



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

MÁILLA REBOUÇAS VIANA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR (FISH) DE
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM
TERAPIA COM INIBIDORES DE TIROSINO QUINASE NO
ESTADO DA BAHIA**

**Salvador
2012**

MÁILLA REBOUÇAS VIANA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR (FISH) DE
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM
TERAPIA COM INIBIDORES DE TIROSINO QUINASE NO
ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-Orientadora: Dra. Maura Alice Santos Romeo

**Salvador
2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela
**Biblioteca do Hospital Universitário Professor Edgard Santos-HUPES-Salvador-
Bahia**

V 614 Viana, Máilla Rebouças,
Análise Citogenética e Molecular (FISH) de pacientes com Leucemia
Mielóide Crônica em terapia com Inibidores de tirosino quinase no Estado da Bahia /
Máilla Rebouças Viana: Salvador, 2012.
74f.

Orientadora: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-Orientadora: Dr.^a Maura Alice Santos Romeo

Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas)

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Leucemia mielóide crônica 2. Citogenética. 3. Hibridização *in situ*
fluorescente. 4. Cromossomo Philadelphia. I. Nascimento, Roberto José Meyer. II.
Romeo, Maura Alice Santos. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU: 616.155.392

MÁILLA REBOUÇAS VIANA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR (FISH) DE
PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM
TERAPIA COM INIBIDORES DE TIROSINO QUINASE NO
ESTADO DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, UFBA:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento _____
Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia-UFBA,
Salvador, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Bruno Antônio Veloso Cerqueira _____
Doutor em Patologia Humana pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ,
Salvador, Brasil
Universidade Estadual de Santa Cruz

Dra. Carla Valladares Vignal _____
Doutora em Medicina (Hematologia) pela Universidade Federal de São Paulo/Escola
Paulista de Medicina-UNIFESP/EPM, São Paulo, Brasil
HEMOBA- Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia

Aos pacientes com câncer, especialmente Leucemia
Mielóide Crônica, que suportam a doença e
entendem a importância de estudos como esse,
apesar de todo sofrimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre guia meus passos e prepara meus caminhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

A minha co-orientadora Dra. Maura Alice Santos Romeo, pela paciência, compreensão, disponibilidade e pelo apoio, fundamentais para todas as etapas e conclusão desse estudo.

Ao apoio de uma excelente profissional, Sissi Carneiro, cuja colaboração foi de fundamental importância para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha mãe, Marlene Rebouças, essencial para o meu sucesso sempre e que com muito carinho, apoio e dedicação, não mediu esforços para que eu vencesse essa e todas as outras etapas da minha vida.

Ao meu segundo pai, Paulo Gomes, que sempre fez o possível, com muita dedicação, para que eu chegasse aonde cheguei.

Ao meu pai, Jânio Viana e minha irmã, Jéssica Rebouças, que sempre apoiaram minhas decisões.

A Rodrigo Laudano, meu companheiro, e toda sua família, pelo apoio e incentivo nos momentos de desânimo.

A Marcos Silva e Bruno Bastos, pela ajuda fundamental.

A equipe da citogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgar Santos-HUPES pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Roberto Paulo, aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, da UFBA, por me auxiliarem na resolução de problemas e pela oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, obrigada pelo aprendizado compartilhado, amadurecimento pessoal e principalmente por ter tornado essa fase muito mais agradável.

E, sobretudo aos pacientes com câncer que, além de contribuírem com a realização da pesquisa, tornaram-se uma inspiração para toda vida. Um especial agradecimento a uma grande amiga, Renata Dias, que com sua força conseguiu vencer essa doença e foi a principal responsável pela minha iniciativa de desenvolver esse trabalho.

Muito Obrigada.

VIANA, Máilla Rebouças. **Análise Citogenética e Molecular (FISH) de Pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em Terapia com Inibidores de Tirosino Quinase no Estado da Bahia.** 74f. 2012. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2012.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph). Este cromossomo, observado por técnicas citogenéticas convencionais, é resultante da translocação $t(9;22)(q34;q11)$ que justapõe o rearranjo BCR-ABL, observado por técnicas moleculares. A detecção desse cromossomo ou do rearranjo é fundamental, pois não somente contribui para o diagnóstico, mas também interfere no acompanhamento e no sucesso da terapia utilizada. O rearranjo BCR-ABL possui atividade tirosina quinase elevada, o que levou ao desenvolvimento de novos fármacos inibidores desta ação, conhecidos como inibidores de tirosino quinase (TKI). **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi demonstrar a importância da utilização da técnica de citogenética molecular (Fluorescent *in situ* Hybridization - FISH) aliada a citogenética clássica no monitoramento de pacientes com LMC em terapia com TKI, no Estado da Bahia. **METODOLOGIA:** Foram analisadas amostras de medula óssea de 20 pacientes com LMC, em tratamento com TKI, encaminhados ao Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, utilizando as técnicas de citogenética clássica e FISH. **RESULTADOS:** Resultados obtidos demonstraram que o cromossomo Ph foi observado em 15%, com a citogenética clássica, e o rearranjo BCR-ABL em 90%, com a citogenética molecular. Outro ponto importante foi que em alguns casos o resultado só foi possível com a técnica molecular, pois a técnica convencional não foi suficiente pela impossibilidade na análise das metáfases, devido a fatores como falta de crescimento celular. **CONCLUSÃO:** A técnica de FISH demonstrou maior sensibilidade nos casos que a citogenética clássica não detectou o cromossomo Ph, entretanto as duas técnicas foram fundamentais para os resultados obtidos por apresentarem vantagens e desvantagens em relação à outra e, portanto, devem ser usadas de maneira complementar no monitoramento de pacientes com LMC em tratamento com TKI.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia Mielóide Crônica; Citogenética; Fluorescent *in situ* Hybridization; Cromossomo Philadelphia.

