloid leukaemia: a phase I/II study in patients in complete haematological remission. *Br J Haematol*. 2007;137(5):423-8.
44. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*. 2002;16(8):1402-11.
45. Tanaka K, Takauchi K, Takechi M, Kyo T, Dohy H, Kamada N. High frequency of RAS oncogene mutation in chronic myeloid leukemia patients with myeloblastoma. *Leuk Lymphoma*. 1994;13(3-4):317-22.
46. Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol*. 2004;72(6):420-9.
47. Bibi S, Arslanhan MD, Langenfeld F, Jeanningros S, Cerny-Reiterer S, Hadzijusufovic E, et al. Co-operating STAT5 and AKT signaling pathways in chronic myeloid leukemia and mastocytosis: possible new targets of therapy. *Haematologica*. 2014;99(3):417-29.
48. Coppo P, Flamant S, De Mas V, Jarrier P, Guillier M, Bonnet ML, et al. BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br J Haematol*. 2006;134(2):171-9.
49. Ravandi F, Talpaz M, Estrov Z. Modulation of cellular signaling pathways: prospects for targeted therapy in hematological malignancies. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):535-50.
50. Warsch W, Walz C, Sexl V. JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(13):2167-75.

51. Arcaro A, Guerreiro AS. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics*. 2007;8(5):271-306.
52. Balakrishnan K, Peluso M, Fu M, Rosin NY, Burger JA, Wierda WG, et al. The phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-delta and gamma inhibitor, IPI-145 (Duvelisib), overcomes signals from the PI3K/AKT/S6 pathway and promotes apoptosis in CLL. *Leukemia*. 2015;29(9):1811-22.
53. Chaves RN, Lima IMT, Duarte ABG, Buratini Jr. J, Figueiredo JR. Caracterização estrutural do fator de crescimento de fibroblasto-10 (FGF-10) e seu papel na fisiologia folicular ovariana. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011;39(4).
54. Davids MS, Brown JR. Phosphoinositide 3'-kinase inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(2):329-39.
55. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res*. 2005;65(6):2047-53.
56. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627-44.
57. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18(2):189-218.
58. Anazetti MC, Melo PS. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*. 2007;1(1):37-58.
59. Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev bras hematol hemoter*. 2005;27(2):120-5.
60. Chauffaille MLLF. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. *Rev bras hematol hemoter*. 2005;27(2):79-82.
61. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53(3):335-43.
62. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol*. 2012;30(5):488-96.

63. Bueno-da-Silva AEB, Brumatti G, Russo FO, Green DR, Mendes GPA. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10:592-8.
64. Skorska MN, Hoser G, Kossev P, Wasik MA, Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood*. 2002;99(12):4531-9.
65. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(5):547-56.
66. Redaelli A, Bell C, Casagrande J, Stephens J, Botteman M, Laskin B, et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2004;4(1):85-96.
67. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):341-50.
68. Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman IL. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):10002-7.
69. Mughal TI, Goldman JM. Revisión Leucemia mieloide crónica: STI 571 magnifica el dilema terapéutico. *European Journal of Cancer*. 2001;1:303-10.
70. Otero L, Cavalcanti Júnior GB, Klumb CE, Scheiner MAM, Magluta EPS, Fernandez TS, et al. Chromosome 17 abnormalities and mutation of the TP53 gene: Correlation between cytogenetics, flow cytometry and molecular analysis in three cases of chronic myeloid leukemia. *Genetics and Molecular Biology*. 2005;28(1):40-3.
71. Reid AG, De Melo VA, Elderfield K, Clark I, Marin D, Apperley J, et al. Phenotype of blasts in chronic myeloid leukemia in blastic phase-Analysis of bone marrow trephine biopsies and correlation with cytogenetics. *Leuk Res*. 2009;33(3):418-25.
72. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
73. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-302.
74. Chauffaille MLLF. Neoplasias mieloproliferativas- diagnóstico e aspectos clínicos. *Rev bras hematol hemoter*. 2010;32(4):308-16.

75. Stenberg M. Dasatinib: A Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia and Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Therapeutics*. 2007;29(11).
76. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2002;8(5):935-42.
77. Kalidas M, Kantarjian H, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia. *JAMA*. 2001;286(8):895-8.
78. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(11):994-1004.
79. Vinhas R, Cordeiro M, Pedrosa P, Fernandes AR, Baptista PV. Current trends in molecular diagnostics of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(8):1791-804.
80. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041-51.
81. Anunciação SF, Elias LFQ, Guimarães DC, Neto Filho JL, Sadi VA. Aspectos diagnósticos da LMC. *Estudos*. 2008;35(11/12):1069/83.
82. Anand MS, Varma N, Varma S, Rana KS, Malhotra P. Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. *Indian J Med Res*. 2012;135:42-8.
83. Santos IM, Franzon CM, Koga AH. Laboratory diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia and progression to acute leukemia in association with chronic lymphocytic leukemia: morphological features and immunophenotypic profile. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(3):242-4.
84. Byun YJ, Park BB, Lee ES, Choi KS, Lee DS. A case of chronic myeloid leukemia with features of essential thrombocythemia in peripheral blood and bone marrow. *Blood Res*. 2014;49(2):127-9.
85. Michael HNMO, Rasoanandrasana H, Mahenina RT, Sitraka RA, Olivat RAA, Andry R. Confrontation between Myelogram and Cytogenetics in 35 CML Malagasy Patients. *Journal of Cancer Therapy*. 2016;07(12):919-23.

86. Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:263-74.
87. Chauffaille MLLF. Análise citogenética e FISH no monitoramento da LMC em tratamento com inibidores da tirosino quinase. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(1):13-9.
88. Montenegro VS, Santos VMVO, Veith M. Análise citogenética na leucemia mieloide crônica. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2008;10(3):5-12.
89. Fett-Conte AC, Goloni CBV, Homsy CM, Borim LB, Zola PA, Ricci O. Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto - SP. *Revbrashematohemoter*,. 2000;22(3):374-6.
90. Chauffaille Mde L, Oliveira JS, Romeo M, Kerbauy J. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Sao Paulo Med J*. 2001;119(1):16-8.
91. Goloni CBV, Salles ABC, Ricci Junior O, Miguel CE, Fett-Conte AC. Análise do rearranjo BCR/ABL por bandamento GTG e FISH: comparação das freqüências ao diagnóstico da LMC. *Arq Ciênc Saúde*. 2006;13(1):07-11.
92. Morris CM. Chronic myeloid leukemia: cytogenetic methods and applications for diagnosis and treatment. *Methods Mol Biol*. 2011;730:33-61.
93. Mark HF, Sokolic RA, Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Exp Mol Pathol*. 2006;81(1):1-7.
94. Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, El-Hemaidi I, Armitage JD, Akhtari M. An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean J Fam Med*. 2015;36(5):197-202.
95. Simões BP. Avaliação de doença residual mínima pós-transplante de medula óssea. *Medicina*. 2000;33:433-42.
96. Ou J, Vergilio JA, Bagg A. Molecular diagnosis and monitoring in the clinical management of patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol*. 2008;83(4):296-302.
97. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012(63):e3998-e.

98. Caetano-Anollés D. Polymerase Chain Reaction. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 392-5.
99. Wages JM. POLYMERASE CHAIN REACTION. In: Worsfold P, Townshend A, Poole C, editors. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2005. p. 243-50.
100. Sahay T, Schiffer CA. Monitoring minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia after treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Current opinion in hematology*. 2008;15(2):134-9.
101. Luu MH, Press RD. BCR-ABL PCR testing in chronic myelogenous leukemia: molecular diagnosis for targeted cancer therapy and monitoring. *Expert review of molecular diagnostics*. 2013;13(7):749-62.
102. Guilhot J, Preudhomme C, Mahon FX, Guilhot F. Analyzing molecular response in chronic myeloid leukemia clinical trials: pitfalls and golden rules. *Cancer*. 2015;121(4):490-7.
103. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol*. 2015;94 Suppl 2:S141-7.
104. Stansfield L, Hughes TE, Walsh-Chocolaad TL. Bosutinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Ann Pharmacother*. 2013;47(12):1703-11.
105. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):441-53.
106. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr., Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res*. 2010;34(10):1255-68.
107. Shah K, Parikh S, Rawal R. Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia Therapy: a Review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(7):3025-33.
108. Gadzicki D, von Neuhoff N, Steinemann D, Just M, Busche G, Kreipe H, et al. BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;159(2):164-7.