VIANA, Máilla Rebouças. **Molecular and Cytogenetic Analysis (FISH) of Patients with Chronic Myeloid Leukemia in the Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in the State of Bahia.** 74f. 2012. Thesis (MA) - Institute of Health Sciences (ICS), Federal University of Bahia (UFBA), 2012.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative disorder characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph). This chromosome, observed by conventional cytogenetic techniques, is the result of a translocation t (9;22) (q34;q11) that juxtaposes the BCR-ABL rearrangement, observed by molecular techniques. The detection of chromosome rearrangement or is critical because not only contributes to diagnosis but also interfere with the monitoring and the success of the therapy. The rearrangement BCR-ABL tyrosine kinase has a high activity, which led to the development of new drugs that inhibit this action, known as tyrosine kinase inhibitors (TKI). **OBJECTIVE:** The target of this study was to demonstrate the importance of using the technique of molecular cytogenetic (Fluorescent *in situ* Hybridization - FISH) combined with classical cytogenetic for monitoring patients with CML TKI therapy in the State of Bahia. **METHODS:** We analyzed bone marrow samples from 20 patients with CML treated with TKIs, referred to the Division of Medical Genetics, University Hospital Prof. Edgard Santos, using the techniques of classical cytogenetic and FISH. **RESULTS:** The results showed that the Ph chromosome was observed in 15%, with classical cytogenetic and BCR-ABL rearrangement in 90%, with molecular cytogenetic. Another important point was that in some cases the result was only reached with the molecular technique, because the conventional technique was not sufficient for the analysis of metaphases' impossibility, due to factors such as lack of cell growth. **CONCLUSION:** The FISH technique demonstrated a greater sensitivity in cases that classical cytogenetic analysis have failed to detect the Ph chromosome, however both techniques were key to achieve the results because those techniques have advantages and disadvantages over the other and, therefore should be used as a way additional monitoring of CML patients treated with TKI.

KEYWORDS: Chronic Myeloid Leukemia; Cytogenetic; Fluorescent *in situ* Hybridization; Chromosome Philadelphia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ideograma dos cromossomos humanos	17
Figura 2	Princípios básicos da técnica de FISH	19
Figura 3	Esquema representativo da sonda LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans CML, ALL)	20
Figura 4	Mecanismo de ação do imatinibe	29
Figura 5	Preparação da amostra para realização dos exames citogenéticos clássico e molecular (FISH)	38
Figura 6	Passos para o resultado na citogenética clássica	40
Figura 7	Passos para o resultado na citogenética molecular (FISH)	41
Figura 8	Variáveis clínicas dos pacientes positivos na técnica clássica	44
Figura 9	Variáveis clínicas dos pacientes positivos na técnica molecular	45
Figura 10	Tempo de uso do TKI nos 20 pacientes do estudo	49
Figura 11	Evolução citogenética e terapêutica dos pacientes do estudo	49
Figura 12	Comparação entre os resultados das técnicas clássica e molecular (FISH). Teste X^2	51
Figura 13	Percentual de alterações nas técnicas citogenéticas. Teste de Mann- Whitney	53
Figura 14	Ilustração do cariótipo de um caso normal	53
Figura 15	Ilustração do cariótipo de um caso alterado, paciente com t(9;22)	54
Figura 16	Ilustração do cariótipo de um caso alterado, paciente com trissomia do cromossomo 8	54
Figura 17	Ilustração da FISH com sonda a LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans. Em A e B, casos normais com presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes	55
Figura 18	Ilustração da FISH com sonda a LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans. Em C e D, casos alterados com uma fusão representando a t(9;22), um sinal verde e um sinal vermelho	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos dos pacientes	43
Tabela 2	Citogenética clássica ao diagnóstico, inibidor de TK ao diagnóstico e o tempo de uso.....	46
Tabela 3	Inibidor de TK no estudo e Citogenética Clássica após uso do TKI	47
Tabela 4	Causas para mudança da terapia em alguns pacientes do estudo.....	48
Tabela 5	Resultados da análise da citogenética molecular (FISH)	50
Tabela 6	Frequência de metáfases submetidas ao bandamento G com t(9;22)(q34;q11) e frequência de núcleos com o rearranjo BCR/ABL detectados por FISH ..	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Adenina/ Timina
ATP	Trifosfato de adenosina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Citocina/ Guanina
CGH	Comparative genomic hybridization
COM-HUPES/UFBA	Complexo Hospital Universitário Edgard Santos/ Universidade Federal da Bahia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GVL	Graft-versus-leukemia effect
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IFN- α	Interferon- α
KD	kilodalton
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
PBS	Phosphate-buffered solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Cromossomo Philadelphia
RCC	Resposta Citogenética Completa
RT-PCR	Reverse transcriptase- Polymerase chain reaction
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SSC	Saline Sodium Citrate
TA	Temperatura Ambiente
TKI	Inibidores de Tirosino quinase
TMO	Transplante de Medula Óssea
TLCE	Termo Livre de Consentimento Esclarecido
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CITOGENÉTICA.....	15
2.1.1 Citogenética Clássica	16
2.1.2 Citogenética Molecular (FISH).....	18
2.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)	21
2.2.1 Incidência.....	23
2.2.2 Diagnóstico	23
2.2.3 Fases da Doença.....	24
2.2.4 Tratamento.....	25
2.2.5 Resposta ao Tratamento	26
2.3 INIBIDORES DA TIROSINO QUINASE (TKI)	28
2.3.1 Imatinibe	28
2.3.2 Dasatinibe	31
2.3.3 Nilotinibe	31
2.4 RELEVÂNCIA	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 CASUÍSTICA	34
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	35
4.4 COLETA DE DADOS.....	35
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	35
4.5.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	35
4.6 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	36
4.6.1 Cultura Celular.....	36
4.6.2 Hipotonização Celular.....	37

4.6.3	Fixação Celular	37
4.7	PREPARAÇÃO DA LÂMINA.....	38
4.7.1	Lâminas para Citogenética Clássica.....	38
4.7.2	Lâminas para Citogenética Molecular (FISH).....	40
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4.8.1	Teste X^2	42
4.8.2	Teste de Mann-Whitney	42
5	RESULTADOS	43
5.1	RESULTADOS DA CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	53
5.2	RESULTADOS DA CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH).....	55
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE	67
	ANEXO.....	72

1 INTRODUÇÃO

A importância da citogenética no diagnóstico e monitoramento das neoplasias onco-hematológicas tem uma história relevante, principalmente na Leucemia Mielóide Crônica (LMC), por ter sido a primeira patologia relacionada a uma alteração cromossômica específica (JAMIESON, 2008). Essa alteração, que atinge a célula progenitora e está presente em 95% dos pacientes com LMC, ocorre a partir da translocação entre os cromossomos 9 e 22, $t(9;22)(q34;q11)$, resultando no cromossomo Philadelphia (Ph), caracterizado pela técnica da citogenética clássica (VENDRAME-GOLONI *et al.*, 2006).

A citogenética clássica também tem grande utilidade quando muitas alterações estão presentes, possibilitando uma visão global do genoma. Por esse motivo o monitoramento por essa técnica é fundamental tanto ao diagnóstico quanto nas fases mais avançadas da LMC, como na fase acelerada e crise blástica. A citogenética clássica permite avaliar um novo Ph, a trissomia de 8, o isocromossomo do braço longo do 17, a trissomia do 19 e a nulissomia do Y, os quais estão associados a um pior prognóstico. Esse acompanhamento é essencial para determinar a conduta terapêutica mais correta, além de demonstrar a evolução desse paciente (ALVARENGA *et al.*, 2010).

A translocação que origina o cromossomo Ph envolve a junção da região do gene BCR no cromossomo 22 com a região do gene ABL no cromossomo 9, gerando o rearranjo BCR-ABL (ABREU e LOPES, 2009). Esse rearranjo, um gene híbrido, é responsável pelo estímulo da proliferação celular através da produção de uma proteína com atividade tirosina quinase elevada, uma das principais características da LMC (CHAUFFAILLE, 2010).

Em 5-10% dos casos, translocações variantes ou rearranjos críticos estão presentes e são necessárias outras técnicas para identificar a presença da fusão gênica BCR/ABL. Nesses casos a citogenética molecular, por ser mais sensível que a clássica, torna-se fundamental. Uma técnica molecular muito utilizada é a Fluorescent *in Situ* Hybridisation (FISH), que ao empregar sonda específica para a região do rearranjo, é

capaz de detectá-lo em aproximadamente 100% dos casos (VENDRAME-GOLONI *et al.*, 2006).

O reconhecimento da importância da desregulação da atividade tirosina quinase, decorrente do BCR-ABL, levou ao desenvolvimento de novos fármacos inibidores desta ação, conhecidos como inibidores de tirosina quinase (TKI) (QUINTÁS e CORTES, 2009). Com essa descoberta o tratamento avançou nos últimos anos de maneira considerável e mudou drasticamente a terapia convencional, demonstrando resultados promissores (JABBOUR *et al.*, 2007).

O acompanhamento clínico e citogenético são condutas críticas para uma melhor evolução das pessoas acometidas pela LMC. No presente estudo foi estimada a importância do uso das duas técnicas citogenéticas, a clássica e a molecular (FISH), no monitoramento de pacientes com LMC em terapia com TKI no Estado da Bahia, atendidos no Serviço de Genética do Complexo Hospital Universitário Edgard Santos /Universidade Federal da Bahia (COM-HUPES/UFBA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CITOGENÉTICA

A citogenética estuda a constituição genética da célula através dos cromossomos, sua função, estrutura, composição e seu papel tanto na evolução quanto no desenvolvimento de doenças (MONTENEGRO e SANTOS e VEITH, 2008). Os cromossomos foram observados inicialmente por Strasburger em 1875, a partir de células vegetais (LAWCE e BROWN, 1997). As descobertas seguintes foram importantes para o desenvolvimento de técnicas de cultura, impulsionando trabalhos como o de Tjio e Levan, 1956, que determinou o número exato dos cromossomos humanos em 46 (CONNOR e FERGUNSON-SMITH, 1984; MITELMAN, 1995).

Dentre essas descobertas sobre as técnicas de cultura, observou-se uso da colchicina, um inibidor mitótico que interrompe o complexo centríolo/fibras do fuso acromático, interferindo na formação dos microtúbulos e induzindo a interrupção mitótica. A ausência de fibras do fuso permite que os cromossomos permaneçam na fase de metáfase, facilitando a análise (MORTON, 1994).

Esses estudos ainda permitiram o desenvolvimento de um processo fundamental, a fixação celular, que tem como principal função remover a água intracelular, preservando-as, uma vez que endurece as membranas e a cromatina (CLOUSTON, 2001). Essa etapa é realizada com a solução Carnoy, ou fixador, e prepara os cromossomos para o processo de bandeamento, extraíndo proteínas histonas e facilitando o contato do material genético com o corante (LAWCE e BROWN, 1997).

Outra descoberta importante foi a hipotonização, etapa que utiliza uma solução salina com concentração inferior a do citoplasma celular, possibilitando a movimentação de água por osmose para o interior das células. As células tornam-se túrgidas, o que ajuda na dispersão dos cromossomos e no espalhamento da metáfase, sendo uma etapa crítica na preparação da amostra para a análise citogenética (BARCH *et al.*, 1997). Em 1959 foi demonstrada a importância da fito-hemaglutinina, que também revolucionou o

estudo dos cromossomos, pois tornou possível sua análise a partir de linfócito (MOOREHEAD *et al.*, 1960; NOWELL *et al.*, 1960).

Em 1960, Nowell e Hungerford observaram uma anormalidade do cromossomo 22 nas células da medula óssea de pacientes com LMC, que ficou conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph). Outro avanço sobre o tema nesse mesmo ano, foi a criação de um sistema comum de nomenclatura que determinava a classificação dos cromossomos em sete grupos, de A a G, baseado no tamanho decrescente dos mesmos e na posição do centrômero (ISCN, 2009).

Em 1968, Caspersson e colaboradores, identificaram um padrão de bandas que diferenciava os cromossomos, facilitando ainda mais a visualização desses elementos. Em alguns casos as alterações ainda eram de pouca visualização e isso dificultava a identificação somente através das bandas. A necessidade de técnicas mais sensíveis e refinadas levou ao desenvolvimento da citogenética molecular (SMEETS, 2004).

Em 1973, Rowley demonstrou que o cromossomo Ph era resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (DEININGER *et al.*, 2007), achado fundamental para impulsionar de vez o estudo da LMC (BEJJANI e SHAFFER, 2008). Nos dias atuais, a citogenética tem inúmeras aplicações desde o diagnóstico até a definição ou mudança da terapia utilizada na LMC, sendo fundamental desde o diagnóstico até o monitoramento da resposta terapêutica do paciente.