109. Martinelli G, Iacobucci I, Soverini S, Cilloni D, Saglio G, Pane F, et al. Monitoring minimal residual disease and controlling drug resistance in chronic myeloid leukaemia patients in treatment with imatinib as a guide to clinical management. *Hematol Oncol*. 2006;24(4):196-204.
110. Heldin CH, Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(8):a009100.
111. Ganesan P, Sagar TG, Dubashi B, Rajendranath R, Kannan K, Cyriac S, et al. Nonadherence to imatinib adversely affects event free survival in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2011;86(6):471-4.
112. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2381-8.
113. Mazzeo F, Duck L, Joosens E, Dirix L, Focan C, Forget F, et al. Nonadherence to imatinib treatment in patients with gastrointestinal stromal tumors: the ADAGIO study. *Anticancer Res*. 2011;31(4):1407-9.
114. Noens L, van Lierde MA, De Bock R, Verhoef G, Zachee P, Berneman Z, et al. Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. *Blood*. 2009;113(22):5401-11.
115. Reis NF, de Assis JC, Fialho SL, Pianetti GA, Fernandes C. Stability-indicating UHPLC method for determination of nevirapine in its bulk form and tablets: identification of impurities and degradation kinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;126:103-8.
116. Lamontanara AJ, Gencer EB, Kuzyk O, Hantschel O. Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(7):1449-59.
117. Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, et al. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(10):1907-13.



118. Passerini CG, Barni R, Coutre R, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, et al. Role of  $\alpha$ 1 Acid Glycoprotein in the In Vivo Resistance of Human BCR-ABL Leukemic Cells to the Abl Inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(20):1641-50.
119. Diamond J, Silva MG. Mecanismo de resistência aos inibidores de tirosina quinase. *Acta Med Port.* 2013;4:402-8.
120. Cornelison AM, Kantarjian H, Cortes J, Jabbour E. Outcome of treatment of chronic myeloid leukemia with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11 Suppl 1:S101-10.
121. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood.* 2011;118(5):1208-15.
122. Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.* 2007;249(2):121-32.
123. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, 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.* 2000;96(3):1070-9.
124. Aguilera DG, Tsimberidou AM. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2009;5(2):281-9.
125. Breccia M, Salaroli A, Molica M, Alimena G. Systematic review of dasatinib in chronic myeloid leukemia. *Onco Targets Ther.* 2013;6:257-65.
126. Lopes NR, Abreu MTCL. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31:449-53.
127. Cortes J, Kim DW, Raffoux E, Martinelli G, Ritchie E, Roy L, et al. Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia.* 2008;22(12):2176-83.
128. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2531-41.
129. Nam S, Williams A, Vultur A, List A, Bhalla K, Smith D, et al. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Molecular cancer therapeutics.* 2007;6(4):1400-5.

130. Schafranek L, Nievergall E, Powell JA, Hiwase DK, Leclercq T, Hughes TP, et al. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(1):76-85.
131. Blay JY, von Mehren M. Nilotinib: a novel, selective tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol*. 2011;38 Suppl 1:S3-9.
132. Vaid A. Nilotinib as first-line therapy for chronic myeloid leukemia. *Indian J Cancer*. 2011;48(4):438-45.
133. Breccia M, Alimena G. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2010;34(2):129-34.
134. Emole J, Talabi T, Pinilla-Ibarz J. Update on the management of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: role of nilotinib. *Biologics*. 2016;10:23-31.
135. Piccaluga PP, Paolini S, Bertuzzi C, De Leo A, Rosti G. First-line treatment of chronic myeloid leukemia with nilotinib: critical evaluation. *J Blood Med*. 2012;3:151-6.
136. Boschelli F, Arndt K, Gambacorti-Passerini C. Bosutinib: a review of preclinical studies in chronic myelogenous leukaemia. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1781-9.
137. Xu Y, Huang XC, Dai S, Xiao Y, Zhou MT. A simple method for the determination of Bosutinib in rat plasma by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2015;1004:93-7.
138. Fava C, Saglio G. Ponatinib for chronic myeloid leukaemia: future perspectives. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):546-7.
139. Hoy SM. Ponatinib: A Review of Its Use in Adults with Chronic Myeloid Leukaemia or Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*. 2014;74(7):793-806.
140. Prete BD. Ponatinib y bosutinib : nuevos inhibidores de tirosinkinasa. *Hematologia*. 2015;19(3):255-8.
141. Mologni L, Redaelli S, Morandi A, Plaza-Menacho I, Gambacorti-Passerini C. Ponatinib is a potent inhibitor of wild-type and drug-resistant gatekeeper mutant RET kinase. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;377(1-2):1-6.
142. De Falco V, Buonocore P, Muthu M, Torregrossa L, Basolo F, Billaud M, et al. Ponatinib (AP24534) is a novel potent inhibitor of oncogenic RET mutants associated with thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):E811-9.

143. Eskazan AE, Keskin D. Radotinib and its clinical potential in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients: an update. *Ther Adv Hematol*. 2017;8(9):237-43.
144. Burchert A, Neubauer A. Interferon alpha and T-cell responses in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(2):167-75.
145. Talpaz M, Hehlmann R, Quintas-Cardama A, Mercer J, Cortes J. Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27(4):803-12.
146. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, European L. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-50.
147. Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(5-6):459-71.
148. Guilhot F, Roy L, Saulnier PJ, Guilhot J. Interferon in chronic myeloid leukaemia: past and future. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):315-29.
149. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8(3):237-49.
150. Subramaniam PS, Cruz PE, Hobeika AC, Johnson HM. Type I interferon induction of the Cdk-inhibitor p21WAF1 is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene*. 1998;16(14):1885-90.
151. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie*. 2007;89(6-7):884-93.
152. Weng K, Xie X, Qiu G, Gu W. Clinical reagents of GM-CSF and IFN-alpha induce the generation of functional chronic myeloid leukemia dendritic cells in vitro. *Cytotechnology*. 2012;64(1):75-81.
153. Hai X, Guo M, Gao C, Zhou J. Quantification of hydroxyurea in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukaemia. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;137:213-9.
154. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. 2007;13(8 Suppl A):8-12.

155. Nofal A, El-Din ES. Hydroxyurea-induced dermatomyositis: true amyopathic dermatomyositis or dermatomyositis-like eruption? *Int J Dermatol.* 2012;51(5):535-41.
156. Alvandi F, Kwitkowski VE, Ko CW, Rothmann MD, Ricci S, Saber H, et al. U.S. Food and Drug Administration approval summary: omacetaxine mepesuccinate as treatment for chronic myeloid leukemia. *Oncologist.* 2014;19(1):94-9.
157. Chen Y, Li S. Omacetaxine mepesuccinate in the treatment of intractable chronic myeloid leukemia. *Onco Targets Ther.* 2014;7:177-86.
158. Al Ustwani O, Griffiths EA, Wang ES, Wetzler M. Omacetaxine mepesuccinate in chronic myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(16):2397-405.
159. Visani G, Isidori A. Resistant chronic myeloid leukemia beyond tyrosine-kinase inhibitor therapy: which role for omacetaxine? *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(1):1-3.
160. Pavlu J, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? *Blood.* 2011;117(3):755-63.
161. Radich J. Stem cell transplant for chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Semin Hematol.* 2010;47(4):354-61.
162. MS, INCA. Tópicos em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas 2012.
163. Tabak DG. Transplante de medula óssea na leucemia mielóide crônica. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2000;33(3):232-40.
164. Bradburn MJ, Clark TG, Love SB, Altman DG. Survival analysis part II: multivariate data analysis--an introduction to concepts and methods. *British journal of cancer.* 2003;89(3):431-6.
165. Chai-Adisaksopha C, Iorio A, Hillis C, Lim W, Crowther M. A systematic review of using and reporting survival analyses in acute lymphoblastic leukemia literature. *BMC Hematology.* 2016;16(1):17.
166. Lee ET, Go OT. SURVIVAL ANALYSIS IN PUBLIC HEALTH RESEARCH. *Annual review of public health.* 1997;18(1):105-34.
167. Prentice RL, Kalbfleisch JD. *Survival analysis: Overview.* 2015.

168. Clark TG, Bradburn MJ, Love SB, Altman DG. Survival Analysis Part I: Basic concepts and first analyses. *British journal of cancer*. 2003;89(2):232-8.
169. Botelho F, Silva C, Cruz FJAU. Epidemiologia explicada—análise de sobrevivência. 2009;26(4):33-8.
170. Rebas P. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *J Cirugía española*. 2005;78(4):222-30.
171. JAMNIK S, SANTORO IL, UEHARA CJJdP. Comparative study of prognostic factors among longer and shorter survival patients with bronchogenic carcinoma. 2002;28(5):245-9.
172. Lee S, Lim HJG, Informatics. Review of statistical methods for survival analysis using genomic data. 2019;17(4).
173. Kumar D, Klefsjö B. Proportional hazards model: a review. *Reliability Engineering & System Safety*. 1994;44(2):177-88.
174. Lira RPC, Antunes-Foschini R, Rocha EM. Survival analysis (Kaplan-Meier curves): a method to predict the future. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*. 2020;83(2):V-vii.
175. Miot HAJJVB. Análise de sobrevivência em estudos clínicos e experimentais. 2017;16(4):267-9.
176. Austin PC, Latouche A, Fine JPJSim. A review of the use of time-varying covariates in the Fine-Gray subdistribution hazard competing risk regression model. 2020;39(2):103-13.
177. Koletsi D, Pandis NJAjo, orthopedics d. Survival analysis, part 3: Cox regression. 2017;152(5):722-3.
178. Gopalakrishnan S, Ganeshkumar P. Systematic Reviews and Meta-analysis: Understanding the Best Evidence in Primary Healthcare. *Journal of family medicine and primary care*. 2013;2(1):9-14.
179. Higgins JPT TJ, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.1* (updated September 2020). Cochrane, 2020. 2020 [Available from: Available from [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook)].
180. Krnic Martinic M, Pieper D, Glatt A, Puljak L. Definition of a systematic review used in overviews of systematic reviews, meta-epidemiological studies and textbooks. *BMC Medical Research Methodology*. 2019;19(1):203.