2.1.1 Citogenética Clássica

As alterações cromossômicas desempenham um papel importante no estudo de diversos tipos de cânceres e a citogenética clássica permite uma visão do genoma na sua totalidade através da análise do cariótipo. No cariótipo os cromossomos são alinhados de acordo com o tamanho decrescente, padrão de bandas e posição do centrômero, podendo ser metacêntrico, submetacêntrico ou acrocêntrico (ISCN, 2009).

Nos cromossomos identificados através do padrão de bandas (Figura 1), são observadas regiões escuras ou claras a depender da técnica de bandeamento utilizada. Cada cromossomo apresenta um padrão específico de bandas facilitando a detecção das alterações no desenvolvimento de neoplasias. Bandas escuras pelo bandeamento G são ricas em adenina-timina (AT), com replicação tardia e poucos genes ativos, enquanto as bandas claras são ricas em citosina-guanina (CG), com replicação precoce e com muitos genes ativos (ISCN, 2009).

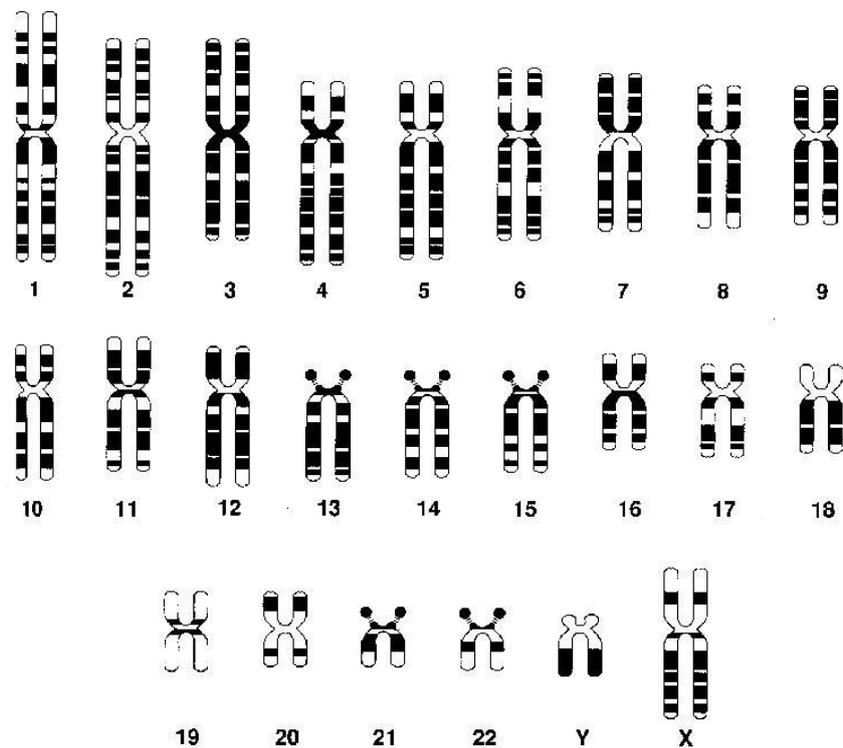


Figura 1- Ideograma com o padrão de bandeamento G para cromossomos humanos. Fonte: <http://www.mundoeducacao.com.br/biologia/cariotipo.htm>.

A constituição cromossômica normal em humanos é de 22 pares de autossomos e um par sexual XX ou XY. Se a contagem do cariótipo for diferente de 46 existe material genético extra, ausente ou a presença de rearranjos. Alterações podem envolver um ou mais dos cromossomos autossomos, sexuais ou ambos e são classificadas em numéricas e estruturais (LIMA, 1996). As variações numéricas são divididas em euploidias e

aneuploidias. A euploidia apresenta um múltiplo exato do número cromossômico, enquanto as aneuploidias se apresentam como falta ou excesso de cromossomos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As alterações estruturais ocorrem geralmente durante a divisão celular, na forma de quebras, e podem ser balanceadas ou não balanceadas. Os rearranjos balanceados são as inversões e translocações podendo resultar ou não em fenótipo alterado, enquanto as não balanceadas são as deleções e duplicações e resultam em fenótipo alterado (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O aprimoramento das técnicas clássicas aliado ao desenvolvimento de técnicas moleculares vem permitindo avanços importantes na oncogenética, estimulando pesquisas que visam um maior conhecimento e entendimento do papel da alteração genética na oncogênese.

2.1.2 Citogenética Molecular (FISH)

Os primeiros experimentos da FISH foram realizados por Landegent e seus colaboradores, em 1985 (VOGEL e MOTULSKY, 1997; GUSTASHAW, 1997). Essa técnica representou uma revolução na citogenética médica, especialmente na oncologia clínica, pois permitiu a identificação de alterações cromossômicas não visualizadas na técnica convencional, detecção de deleções críticas e análise de células em interfase, definindo o diagnóstico em muitos casos (SERAKINCI e KOLVRAA, 2009).

A técnica de FISH é considerada a base da citogenética molecular e nas últimas décadas grandes descobertas para seu aperfeiçoamento foram feitas, com o intuito de aumentar a resolução para detectar as anomalias cromossômicas (SPEICHER e CARTER, 2005). Trata-se de um método mais sensível e específico, que utiliza uma sequência de DNA complementar ao alvo que se pretende analisar. Essa sequência específica é denominada sonda (MARIN *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2003).

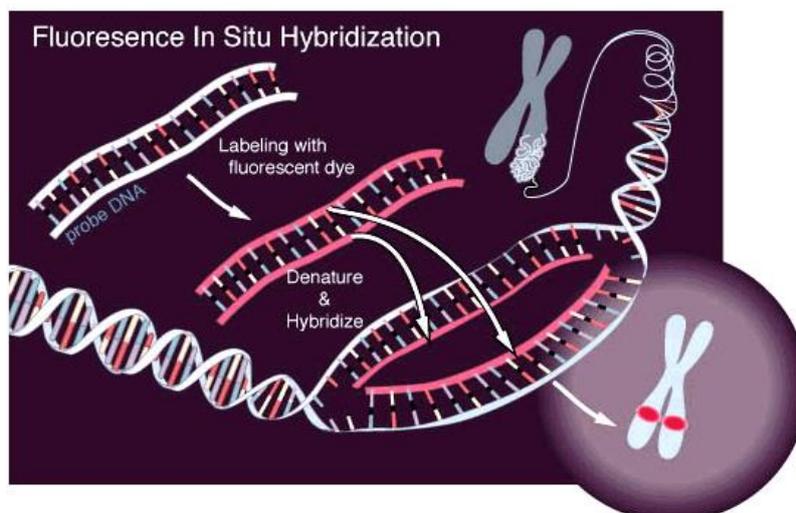


Figura 2- Princípios básicos da técnica de FISH. Fonte: www.nhgri.nih.gov/DIR/VIP.

Atualmente encontram-se sondas para identificar muitas alterações cromossômicas (HAFERLACH *et al.*, 2010). Como o DNA é formado por fita dupla, ao ser desnaturado permite que a sonda possa competir com a sequência de DNA que se deseja marcar, sendo hibridizada *in situ* (Figura 2). Essas sondas podem ser de cópia única ou de DNA repetitivo e são classificadas em centroméricas, teloméricas, gênicas, por região do cromossomo a hibridizar ou ainda por todo o cromossomo (GUERRA, 2004).

A FISH pode ser usada para detectar o rearranjo BCR/ABL tanto no diagnóstico, quanto no acompanhamento da resposta em relação à terapia utilizada. Na primeira geração as sondas de fusão simples eram capazes de demonstrar um sinal vermelho do gene ABL e outro verde que correspondia ao gene BCR. O rearranjo BCR-ABL era representado pela cor amarelada, o que significava a união entre os sinais verde e vermelho. As análises realizadas com essas sondas não eram muito confiáveis, pois não existiam sinais extras como referência (CHAUFFAILLE *et al.*, 2008).

A segunda geração de sondas possuía um sinal vermelho extra no braço longo do cromossomo 9 envolvido na translocação, tornando um pouco mais segura a identificação da alteração. A terceira geração apresentou sinais extras, verde e vermelho, o que aumentou a sensibilidade e especificidade do método (CHAUFFAILLE *et al.*, 2008).

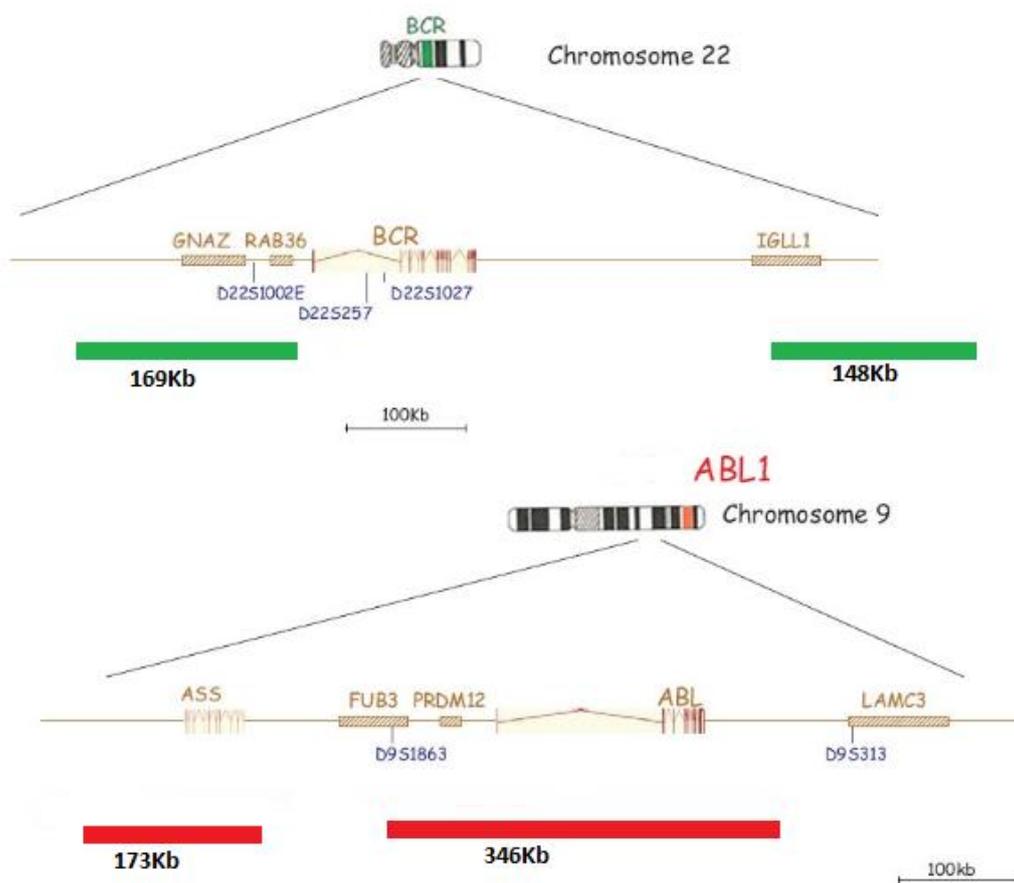


Figura 3: Esquema representativo da sonda LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans (CML,ALL) (Cytocell). Fonte: http://www.genycell.es/prod/genetica_humana/sondas_fish (ADAPTADO).

No momento do diagnóstico da LMC a FISH pode ser empregada juntamente com o cariótipo e repetida aos três e seis meses de tratamento com os TKI. Após a remissão completa o acompanhamento desses pacientes passa a ser realizado através do PCR, uma técnica molecular importante e alternativa, evitando a coleta da medula óssea, pois pode ser feita em amostra de sangue periférico (LEE, 2006).

2.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

A LMC foi uma das primeiras entre as neoplasias onco-hematológicas a ser caracterizada, o que ocorreu por volta de 1845, e posteriormente se tornou a primeira a ser associada a uma anomalia citogenética (NOWELL *et al.*, 1960). Trata-se de uma patologia mieloproliferativa clonal, ou seja, surge a partir da alteração em uma célula que origina um clone anormal, este clone se expande, causando um acúmulo de células mielóides jovens e maduras na medula óssea. (BORTOLHEIRO e CHIATTONE, 2008; CONCHON, 2009).