181. Pati D, Lorusso LN. How to Write a Systematic Review of the Literature. *HERD: Health Environments Research & Design Journal*. 2017;11(1):15-30.
182. Uman LS. Systematic reviews and meta-analyses. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011;20(1):57-9.
183. Pae C-U. Why Systematic Review rather than Narrative Review? *Psychiatry Investig*. 2015;12(3):417-9.
184. Rother ET. Systematic literature review X narrative review. *J Acta Paulista de Enfermagem*. 2007;20(2):v-vi.
185. Brasil, Saúde Md, Secretaria de Ciência TeIE, Brasil DdCeTJ. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. 2012.
186. Dhammi IK, Haq RU. How to Write Systematic Review or Metaanalysis. *Indian J Orthop*. 2018;52(6):575-7.
187. Kostianen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2003;38(4):357-72.
188. Lim CK, Lord G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2002;25(5):547-57.
189. Kinter M, Sherman NE. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Desiderio DM, Nibbering NMM, editors. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2000.
190. Holcapek M, Kolarova L, Nobilis M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2008;391(1):59-78.
191. Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug discovery today*. 2005;10(20):1357-67.
192. Lanças FMA. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “compatíveis. *Scientia Chromatographica*. 2009;1(2):35-61.
193. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):140-50.
194. Hopfgartner G, Bourgogne E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. 2003;22(3):195-214.

195. Lee MJ, Monte S, Sanderson J, Haskins NJA. A preliminary study using fast gradient Liquid Chromatography coupled to a quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 1999;13(216-221).
196. Ma S, Zhu M. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. *Chemico-biological interactions*. 2009;179(1):25-37.
197. Tonhi E, Collins KE, Jardim ICSF, Collins CH. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*. 2002;25(4):616-23.
198. Maldaner L, Sales C, Jardim F. O estado da arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. *Química Nova*. 2009;32(1):214-22.
199. Russo R, Guilleme D, D TTN, Bicchi C, Rudaz S, Veuthey JL. Pharmaceutical applications on columns packed with sub-2 microm particles. *Journal of chromatographic science*. 2008;46(3):199-208.
200. Nguyen DTT, Guilleme D, Rudra S, Veuthey JL. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Separation Science*. 2006;29(12):1836-48.
201. Klimczak I, Gliszczynska-Swiglo A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food chemistry*. 2015;175:100-5.
202. McIntosh M, fitzgibbon M. Biomarker validation by targeted mass spectrometry. *Nature technology*. 2009;27(7):622-3.
203. Nassar AF, Wu T, Nassar SF, Wisnewski AV. UPLC-MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research. *Drug discovery today*. 2017;22(2):463-70.
204. Parker CE, Borchers CH. Mass spectrometry based biomarker discovery, verification, and validation--quality assurance and control of protein biomarker assays. *Mol Oncol*. 2014;8(4):840-58.
205. Tessitore A, Gaggiano A, Ciccirelli G, Verzella D, Capece D, Fischietti M, et al. Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors. *International journal of proteomics*. 2013;2013:125858.

206. Zhang X, Wei D, Yap Y, Li L, Guo S, Chen F. Mass spectrometry-based "omics" technologies in cancer diagnostics. *Mass spectrometry reviews*. 2007;26(3):403-31.
207. Chen Y, Guo Z, Wang X, Qiu C. Sample preparation. *Journal of chromatography A*. 2008;1184(1-2):191-219.
208. Novakova L, Vlckova H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Anal Chim Acta*. 2009;656(1-2):8-35.
209. Liu X, Locasale JW. *Metabolomics: A Primer*. *Trends in biochemical sciences*. 2017;42(4):274-84.
210. Putri SP, Nakayama Y, Matsuda F, Uchikata T, Kobayashi S, Matsubara A, et al. Current metabolomics: practical applications. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2013;115(6):579-89.
211. Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(4):232-44.
212. Aly AA, Górecki T. Green Approaches to Sample Preparation Based on Extraction Techniques. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020;25(7):1719.
213. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1999;856(1):3-54.
214. Castro-Perez J, Prakash C. Chapter 2 - Recent advances in mass spectrometric and other analytical techniques for the identification of drug metabolites. In: Ma S, Chowdhury SK, editors. *Identification and Quantification of Drugs, Metabolites, Drug Metabolizing Enzymes, and Transporters (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 39-71.
215. Stone J. Chapter 3 - Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. In: Nair H, Clarke W, editors. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. San Diego: Academic Press; 2017. p. 37-62.
216. Alhakeem MA, Ghica MV, Pîrvu CD, Anuța V, Popa LJAMM. Analytical Quality by Design with the Lifecycle Approach: A Modern Epitome for Analytical Method Development. 2019;65(2):37-44.



217. Chatfield MAKBM, Karmarkar EHPJS, Andy AMAMP, Trone RDSMD, Zhao QWZWY. Evaluating Progress in Analytical Quality by Design. 2017.
218. Deidda R, Avohou HT, Baronti R, Davolio PL, Pasquini B, Del Bubba M, et al. Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;166:326-35.
219. Peraman R, Bhadraya K, Padmanabha Reddy Y. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015;2015:868727.
220. Raman NVVSS, Mallu UR, Bapatu HR. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing. *Journal of Chemistry*. 2015;2015:435129.
221. Reid G. Analytical Quality by Design (AQbD) in pharmaceutical development, *Amer. Pharmaceut. Rev.* ttps. 2013.
222. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira- CdS, Saviano AM, Lourenço FR. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD) %J *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54.
223. Weissman SA, Anderson NG. Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. *Organic Process Research & Development*. 2015;19(11):1605-33.
224. Tijare L, Nt R, Un M. A review on bioanalytical method development and validation. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016;9:6.
225. ANVISA. RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012- Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.2012.
226. FDA. Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry2018.
227. Fachi MM, Tonin FS, Leonart LP, Rotta I, Fernandez-Llimos F, Pontarolo R. Haematological adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: A network meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(10):2280-91.
228. Fachi MM, Tonin FS, Leonart LP, Aguiar KS, Lenzi L, Figueiredo BC, et al. Comparative efficacy and safety of tyrosine kinase inhibitors for chronic

myeloid leukaemia: A systematic review and network meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2018;104:9-20.

229. Ylescás-Soria J, de la Torre-Lujan AH, Herrera LA, Miranda D, Grimaldo F, Rivas S, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib at the National Cancer Institute - Mexico, from 2000 to 2016. *Cancer Med*. 2019;8(6):2942-9.

230. Jain P, Kantarjian HM, Ghorab A, Sasaki K, Jabbour EJ, Noguera-Gonzalez G, et al. Prognostic factors and survival outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase in the tyrosine kinase inhibitor era: Cohort study of 477 patients. *Cancer*. 2017;123(22):4391-402.

231. Whiteley J, Iyer S, Candrilli SD, Kaye JA. Treatment patterns and prognostic indicators of response to therapy among patients with chronic myeloid leukemia in Australia, Canada, and South Korea. *Curr Med Res Opin*. 2015;31(2):299-314.

232. Ben Lakhal R, Ghedira H, Bellaaj H, Ben Youssef Y, Menif S, Manai Z, et al. Chronic myeloid leukemia patients in Tunisia: epidemiology and outcome in the imatinib era (a multicentric experience). *Ann Hematol*. 2018;97(4):597-604.

233. Hulikal N, Ray S, Thomas J, Fernandes DJ. Second primary malignant neoplasms: a clinicopathological analysis from a cancer centre in India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(12):6087-91.

234. Zhang Z, Reinikainen J, Adeleke KA, Pieterse ME, Groothuis-Oudshoorn CGM. Time-varying covariates and coefficients in Cox regression models. *Ann Transl Med*. 2018;6(7):121.

235. Ngwa JS, Cabral HJ, Cheng DM, Pencina MJ, Gagnon DR, LaValley MP, et al. A comparison of time dependent Cox regression, pooled logistic regression and cross sectional pooling with simulations and an application to the Framingham Heart Study. *BMC Med Res Methodol*. 2016;16(1):148.

236. Utuama O, Mukhtar F, Pham YT, Dabo B, Manani P, Moser J, et al. Racial/ethnic, age and sex disparities in leukemia survival among adults in the United States during 1973-2014 period. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220864.