A doença caracteriza-se por leucocitose com aumento do número de células mais imaturas, esplenomegalia e presença do cromossomo Ph. Esse cromossomo, considerado o marcador citogenético dessa neoplasia, está presente em aproximadamente 95% dos pacientes na fase inicial (LEE, 2006). Estudos recentes demonstram que houve aumento da incidência da LMC em sobreviventes da bomba atômica durante a Segunda Guerra Mundial, assim como em pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de outras doenças oncológicas (SANTOS e MORRONE, 2008).

A LMC atípica (cromossomo Ph negativo) ocorre raramente e, na maioria dos casos suas características iniciais e seu curso clínico são similares aos de pacientes Ph positivos. Contudo, a LMC atípica inclui um grupo heterogêneo de pacientes e em alguns a doença evolui de maneira mais agressiva com pior prognóstico. A detecção do BCR-ABL é fundamental, pois este rearranjo não somente contribui para a transformação leucêmica, como interfere no sucesso do tratamento (KOLDEHOFF *et al.*, 2004).

O rearranjo BCR-ABL, decorrente do cromossomo Ph, está presente em aproximadamente 100% dos pacientes com LMC ao diagnóstico, e sua atividade elevada é responsável pela oncogênese. Identificar as vias de sinalização que influenciam a atividade tirosino quinase do BCR-ABL, ligando essas vias às alterações características da LMC, é importante. Essas alterações incluem aumento da proliferação celular, por ativação da via RAS, a diminuição da apoptose pela via STAT5, entre

outras que juntas favorecem as células afetadas com vantagem proliferativa e de sobrevivência (BOLLMANN e GIGLIO, 2011).

O BCR-ABL é resultado da translocação entre os cromossomos 9 e 22, a região BCR esta localizado no cromossomo 22 e o gene ABL no cromossomo 9, sendo formado quando o gene ABL liga-se com a região 5' do gene BCR. No gene BCR são descritos três pontos de quebra: o ponto de quebra maior (M-bcr: major breakpoint cluster region), o ponto de quebra menor (m-bcr: minor breakpoint cluster region) e o micro (μ -bcr: micro breakpoint cluster region) (DEININGER *et al.*, 2000).

O produto destas quebras origina diferentes tipos de proteínas quiméricas com atividade de tirosino quinase, denominadas p190, p210 e p230 (FUNKE *et al.*, 2010). Estas proteínas induzem a desregulação de várias vias de sinalização, e consequente proliferação excessiva, resistência à apoptose e defeitos na adesão, fatores responsáveis pela oncogênese na LMC (ALVARENGA, 2010).

A p210 é a mais frequente nos pacientes com LMC, responsável pelas anomalias fenotípicas correspondentes à fase crônica, enquanto a p190 apresenta maior atividade tirosina quinase e está associada a maior severidade no quadro leucêmico mais agudo. A p230 que está associada à trombocitose e a uma variante neutrofílica de LMC (ANDRIKOVICS *et al.*, 2007).

O gene BCR está localizado em 22q11 e codifica uma proteína com atividade de quinase e domínios funcionais importantes na oligomerização, na ligação ao domínio SH2, na atividade serina/treonina e na atividade de proteínas da família das GTPases. Essa proteína interage ainda com as proteínas G, que possuem papéis importantes na sinalização intracelular, organização do citoesqueleto, crescimento e desenvolvimento celular (HOFFBRAND *et al.*, 2005).

O proto-oncogene ABL localizado em 9q34 contém sequências homólogas às sequências v-abl do A-MuLV, e são associadas à transformação celular. A proteína ABL é regulada por auto-inibição, mecanismo importante na integração de sinais tanto intracelular (lesões no DNA e estresse oxidativo) quanto no ambiente extracelular (fatores de crescimento, aderência celular e citocinas) (BAO *et al.*, 2007). Essa proteína

influencia ainda na regulação do ciclo celular, na resposta celular ao estresse e na transmissão da informação sobre o ambiente celular, por meio de sinalização de integrinas. (LANDSTROM *et al.*, 2006).

O monitoramento citogenético cuidadoso está justificado pela ocorrência de fenômenos importantes como a ausência ou a demora em alcançar a remissão, sendo necessário, em determinados casos, o ajuste de dose dos fármacos empregados, a perda da remissão previamente alcançada na suspensão da medicação, na evolução clonal a despeito da terapia e, por fim, no aparecimento de alterações clonais nas células Ph-negativas (ABRUZZESE *et al.*, 2007).

2.2.1 Incidência

A LMC representa em torno de 20% de todas as leucemias do adulto (BOLLMANN e GIGLIO, 2011). Tem uma incidência de 1,6 casos em 100.000 indivíduos entre adultos e de 1 por 1 milhão em crianças com até 10 anos, representando aproximadamente 10% dos casos. É mais frequente na faixa etária entre 40 e 55 anos de idade, entretanto trabalhos recentes demonstram uma média de 66 anos. Essa doença afeta ambos os sexos, com discreta predominância no sexo masculino (FERDINAND *et al.*, 2012; ROHRBACHER *et al.*, 2008).

2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da LMC é realizado pelo exame clínico, pelo hemograma, mielograma e realização do estudo citogenético (RAANANI *et al.*, 2005). Para confirmar o diagnóstico é necessária a demonstração do cromossomo Ph ou do rearranjo BCR-ABL em amostras de sangue periférico ou medula óssea (JOSKE, 2008; LUNDÁN *et al.*, 2008). A técnica citogenética clássica e as técnicas moleculares (FISH e PCR) permitem a detecção dessas alterações genéticas de um modo muito específico (VIANNA e ALMEIDA, 2006).

2.2.3 Fases da Doença

Por se tratar de uma doença com características diversas, identificar a fase em que esses pacientes se encontram é fundamental para o manejo correto e para definição terapêutica. De acordo com os dados clínicos e laboratoriais, essa neoplasia é dividida em três fases. A primeira fase é a crônica, seguida da acelerada e da crise blástica (ABREU e LOPES, 2009).

Pacientes com LMC quando diagnosticados na fase inicial, ou crônica, apresentam-se assintomáticos numa média de 40% dos casos. Quando sintomáticos, as queixas mais comuns são fadiga, anorexia, perda ponderal, sudorese noturna e febre e desconforto abdominal causado pela esplenomegalia. Estes sinais e sintomas são geralmente leves e relacionados com a proliferação celular aumentada. Complicações trombóticas ou hemorragia podem ocorrer, mas são eventos raros (BOLLMANN e GIGLIO, 2011).

A fase crônica é a que possui maior possibilidade de ser controlada com terapia e é quando grande parte dos pacientes são diagnosticados. Possui uma duração variável podendo passar para outra fase depois de 3 a 8 anos após o diagnóstico. Nos casos onde ocorre ausência de sintomas, o hemograma é fundamental, mostrando leucocitose, maior número de granulócitos jovens e maduros além de basófilos e eosinófilos. No mielograma observa-se a presença de hiperplasia do setor granulocítico com células em todas as fases de maturação (HOFFBRAND *et al.*, 2005).

Laboratorialmente observa-se atividade reduzida da fosfatase alcalina leucocitária, a hemoglobina pode estar normal ou haver discreta anemia e o número de plaquetas é geralmente normal ou elevado, havendo plaquetopenia ao diagnóstico em apenas 5%. (MARK *et al.*, 2006).

A fase seguinte, a acelerada, apresenta maior resistência à terapia medicamentosa e alguns achados do quadro clínico como hepatomegalia, mielofibrose, anomalia clonal citogenética e esplenomegalia são mais comuns (HAMERSCHLAK, 2008). Cerca de metade dos pacientes permanecem de 4 a 6 meses em fase de aceleração antes de evoluir para um quadro mais grave e agudizado (HOFFBRAND *et al.*, 2005).

Na fase acelerada alguns achados como anemia, leucocitose, trombocitopenia, basofilia superior a 20%, além da presença de blastos e promielócitos, descrevem o hemograma. Na medula óssea blastos e promielócitos também são observados, além de mielodisplasia, megacariócitos e hiper celularidade. Os sintomas se tornam mais presentes podendo ocorrer sudorese noturna, emagrecimento, febre e dores ósseas (MARK *et al.*, 2006).

A transformação para a crise blástica pode ocorrer em qualquer período, saindo diretamente da crônica ou passando pela acelerada. (HOFFBRAND *et al.*, 2005). Nessa fase algumas características como intensificação do quadro anêmico, febre, sudorese noturna, anorexia e piora do estado geral com rápida evolução fatal estão presentes (LORENZI, 2006).

Com a progressão 50% a 80% dos indivíduos adquirem alterações cromossômicas adicionais que precedem as manifestações clínicas e hematológicas, entre elas cromossomo Ph duplo, isocromossomo 17, trissomia do cromossomo 8 e nulissomia do Y (HAMERSCHLAK, 2008). A presença de blastos acima de 30% tanto no sangue periférico quanto na medula óssea, infiltração extramedular de células leucêmicas, presença de sarcoma granulocítico, presença de mutações nos genes p53 e Rb são típicas e auxiliam no diagnóstico do paciente em crise blástica (MARK *et al.*, 2006).

2.2.4 Tratamento

O tratamento da LMC visa restituir a hematopoiese normal, o desaparecimento da translocação entre os cromossomos 9 e 22 e redução dos transcritos BCR-ABL. Baseava-se no passado no emprego da hidroxiuréia e do interferon- α (IFN- α) e atualmente no uso de inibidores de tirosina quinase. O transplante alogênico de medula óssea (TMO) fica reservado aos pacientes que falham em responder aos inibidores de TK (FUNKE *et al.*, 2010).

Historicamente a terapia da LMC começou em 1960, com o surgimento do bussulfan que não demonstrou resultados muito satisfatórios, surgindo então a hidroxiuréia, que se

mostrou superior provavelmente por ser mais bem tolerada e proporcionar pequeno ganho de sobrevivência. A hidroxiureia promove o controle da proliferação celular pela inibição da síntese do DNA e como quimioterápico, induz a apoptose por meio do estresse celular e da ativação de vias importantes como a via intrínseca, retardando a progressão para crise blástica (ABREU e LOPES, 2009).

Em 1980 foi observada a eficácia do IFN- α que além de promover a inibição da proliferação do clone leucêmico potencializa a resposta imune anti-leucêmica dos pacientes. Esse medicamento possui papel imunomodulador importante sobre as células mononucleares, restaurando o número de células da resposta imune circulante, promovendo a ativação de células efetoras e aumentando a apoptose, alcançando assim o controle das contagens sanguíneas periféricas e diminuição na proporção de células da medula que possuem o cromossomo Ph (KURAMATO *et al.*, 2006).

Ainda em 1980 surgiram as primeiras experiências sobre transplante alogênico de medula óssea, sendo este o único tratamento que promove a cura. Entretanto a idade média dos pacientes inicialmente acometidos é elevada e por existir dificuldade em conseguir doador compatível, a indicação de TMO é pequena, sendo possível em menos de 20% dos casos (FUNKE *et al.*, 2010).

A identificação da oncoproteína BCR-ABL, responsável pela patogênese, em 1986, permitiu uma nova terapia revolucionária, os inibidores de uma cascata de ativação da tirosina quinase (SPECTOR, 2008). O gene BCR-ABL tem atividade quinase, sendo ativado por fosforilação. Quando o fosfato se liga a um grupo trifosfato de adenosina (ATP) cria uma cascata de ativação que resulta em estímulo proliferativo exacerbado. Os TKI bloqueiam este processo e são classificados em inibidores de primeira e segunda geração (FAUSEL, 2007).

2.2.5 Resposta ao Tratamento

A resposta ao tratamento varia de paciente para paciente, os critérios usados na monitorização da resposta, assim como os parâmetros, estão definidos no LeukemiaNet

(SPECTOR, 2008). A resistência à terapia ainda é um problema e o acompanhamento é extremamente importante para que esta possa ser detectada precocemente e as modificações para drogas de segunda geração ou encaminhamento para transplante sejam definidas (VALENT *et al.*, 2008).