237. Castagnetti F, Gugliotta G, Baccharani M, Breccia M, Specchia G, Levato L, et al. Differences among young adults, adults and elderly chronic myeloid leukemia patients. *Ann Oncol*. 2015;26(1):185-92.

238. Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia*. 2005;19(6):984-9.
239. Mandal R, Bolt DM, Shah BK. Disparities in chronic myeloid leukemia survival by age, gender, and ethnicity in pre- and post-imatinib eras in the US. *Acta Oncol*. 2013;52(4):837-41.
240. Zhao Y, Wang Y, Ma S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. *Sci Rep*. 2018;8(1):548.
241. Hoglund M, Sandin F, Hellstrom K, Bjoreman M, Bjorkholm M, Brune M, et al. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population-based Swedish CML registry. *Blood*. 2013;122(7):1284-92.
242. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, Garcia-Manero G, Quintas-Cardama A, Shan J, et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood*. 2012;119(9):1981-7.
243. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53(282):457-81.
244. Radivoyevitch T, Jankovic GM, Tiu RV, Saunthararajah Y, Jackson RC, Hlatky LR, et al. Sex differences in the incidence of chronic myeloid leukemia. *Radiat Environ Biophys*. 2014;53(1):55-63.
245. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):295-302.
246. Phekoo KJ, Richards MA, Moller H, Schey SA, South Thames Haematology Specialist C. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica*. 2006;91(10):1400-4.
247. Beinortas T, Tavoriene I, Zvirblis T, Gerbutavicius R, Jurgutis M, Griskevicius L. Chronic myeloid leukemia incidence, survival and accessibility of tyrosine kinase inhibitors: a report from population-based Lithuanian haematological disease registry 2000-2013. *BMC Cancer*. 2016;16:198.

248. Di Felice E, Roncaglia F, Venturelli F, Mangone L, Luminari S, Cirilli C, et al. The impact of introducing tyrosine kinase inhibitors on chronic myeloid leukemia survival: a population-based study. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1069.
249. Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, Metzgeroth G, Adam K, Lahaye T, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*. 2009;23(3):602-4.
250. Agrawal M, Garg RJ, Kantarjian H, Cortes J. Chronic myeloid leukemia in the tyrosine kinase inhibitor era: what is the "best" therapy? *Curr Oncol Rep*. 2010;12(5):302-13.
251. Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer*. 2003;98(3):437-57.
252. Lucero G, Birman V, Colimodio E, Bertinetti CM, Kotliar N, Murolo P, et al. Nodal T cell blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2000;39(3-4):435-40.
253. Fabarius A, Kalmanti L, Dietz CT, Lauseker M, Rinaldetti S, Haferlach C, et al. Impact of unbalanced minor route versus major route karyotypes at diagnosis on prognosis of CML. *Ann Hematol*. 2015;94(12):2015-24.
254. Gajendra S, Sharma A, Sharma R, Gupta SK, Sood N, Sachdev R. Hodgkin Lymphoma in a Case of Chronic Myeloid Leukemia Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. *Turk Patoloji Derg*. 2019;35(1):74-8.
255. Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, Slupianek A, Stoklosa T, Gloc E, et al. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood*. 2004;104(12):3746-53.
256. Frederiksen H, Farkas DK, Christiansen CF, Hasselbalch HC, Sorensen HT. Chronic myeloproliferative neoplasms and subsequent cancer risk: a Danish population-based cohort study. *Blood*. 2011;118(25):6515-20.
257. Reborá P, Czene K, Antolini L, Gambacorti Passerini C, Reilly M, Valsecchi MG. Are chronic myeloid leukemia patients more at risk for second malignancies? A population-based study. *Am J Epidemiol*. 2010;172(9):1028-33.

258. Curtis RE. New malignancies among cancer survivors: SEER cancer registries, 1973-2000: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health ...; 2006.
259. Duman BB, Paydas S, Disel U, Besen A, Gurkan E. Secondary malignancy after imatinib therapy: eight cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1706-8.
260. Gambacorti-Passerini C, Antolini L, Mahon FX, Guilhot F, Deininger M, Fava C, et al. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(7):553-61.
261. Gugliotta G, Castagnetti F, Breccia M, Albano F, Iurlo A, Intermesoli T, et al. Incidence of second primary malignancies and related mortality in patients with imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017;102(9):1530-6.
262. Gunnarsson N, Stenke L, Hoglund M, Sandin F, Bjorkholm M, Dreimane A, et al. Second malignancies following treatment of chronic myeloid leukaemia in the tyrosine kinase inhibitor era. *Br J Haematol*. 2015;169(5):683-8.
263. Kumar V, Garg M, Chaudhary N, Chandra AB. An observational study on risk of secondary cancers in chronic myeloid leukemia patients in the TKI era in the United States. *PeerJ*. 2018;6:e4342.
264. Miranda MB, Lauseker M, Kraus MP, Proetel U, Hanfstein B, Fabarius A, et al. Secondary malignancies in chronic myeloid leukemia patients after imatinib-based treatment: long-term observation in CML Study IV. *Leukemia*. 2016;30(6):1255-62.
265. Pilot PR, Sablinska K, Owen S, Hatfield A. Epidemiological analysis of second primary malignancies in more than 9500 patients treated with imatinib. *Leukemia*. 2006;20(1):148; author reply 9.
266. Roy L, Guilhot J, Martineau G, Larchee R, Guilhot F. Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2005;19(9):1689-92.
267. Verma D, Kantarjian H, Strom SS, Rios MB, Jabbour E, Quintas-Cardama A, et al. Malignancies occurring during therapy with tyrosine kinase inhibitors

(TKIs) for chronic myeloid leukemia (CML) and other hematologic malignancies. *Blood*. 2011;118(16):4353-8.

268. Voglova J, Muzik J, Faber E, Zackova D, Klamova H, Steinerova K, et al. Incidence of second malignancies during treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitors in the Czech Republic and Slovakia. *Neoplasma*. 2011;58(3):256-62.

269. Shah BK, Ghimire KB. Second primary malignancies in chronic myeloid leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30(4):236-40.

270. Fabarius A, Giehl M, Frank O, Duesberg P, Hochhaus A, Hehlmann R, et al. Induction of centrosome and chromosome aberrations by imatinib in vitro. *Leukemia*. 2005;19(9):1573-8.

271. Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4):1437-40.

272. Helbig G, Bober G, Seweryn M, Wichary R, Tukiendorf A, Sedlak L, et al. Occurrence of secondary malignancies in chronic myeloid leukemia during therapy with imatinib mesylate-single institution experience. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015;7(1):e2015003.

273. Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, et al. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood*. 2005;105(6):2473-9.

274. Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brummendorf TH, Weinschenk T, et al. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1928-40.

275. Roszkiewicz F, Garidi R, Vaida I, Royer B, Parcelier A, Marolleau JP, et al. Tyrosine kinase inhibitors and solid tumours: case report and review of the literature. *Pharmacology*. 2009;84(1):38-41.

276. Bhagavathi S, Borromeo V, Desai H, Crisan D. Case report and literature review: a rare patient with chronic myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Ann Clin Lab Sci*. 2008;38(4):405-9.

277. D'Arena G, Gemei M, Luciano L, D'Auria F, Deaglio S, Statuto T, et al. Chronic lymphocytic leukemia after chronic myeloid leukemia in the same patient:

two different genomic events and a common treatment? *J Clin Oncol.* 2012;30(32):e327-30.

278. Gargallo P, Cacchione R, Chena C, Dupont J, Garay G, Riveros D, et al. Chronic lymphocytic leukemia developing in a patient with chronic myeloid leukemia: evidence of distinct lineage-associated genomic events. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;161(1):74-7.

279. Payandeh M, Sadeghi E, Khodarahmi R, Sadeghi M. Appearance and Disappearance of Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014;8(4):49-53.

280. Teichmann J, Sieber G, Ludwig W-D, Karow J, Ruehl H. Chronic myelocytic leukemia as a second neoplasia in the course of chronic lymphocytic leukemia—Case report and review of the literature. *Leukemia research.* 1986;10(4):361-8.

281. Mossafa H, Fourcade C, Pulic M, Jary L, Cheze S, Szpiro-Tapia S, et al. Chronic lymphocytic leukemia associated with myelodysplastic syndrome and/or chronic myeloid leukemia: evidence for independent clonal chromosomal evolution. *Leuk Lymphoma.* 2001;41(3-4):337-41.

282. Waller CF, Fetscher S, Lange W. Treatment-related chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol.* 1999;78(8):341-54.

283. Yang LH, Su P, Luedke C, Lu CM, Louissaint A, Jr., McCall CM, et al. Chronic Myeloid Leukemia Following Treatment for Primary Neoplasms or Other Medical Conditions: A Report of 21 Cases and Review of the Literature. *Am J Clin Pathol.* 2018.

284. Franzi SA, Amar A, Mendes M, Incerti AR, Zampieri JP, Filho AGM. Leucemia mielóide crônica em paciente com carcinoma epidermóide de região tonsilar submetido à radioterapia pós-operatória. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004;70(6):855-7.

285. Kassar O, Mseddi S, Mdhafter M, Bellaaj H, Mnif S, Ghorbel M, et al. Chronic myeloid leukemia following the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Tunis Med.* 2017;95(3):222.

286. Wang KL, Lin LY, Chen PM, Lin HD. Chronic myeloid leukemia after treatment with 131 for thyroid carcinoma. *J Chin Med Assoc.* 2005;68(5):230-3.

287. Shimon I, Kneller A, Olchovsky D. Chronic myeloid leukaemia following <sup>131</sup>I treatment for thyroid carcinoma: a report of two cases and review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1995;43(5):651-4.
288. Molenaar RJ, Pleyer C, Radivoyevitch T, Sidana S, Godley A, Advani AS, et al. Risk of developing chronic myeloid neoplasms in well-differentiated thyroid cancer patients treated with radioactive iodine. *Leukemia*. 2018;32(4):952-9.
289. Zhang L, Hemminki O, Chen T, Yu H, Zheng G, Chattopadhyay S, et al. Second cancers and causes of death in patients with testicular cancer in Sweden. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214410.
290. Howard R, Gilbert E, Lynch CF, Hall P, Storm H, Holowaty E, et al. Risk of leukemia among survivors of testicular cancer: a population-based study of 42,722 patients. *Ann Epidemiol*. 2008;18(5):416-21.
291. Travis LB, Andersson M, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Bergfeldt K, Lynch CF, et al. Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(14):1165-71.
292. Mukherjee S, Reddy CA, Ciezki JP, Abdel-Wahab M, Tiu RV, Copelan E, et al. Risk for developing myelodysplastic syndromes in prostate cancer patients definitively treated with radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(3):djt462.
293. Al-Husseini MJ, Mohamed HH, Saad AM, Gad MM, Atia M, Qaddoora U, et al. Risk and survival of chronic myeloid leukemia after breast cancer: A population-based study. *Curr Probl Cancer*. 2019;43(3):213-21.
294. Ocakçı S, Görümlü G, Şahin F, Özsan N, Zekioğlu O, Uslu R, et al. Occurrence of chronic myeloid leukemia in two breast cancer survivors after 4 years. *Ege J Med*. 2011;50:141-4.
295. Shuryak I, Sachs RK, Hlatky L, Little MP, Hahnfeldt P, Brenner DJ. Radiation-induced leukemia at doses relevant to radiation therapy: modeling mechanisms and estimating risks. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(24):1794-806.
296. Bauduer F, Ducout L, Dastugue N, Marolleau JP. Chronic myeloid leukemia as a secondary neoplasm after anti-cancer radiotherapy: a report of three cases and a brief review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(5):1057-60.
297. Cuttler JM. Evidence of a Dose Threshold for Radiation-Induced Leukemia. *Dose Response*. 2018;16(4):1559325818811537.



298. Langabeer SE, Burke A, McCarron SL, Kelly J, Carroll P, Browne PV, et al. Chronic myeloid leukaemia presenting post-radiotherapy for prostate cancer: further evidence for an immunosurveillance effect. *Br J Haematol.* 2013;162(5):708-10.
299. Millett R, Aggarwal A, Tabbara I, Nassereddine S. Chronic Myeloid Leukemia as Secondary Malignancy Following the Treatment of Hodgkin Lymphoma: A Case Series. *Anticancer Res.* 2019;39(8):4333-5.
300. Gale RP, Hlatky L, Sachs RK, Radivoyevitch T. Why is there so much therapy-related AML and MDS and so little therapy-related CML? *Leuk Res.* 2014;38(10):1162-4.
301. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Rios MB, Shan J, et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer.* 2003;98(12):2636-42.
302. Jansen JP, Naci H. Is network meta-analysis as valid as standard pairwise meta-analysis? It all depends on the distribution of effect modifiers. *BMC medicine.* 2013;11:159.
303. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0. Cochrane. 2011.
304. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. 2009;339:b2700.
305. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials.* 1996;17(1):1-12.
306. van Valkenhoef G, Tervonen T, Zwinkels T, de Brock B, Hillege H. ADDIS: A decision support system for evidence-based medicine. *Decision Support Systems.* 2013;55(2):459-75.
307. Mbuagbaw L, Rochweg B, Jaeschke R, Heels-Andsell D, Alhazzani W, Thabane L, et al. Approaches to interpreting and choosing the best treatments in network meta-analyses. *Systematic reviews.* 2017;6(1):79.

308. van Valkenhoef G, Dias S, Ades AE, Welton NJ. Automated generation of node-splitting models for assessment of inconsistency in network meta-analysis. *Research synthesis methods*. 2016;7(1):80-93.
309. Dias S, Welton NJ, Sutton AJ, Caldwell DM, Lu G, Ades A. Evidence synthesis for decision making 4: inconsistency in networks of evidence based on randomized controlled trials. *Medical Decision Making*. 2013;33(5):641-56.
310. Baccarani M, Druker BJ, Branford S, Kim DW, Pane F, Mongay L, et al. Long-term response to imatinib is not affected by the initial dose in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: final update from the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity (TOPS) study. *Int J Hematol*. 2014;99(5):616-24.
311. Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, Haznedaroglu I, Porkka K, Abruzzese E, et al. Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood*. 2009;113(19):4497-504.
312. Cortes JE, Baccarani M, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Kim DW, et al. Phase III, randomized, open-label study of daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):424-30.
313. Cortes JE, De Souza CA, Ayala M, Lopez JL, Bullorsky E, Shah S, et al. Switching to nilotinib versus imatinib dose escalation in patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase with suboptimal response to imatinib (LASOR): a randomised, open-label trial. *The Lancet Haematology*. 2016;3(12):e581-e91.
314. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW, et al. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(3):231-+.
315. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, et al. Bosutinib Versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results From the BELA Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(28):3486-92.

316. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boque C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(20):2333-U54.
317. Deininger MW, Kopecky KJ, Radich JP, Kamel-Reid S, Stock W, Paietta E, et al. Imatinib 800 mg daily induces deeper molecular responses than imatinib 400 mg daily: results of SWOG S0325, an intergroup randomized PHASE II trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;164(2):223-32.
318. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Muller MC, Pletsch N, et al. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon-alpha in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1634-42.
319. Hehlmann R, Lauseker M, Saussele S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*. 2017;31(11):2398-406.
320. Hjorth-Hansen H, Stenke L, Soderlund S, Dreimane A, Ehrencrona H, Gedde-Dahl T, et al. Dasatinib induces fast and deep responses in newly diagnosed chronic myeloid leukaemia patients in chronic phase: clinical results from a randomised phase-2 study (NordCML006). *Eur J Haematol*. 2015;94(3):243-50.
321. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30(5):1044-54.
322. Hughes TP, Leber B, Cervantes F, Spector N, Pasquini R, Clementino NCD, et al. Sustained deep molecular responses in patients switched to nilotinib due to persistent BCR-ABL1 on imatinib: final ENESTcmr randomized trial results. *Leukemia*. 2017;31(11):2529-31.
323. Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, Muller MC, Dietz CT, Heinrich L, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia*. 2015;29(5):1123-32.

324. Kantarjian H, Pasquini R, Levy V, Jootar S, Holowiecki J, Hamerschlak N, et al. Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer*. 2009;115(18):4136-47.
325. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-70.
326. Kwak JY, Kim SH, Oh SJ, Zang DY, Kim H, Kim JA, et al. Phase III Clinical Trial (RERISE study) Results of Efficacy and Safety of Radotinib Compared with Imatinib in Newly Diagnosed Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2017;23(23):7180-8.
327. Lipton JH, Chuah C, Guerci-Bresler A, Rosti G, Simpson D, Assouline S, et al. Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(5):612-21.
328. Petzer AL, Fong D, Lion T, Dyagil I, Masliak Z, Bogdanovic A, et al. High-dose imatinib induction followed by standard-dose maintenance in pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia patients—final analysis of a randomized, multicenter, phase III trial. *haematologica*. 2012;97(10):1562-9.
329. Radich JP, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Kamel-Reid S, Stock W, Malnassy G, et al. A randomized trial of dasatinib 100 mg versus imatinib 400 mg in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(19):3898-905.
330. Saglio G, Hochhaus A, Goh YT, Masszi T, Pasquini R, Maloisel F, et al. Dasatinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant chronic myeloid leukemia in blast phase after 2 years of follow-up in a phase 3 study: efficacy and tolerability of 140 milligrams once daily and 70 milligrams twice daily. *Cancer*. 2010;116(16):3852-61.
331. Shah NP, Kim DW, Kantarjian H, Rousselot P, Llacer PE, Enrico A, et al. Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or intolerance to imatinib. *Haematologica*. 2010;95(2):232-40.

332. Wang J, Shen ZX, Saglio G, Jin J, Huang H, Hu Y, et al. Phase 3 study of nilotinib vs imatinib in Chinese patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTchina. *Blood*. 2015;125(18):2771-8.
333. Gambacorti-Passerini C, Brummendorf TH, Kim DW, Turkina AG, Masszi T, Assouline S, et al. Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24-month follow-up. *Am J Hematol*. 2014;89(7):732-42.
334. Bauer S, Romvari E. Interpreting molecular monitoring results and international standardization in chronic myeloid leukemia. *Journal of the advanced practitioner in oncology*. 2012;3(3):151-60.
335. Press RD. Major molecular response in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors: the paradigm for monitoring targeted cancer therapy. *The oncologist*. 2010;15(7):744-9.
336. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008;111(4):1774-80.
337. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37.
338. Baccarani M, Soverini S, De Benedittis C. Molecular monitoring and mutations in chronic myeloid leukemia: how to get the most out of your tyrosine kinase inhibitor. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2014:167-75.
339. Network. NCC. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia version 2.2018. 2017.
340. Network NCC. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia version 1.2016. 2016.
341. Dulucq S, Mahon FX. Deep molecular responses for treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Cancer medicine*. 2016;5(9):2398-411.
342. Hughes TM, Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. *Blood*. 2016;128(1):17-23.

343. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2075-88.
344. Goldman JM. Ponatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2148-9.
345. Dorer DJ, Knickerbocker RK, Baccarani M, Cortes JE, Hochhaus A, Talpaz M, et al. Impact of dose intensity of ponatinib on selected adverse events: Multivariate analyses from a pooled population of clinical trial patients. *Leukemia research*. 2016;48:84-91.
346. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(8):513-26.
347. Pagnano KB, Bendit I, Boquimpani C, De Souza CA, Miranda EC, Zalcborg I, et al. BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors and Impact on Survival. *Cancer investigation*. 2015:1-8.
348. Awidi A, Ababneh N, Magablah A, Bsoul N, Mefleh R, Marei L, et al. ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia in Jordan. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2012;16(11):1317-21.
349. Douxfils J, Haguet H, Mullier F, Chatelain C, Graux C, Dogne JM. Association Between BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors for Chronic Myeloid Leukemia and Cardiovascular Events, Major Molecular Response, and Overall Survival: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA oncology*. 2016:E1-E8.
350. Haguet H, Douxfils J, Mullier F, Chatelain C, Graux C, Dogne JM. Risk of arterial and venous occlusive events in chronic myeloid leukemia patients treated with new generation BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Expert opinion on drug safety*. 2017;16(1):5-12.
351. Jain P, Kantarjian H, Jabbour E, Gonzalez GN, Borthakur G, Pemmaraju N, et al. Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2015;2(9):e376-83.
352. Swords R, Mahalingam D, Padmanabhan S, Carew J, Giles F. Nilotinib: optimal therapy for patients with chronic myeloid leukemia and resistance or intolerance to imatinib. *Drug design, development and therapy*. 2009;3:89-101.

353. Mealing S, Barcena L, Hawkins N, Clark J, Eaton V, Hirji I, et al. The relative efficacy of imatinib, dasatinib and nilotinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a systematic review and network meta-analysis. *Experimental hematology & oncology*. 2013;2(1):5.
354. Signorovitch J, Ayyagari R, Reichmann WM, Wu EQ, Chen L. Major molecular response during the first year of dasatinib, imatinib or nilotinib treatment for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a network meta-analysis. *Cancer treatment reviews*. 2014;40(2):285-92.
355. Jabbour E, Kantarjian H, Cortes J. Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: an evolving treatment paradigm. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2015;15(6):323-34.
356. Yun S, Vincelette ND, Segar JM, Dong Y, Shen Y, Kim DW, et al. Comparative Effectiveness of Newer Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Imatinib in the First-Line Treatment of Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Across Risk Groups: A Systematic Review and Meta-Analysis of Eight Randomized Trials. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2016;16(6):e85-94.
357. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809-20.
358. Jabbour E, Saglio G, Radich J, Kantarjian H. Adherence to BCR-ABL inhibitors: issues for CML therapy. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2012;12(4):223-9.
359. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Szydlo R, et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood*. 2011;117(14):3733-6.
360. de Almeida MH, Fogliatto L, Couto D. Importance of adherence to BCR-ABL tyrosine-kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2014;36(1):54-9.
361. Wu EQ, Guerin A, Yu AP, Bollu VK, Guo A, Griffin JD. Retrospective real-world comparison of medical visits, costs, and adherence between nilotinib and

dasatinib in chronic myeloid leukemia. *Current medical research and opinion.* 2010;26(12):2861-9.

362. Yood MU, Oliveria SA, Cziraky M, Hirji I, Hamdan M, Davis C. Adherence to treatment with second-line therapies, dasatinib and nilotinib, in patients with chronic myeloid leukemia. *Current medical research and opinion.* 2012;28(2):213-9.

363. Kirkizlar O, Eskazanb AE. Adverse events of tyrosine kinase inhibitors and their impact on quality of life in patients with chronic myeloid leukemia. *Expert Review of Quality of Life in Cancer Care.* 2016;1(5):353-9.

364. Rea D. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2015;94 Suppl 2:S149-58.

365. Carneiro BA, Kaplan JB, Giles FJ. Tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: update on key adverse events. *Expert Rev Hematol.* 2015;8(4):457-79.

366. Barber NA, Afzal W, Akhtari M. Hematologic toxicities of small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Target Oncol.* 2011;6(4):203-15.

367. Paul TR, Uppin SG, Uppin MS, Jacob RT, Rao DR, Rajappa SJ. Evaluation of Cytopenias Occurring in Imatinib Treated Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2010;26(2):56-61.

368. Jabbour E, Deininger M, Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(2):201-10.

369. Sneed TB, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Bekele BN, et al. The significance of myelosuppression during therapy with imatinib mesylate in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer.* 2004;100(1):116-21.

370. Ye JY, Chan GC, Qiao L, Lian Q, Meng FY, Luo XQ, et al. Platelet-derived growth factor enhances platelet recovery in a murine model of radiation-induced thrombocytopenia and reduces apoptosis in megakaryocytes via its receptors and the PI3-k/Akt pathway. *Haematologica.* 2010;95(10):1745-53.

371. Demoulin JB, Montano-Almendras CP. Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis. *Am J Blood Res.* 2012;2(1):44-56.



372. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:2443-59.
373. Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(4):615-9.
374. Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood.* 2011;117(19):5198-206.
375. Marin D, Milojkovic D, Bua M, Lavallade H, Andreasson C, Sauramba PR, et al. The use of dasatinib in chronic myeloid leukemia: some practical considerations. *Clinical Leukemia.* 2007;1(4):229-33.
376. Quintas-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;114(2):261-3.
377. Akard L, Kantarjian HM, Nicolini FE, Wetzler M, Lipton JH, Baccarani M, et al. Incidence and management of myelosuppression in patients with chronic- and accelerated-phase chronic myeloid leukemia treated with omacetaxine mepesuccinate. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(3):654-65.
378. Lucas CJ, Martin JH. Pharmacokinetic-Guided Dosing of New Oral Cancer Agents. *Journal of clinical pharmacology.* 2017;57 Suppl 10:S78-S98.
379. Mita A, Abumiya M, Takahashi S, Kameoka Y, Miura M, Takahashi N. Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Bosutinib in Japanese Patients with Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):4271-.
380. Abumiya MM, M.;Takahashi, N. Therapeutic drug monitoring of ponatinib using a simple high-performance liquid chromatography method in Japanese patients. *Leukemia research.* 2018;64:42-5.
381. Adeagbo BAO, T. A.;Bolaji, O. O.;Durosinmi, M. A. Simple HPLC-UV Method for Pharmacokinetic Studies of Imatinib in the Presence of Common Antimalaria Agents. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2015;38(12):1194-8.
382. Arora RS, M.;Monif, T.;Iyer, S. A Multi-centric Bioequivalence Trial in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia Patients to Assess Bioequivalence and Safety

- Evaluation of Generic Imatinib Mesylate 400 mg Tablets. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2016;48(3):1120-9.
383. Boddy AVS, J.;Griffin, M. J.;Garner, C.;Kendrick, J.;Mistry, P.;Dutreix, C.;Newell, D. R.;O'Brien, S. G. Pharmacokinetic investigation of imatinib using accelerator mass spectrometry in patients with chronic myeloid leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(14):4164-9.
384. Bolton AEP, B.;Hubert, M.;Krebs-Brown, A.;Capdeville, R.;Keller, U.;Seiberling, M. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, STI571) in healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004;53(2):102-6.
385. Smith P. The influence of St. John's wort on the pharmacokinetics and protein binding of imatinib mesylate. *Pharmacotherapy*. 2004;24(11):1508-14.
386. Dutreix CP, B.;Mehring, G.;Hayes, M.;Capdeville, R.;Pokorny, R.;Seiberling, M. Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and imatinib mesylate (Glivec) in healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004;54(4):290-4.
387. Egorin MJS, D. D.;Christner, S. M.;Yerk, M. A.;Komazec, K. A.;Appleman, L. R.;Redner, R. L.;Miller, B. M.;Beumer, J. H. Effect of a proton pump inhibitor on the pharmacokinetics of imatinib. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;68(3):370-4.
388. Frye RFF, S. M.;Lagattuta, T. F.;Hruska, M. W.;Egorin, M. J. Effect of St John's wort on imatinib mesylate pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;76(4):323-9.
389. Gambacorti-Passerini CZ, M.;Russo, D.;Frapolli, R.;Verga, M.;Bungaro, S.;Tornaghi, L.;Rossi, F.;Pioltelli, P.;Pogliani, E.;Alberti, D.;Corneo, G.;D'Incalci, M.  $\alpha$ 1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(2):625-32.
390. Jawhari DA, M.;Ghannam, M. Bioavailability of a new generic formulation of imatinib mesylate 400mg tablets versus glivec in healthy male adult volunteers. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*. 2011;3(7):161-4.
391. Jung JAK, N.;Yang, J. S.;Kim, T. E.;Kim, J. R.;Song, G. S.;Kim, H.;Ko, J. W.;Huh, W. Bioequivalence study of two imatinib formulations after single-dose

administration in healthy Korean male volunteers. *Drug research*. 2014;64(12):651-5.

392. Kim KAP, S. J.;Kim, C.;Park, J. Y. Single-dose, randomized crossover comparisons of different-strength imatinib mesylate formulations in healthy Korean male subjects. *Clinical therapeutics*. 2013;35(10):1595-602.

393. le Coutre PK, K. A.;Pursche, S.;von Bonin, M.;Leopold, T.;Baskaynak, G.;Dorcken, B.;Ehninger, G.;Ottmann, O.;Jenke, A.;Bornhauser, M.;Schleyer, E. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004;53(4):313-23.

394. Lee HWS, S. J.;Park, S. M.;Lee, J.;Gwon, M. R.;Kim, H. J.;Lim, S. M.;Lim, M. S.;Kim, W.;Yang, D. H.;Yoon, Y. R. Bioequivalence of a single 400-mg dose of imatinib 100-mg oral tablets and a 400-mg tablet in healthy adult Korean volunteers. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2015;53(6):480-7.

395. Mohajeri EK-K, B.;Pardakhty, A.;Safavi, M.;Ansari, M. Comparative pharmacokinetic evaluation and bioequivalence study of three different formulations of Imatinib Mesylate in CML patients. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. 2015;9(4):165-72.

396. Nikolova ZP, B.;Hubert, M.;Seiberling, M.;Keller, U.;Ho, Y. Y.;Schran, H.;Capdeville, R. Bioequivalence, safety, and tolerability of imatinib tablets compared with capsules. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004;53(5):433-8.

397. Ostrowicz AM, P. L.;Wierzbicka, M.;Boguradzki, P. Bioequivalence study of 400 and 100 mg imatinib film-coated tablets in healthy volunteers. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(5):843-54.

398. Parrillo-Campiglia SE, M. C.;Umpierrez, O.;Rodriguez, P.;Marquez, S.;Guarneri, C.;Estevez-Parrillo, F. T.;Laurenz, M.;Estevez-Carrizo, F. E. Bioequivalence of two film-coated tablets of imatinib mesylate 400 mg: a randomized, open-label, single-dose, fasting, two-period, two-sequence crossover comparison in healthy male South American volunteers. *Clinical therapeutics*. 2009;31(10):2224-32.

399. Peng BD, C.;Mehring, G.;Hayes, M. J.;Ben-Am, M.;Seiberling, M.;Pokorny, R.;Capdeville, R.;Lloyd, P. Absolute bioavailability of imatinib (Glivec

(R)) orally versus intravenous infusion. *Journal of clinical pharmacology*. 2004;44(2):158-62.

400. Peng BH, M.;Resta, D.;Racine-Poon, A.;Druker, B. J.;Talpaz, M.;Sawyers, C. L.;Rosamilia, M.;Ford, J.;Lloyd, P.;Capdeville, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(5):935-42.

401. Schleyer EO, O. G.;Illmer, T.;Pursche, S.;Leopold, T.;Bonin, M.;Freiberg-Richter, J.;Jenke, A.;Platzbecker, U.;Bornhäuser, M.;Ehninger, G.;Le Coutre, P. Pharmacokinetics of imatinib and its main metabolite N-desmethyl-imatinib. *Tumor Diagnostik und Therapie*. 2004;25(4):192-6.

402. Smirnov VVT, O. A.;Khaitov, M. R. Comparative pharmacokinetics and bioequivalence of two imatinib formulations as film-coated tablets, 400 mg. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2013;46(10):622-5.

403. Tawbi HC, S. M.;Lin, Y.;Johnson, M.;Mowrey, E. T.;Cherrin, C.;Chu, E.;Lee, J. J.;Puhalla, S.;Stoller, R.;Appleman, L. R.;Miller, B. M.;Beumer, J. H. Calcium carbonate does not affect imatinib pharmacokinetics in healthy volunteers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;73(1):207-11.

404. Wang YFZ, L.;Dutreix, C.;Leroy, E.;Yin, Q.;Sethuraman, V.;Riviere, G. J.;Yin, O. Q. P.;Schran, H.;Shen, Z. X. Effects of imatinib (Glivec) on the pharmacokinetics of metoprolol, a CYP2D6 substrate, in Chinese patients with chronic myelogenous leukaemia. *British journal of clinical pharmacology*. 2008;65(6):885-92.

405. Yang JSC, E. G.;Huh, W.;Ko, J. W.;Jung, J. A.;Lee, S. Y. Rapid determination of imatinib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2013;34(8):2425-30.

406. Tanaka CY, O. Q.;Smith, T.;Sethuraman, V.;Grouss, K.;Galitz, L.;Harrell, R.;Schran, H. Effects of rifampin and ketoconazole on the pharmacokinetics of nilotinib in healthy participants. *Journal of clinical pharmacology*. 2011;51(1):75-83.

407. Tojo AU, K.;Urabe, A.;Maeda, Y.;Kobayashi, Y.;Jinnai, I.;Ohyashiki, K.;Nishimura, M.;Kawaguchi, T.;Tanaka, H.;Miyamura, K.;Miyazaki, Y.;Hughes, T.;Branford, S.;Okamoto, S.;Ishikawa, J.;Okada, M.;Usui, N.;Tanii,

- H.;Amagasaki, T.;Natori, H.;Naoe, T. A Phase I/II study of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph plus CML or relapsed/refractory Ph plus ALL. *International journal of hematology*. 2009;89(5):679-88.
408. Xia BFH, T.;He, H. D.;Lin, T. H. Nilotinib preclinical pharmacokinetics and practical application toward clinical projections of oral absorption and systemic availability. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2012;33(9):536-49.
409. Yin OQB, V.;McCulloch, T.;Zheng, C.;Zhou, W.;Hussaini, A.;Novick, S. Effects of famotidine or an antacid preparation on the pharmacokinetics of nilotinib in healthy volunteers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(1):219-26.
410. Yin OQG, N.;Tanaka, C.;Fisher, D.;Sethuraman, V.;Zhou, W.;Lin, T. H.;Heuman, D.;Schran, H. Effects of hepatic impairment on the pharmacokinetics of nilotinib: an open-label, single-dose, parallel-group study. *Clinical therapeutics*. 2009;31 Pt 2:2459-69.
411. Yin OQG, N.;Li, A.;Zhou, W.;Harrell, R.;Schran, H. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of nilotinib in healthy participants. *Journal of clinical pharmacology*. 2010;50(2):188-94.
412. Yin OQPG, N.;Fischer, D.;Demirhan, E.;Zhou, W.;Golor, G.;Schran, H. Effect of the proton pump inhibitor esomeprazole on the oral absorption and pharmacokinetics of Nilotinib. *Journal of clinical pharmacology*. 2010;50(8):960-7.
413. Yin OQPR, M.;Galetic, I.;Filian, J.;Krishna, A.;Zhou, W.;Custodio, J.;Golor, G.;Schran, H. Effects of yogurt and applesauce on the oral bioavailability of nilotinib in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacology*. 2011;51(11):1580-6.
414. Zhang HFS, J.;Ko, J. H.;Zheng, C.;Zhou, W.;Priess, P.;Lin, W.;Novick, S. Inhibitory Effect of Single and Repeated Doses of Nilotinib on the Pharmacokinetics of CYP3A Substrate Midazolam. *Journal of clinical pharmacology*. 2015;55(4):401-8.
415. Zhou LM, F. Y.;Yin, O.;Wang, J. X.;Wang, Y.;Wei, Y. Q.;Hu, P.;Shen, Z. X. Nilotinib for Imatinib-Resistant or -Intolerant Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase, Accelerated Phase, or Blast Crisis: A Single- and Multiple-Dose, Open-Label Pharmacokinetic Study in Chinese Patients. *Clinical therapeutics*. 2009;31(7):1568-75.

416. Tawbi HAT, A. L.;Christner, S. M.;Lin, Y.;Johnson, M.;Mowrey, E.;Appleman, L. R.;Stoller, R.;Miller, B. M.;Egorin, M. J.;Beumer, J. H. Calcium carbonate does not affect nilotinib pharmacokinetics in healthy volunteers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;72(5):1143-7.
417. Narasimhan NID, D. J.;Niland, K.;Haluska, F.;Sonnichsen, D. Effects of food on the pharmacokinetics of ponatinib in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2013;38(6):440-4.
418. Narasimhan NID, D. J.;Niland, K.;Haluska, F.;Sonnichsen, D. Effects of ketoconazole on the pharmacokinetics of ponatinib in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology*. 2013;53(9):974-81.
419. Narasimhan NID, D. J.;Davis, J.;Turner, C. D.;Marbury, T. C.;Sonnichsen, D. Evaluation of pharmacokinetics and safety of ponatinib in subjects with chronic hepatic impairment and matched healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;74(2):341-8.
420. Narasimhan NID, D. J.;Davis, J.;Turner, C. D.;Sonnichsen, D. Evaluation of the effect of multiple doses of rifampin on the pharmacokinetics and safety of ponatinib in healthy subjects. *Clinical pharmacology in drug development*. 2015;4(5):354-60.
421. Tojo AK, T.;Yamamoto, K.;Nakamae, H.;Takahashi, N.;Kobayashi, Y.;Tauchi, T.;Okamoto, S.;Miyamura, K.;Hatake, K.;Iwasaki, H.;Matsumura, I.;Usui, N.;Naoe, T.;Tugnait, M.;Narasimhan, N. I.;Lustgarten, S.;Farin, H.;Haluska, F.;Ohyashiki, K. Ponatinib in Japanese patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia, a phase 1/2 study. *International journal of hematology*. 2017;106(3):385-97.
422. Abbas RC, S.;Leister, C.;El Gaaloul, M.;Sonnichsen, D. Evaluation of the pharmacokinetics and safety of bosutinib in patients with chronic hepatic impairment and matched healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(1):123-32.
423. Abbas RH, B. A.;Leister, C.;Sonnichsen, D. A randomized, crossover, placebo- and moxifloxacin-controlled study to evaluate the effects of bosutinib (SKI-606), a dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, on cardiac repolarization in healthy adult subjects. *International journal of cancer*. 2011;131(3):E304-11.

424. Abbas RH, B. A.;Leister, C.;Burns, J.;Sonnichsen, D. Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of oral bosutinib in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology*. 2011;51(12):1721-7.
425. Abbas RH, B. A.;Leister, C.;Gaaloul, M. E.;Chalon, S.;Sonnichsen, D. A phase I ascending single-dose study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of bosutinib (SKI-606) in healthy adult subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2012;69(1):221-7.
426. Abbas RL, C.;El Gaaloul, M.;Chalon, S.;Sonnichsen, D. Ascending single-dose study of the safety profile, tolerability, and pharmacokinetics of bosutinib coadministered with ketoconazole to healthy adult subjects. *Clinical therapeutics*. 2012;34(9):2011-9.e1.
427. Abbas RL, C.;Sonnichsen, D. A clinical study to examine the potential effect of lansoprazole on the pharmacokinetics of bosutinib when administered concomitantly to healthy subjects. *Clinical drug investigation*. 2013;33(8):589-95.
428. Hsyu PHP, D. S.;Matschke, K. Effect of aprepitant, a moderate CYP3A4 inhibitor, on bosutinib exposure in healthy subjects. *European journal of clinical pharmacology*. 2016;73(1):49-56.
429. Nakaseko CT, N.;Ishizawa, K.;Kobayashi, Y.;Ohashi, K.;Nakagawa, Y.;Yamamoto, K.;Miyamura, K.;Taniwaki, M.;Okada, M.;Kawaguchi, T.;Shibata, A.;Fujii, Y.;Ono, C.;Ohnishi, K. A phase 1/2 study of bosutinib in Japanese adults with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *International journal of hematology*. 2015;101(2):154-64.
430. Kim DWT, E. Y.;Jin, Y.;Park, S.;Hayes, M.;Demirhan, E.;Schran, H.;Wang, Y. Effects of imatinib mesylate on the pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) in Korean patients with chronic myelogenous leukaemia. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(2):199-206.
431. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre PD, Paquette R, Chuah C, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood*. 2018;132(4):393-404.
432. Heiblig M, Rea D, Chretien ML, Charbonnier A, Rousselot P, Coiteux V, et al. Ponatinib evaluation and safety in real-life chronic myelogenous leukemia patients failing more than two tyrosine kinase inhibitors: the PEARL observational study. *Exp Hematol*. 2018;67:41-8.

433. Luciano L, Specchia G, Martino B, Accurso V, Santoro M, Malato A, et al. A Real Life Evaluation of Efficacy and Safety of Ponatinib Therapy in CML Patients. 2017;130:2905-.
434. Iurlo A, Cattaneo D, Malato A, Accurso V, Annunziata M, Gozzini A, et al. Low-dose ponatinib is a good option in chronic myeloid leukemia patients intolerant to previous TKIs. American journal of hematology. 2020.
435. Teo YL, Ho HK, Chan A. Metabolism-related pharmacokinetic drug-drug interactions with tyrosine kinase inhibitors: current understanding, challenges and recommendations. Br J Clin Pharmacol. 2015;79(2):241-53.
436. Mikus G, Foerster K. Role of CYP3A4 in kinase inhibitor metabolism and assessment of CYP3A4 activity. Translational Cancer Research. 2017;6:S1592-S9.
437. Rowland A, van Dyk M, Mangoni AA, Miners JO, McKinnon RA, Wiese MD, et al. Kinase inhibitor pharmacokinetics: comprehensive summary and roadmap for addressing inter-individual variability in exposure. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2017;13(1):31-49.
438. Braz CdL, Figueiredo TPd, Barroso SCC, Reis AMM. Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. 2018.
439. Hussaarts KGAM, Veerman GDM, Jansman FGA, van Gelder T, Mathijssen RHJ, van Leeuwen RWF. Clinically relevant drug interactions with multikinase inhibitors: a review. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 2019;11:1758835918818347.
440. Ye YE, Woodward CN, Narasimhan NI. Absorption, metabolism, and excretion of [14C]ponatinib after a single oral dose in humans. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2017;79(3):507-18.
441. Gougis P, Palmieri LJ, Funck-Brentano C, Paci A, Flippot R, Mir O, et al. Major pitfalls of protein kinase inhibitors prescription: A review of their clinical pharmacology for daily use. Crit Rev Oncol Hematol. 2019;141:112-24.
442. Kang JS, Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. The Korean journal of internal medicine. 2009;24(1):1-10.
443. Abumiya M, Miura M, Takahashi N. Therapeutic drug monitoring of ponatinib using a simple high-performance liquid chromatography method in Japanese patients. Leuk Res. 2018;64:42-5.



444. D'Avolio A, Simiele M, De Francia S, Ariaudo A, Baietto L, Cusato J, et al. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). *J Pharm Biomed Anal.* 2012;59:109-16.
445. De Francia S, D'Avolio A, De Martino F, Pirro E, Baietto L, Siccardi M, et al. New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(18-19):1721-6.
446. Herbrink M, de Vries N, Rosing H, Huitema AD, Nuijen B, Schellens JH, et al. Quantification of 11 Therapeutic Kinase Inhibitors in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring Using Liquid Chromatography Coupled With Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic drug monitoring.* 2016;38(6):649-56.
447. Huynh HH, Pressiat C, Sauvageon H, Madelaine I, Maslanka P, Lebbé C, et al. Development and Validation of a Simultaneous Quantification Method of 14 Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma Using LC-MS/MS. *Therapeutic drug monitoring.* 2017;39(1):43-54.
448. Lankheet NA, Hillebrand MJ, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH, Huitema AD. Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC.* 2013;27(4):466-76.
449. Pirro E, De Francia S, De Martino F, Fava C, Ulisciani S, Cambrin GR, et al. A new HPLC-UV validated method for therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors in leukemic patients. *Journal of chromatographic science.* 2011;49(10):753-7.
450. Rezende VM, Rivellis AJ, Gomes MM, Dörr FA, Novaes MMY, Nardinelli L, et al. Determination of serum levels of imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia: validation and application of a new analytical method to monitor treatment compliance. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia.* 2013;35(2):103-8.
451. Zeng J, Cai H, Jiang Zp, Wang Q, Zhu Y, Xu P, et al. A validated UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of imatinib, dasatinib and nilotinib in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 2017;7(6):374-80.

452. Zhuang W, Qiu HB, Chen XM, Yuan XH, Yang LF, Sun XW, et al. Simultaneous quantification of imatinib and its main metabolite N-demethyl-imatinib in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to therapeutic drug monitoring in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Biomedical chromatography : BMC*. 2017;31(12).
453. Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;147:590-611.
454. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE-PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2), (2008).