A resposta ao tratamento com TKI é verificada clinicamente com normalização do tamanho do baço, hematologicamente com normalização do hemograma e também com as respostas completas na citogenética clássica e no estudo molecular. Além da leucometria normal observa-se ausência de pró-mielócitos e mieloblastos, mielócitos, metamielócitos e plaquetometria dentro dos parâmetros normais (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

A resposta citogenética completa significa o desaparecimento das células portadoras do cromossomo Ph na medula óssea. A resposta pode ser ausente, quando existir mais de 90% de células com cromossomo Ph positivo, menor quando existir 35% a 90% de células com cromossomo Ph positivo, parcial, com 5% a 34% de células com cromossomo Ph positivo e completa quando o cromossomo não é mais encontrado. Considera-se ainda a resposta maior que corresponde à soma de completa mais parcial, ou seja, com menos de 35% de células com cromossomo Ph positivo (GOLDMAN, 2007).

Ocorrendo a resposta citogenética completa o paciente passa a ser monitorado pelo número de transcritos BCR-ABL por PCR quantitativo, passando, a partir daí, a análise citogenética ser feita anualmente no sentido de se avaliarem possíveis fenômenos novos, tais como perda de resposta, alterações clonais em células Ph-negativas ou evolução clonal. A resposta molecular é caracterizada completa quando não são detectados transcritos ou quando estes correspondem a menos de 0,1%. Esse monitoramento é realizado por PCR a cada 3 ou 6 meses após a resposta citogenética completa (CHAUFFAILLE, 2009).

2.3 INIBIDORES DA TIROSINO QUINASE (TKI)

A descoberta dos TKI para o tratamento da leucemia mielóide crônica foi, provavelmente, a maior inovação do tratamento onco-hematológico da última década. Estes fármacos oferecem um melhor prognóstico aos pacientes com LMC. Seu mecanismo de ação é mediante a ocupação do local de ligação do trifosfato de adenosina (ATP), impedindo-o de doar o fosfato. Sem a fosforilação deste não ocorre ativação da cascata que resulta em crescimento descontrolado da população granulocítica (FAUSEL, 2007). São inibidores de TK o mesilato de imatinibe, o dasatinibe e o nilotinibe (ABREU e LOPES, 2009).

2.3.1 Imatinibe

A partir do uso do imatinibe, novos critérios de resposta e monitoramento da doença surgiram com o objetivo de aperfeiçoar e padronizar o manuseio de pacientes com LMC. Em 1996, foi publicado pela primeira vez o efeito deste inibidor, de primeira geração, usado como terapia inicial que apresentava eficácia e baixa toxicidade, porém os primeiros estudos clínicos foram em 1998 (FUNKE *et al.*, 2010). O imatinibe como opção de primeira linha no tratamento da LMC, foi autorizado no Brasil a partir de 25 de junho de 2008, em pacientes sem indicação para TMO, ou sem doadores identificados (BRASIL- DOU, 2008).

Esse fármaco é derivado da 2-fenil-amino-pirimidina e não atua diretamente na base da patogênese da LMC que seria impedir a codificação de BCR-ABL, mas age competindo pelo sítio de ligação do ATP da tirosino quinase, impedindo sua ativação e restaurando seu mecanismo de morte celular (BOLLMANN e GIGLIO, 2011). A partir do início do uso deste medicamento observou-se acentuada melhora no prognóstico dos pacientes com LMC (LUNDÁN *et al.*, 2008).

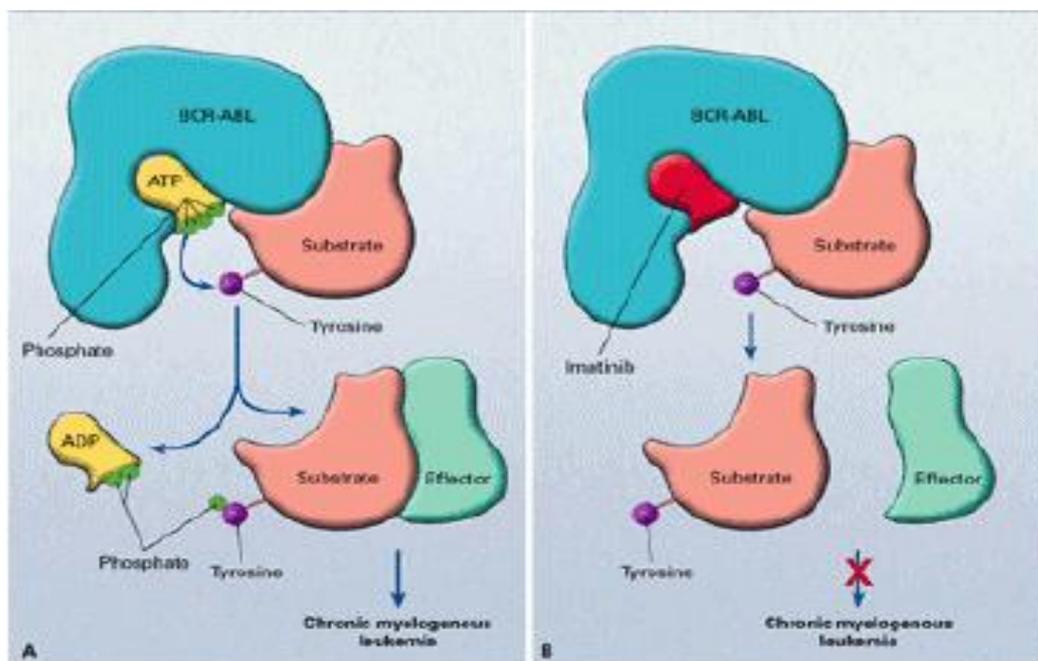


Figura 4- Mecanismo de ação do imatinibe (VIGORITO *et al*, 2006).

O mecanismo de ação desse medicamento está demonstrado na figura 4, onde em A observa-se uma oncoproteína com uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) no sítio quinase ativando o substrato pela fosforilação de um resíduo de tirosina pelo ATP. Fosforilada, esta proteína substrato pode interagir com sua molécula efetora e desencadear o fenótipo maligno da LMC. Em B o imatinibe ocupa o sítio quinase, a ação BCR-ABL é inibida, evitando a fosforilação do substrato. Quando não ocorre a fosforilação, em B, esse processo é interrompido impedindo a proliferação da célula anômala (SANTOS, 2007).

Com uso dessa terapia apenas uma pequena porcentagem dos doentes perdem as respostas hematológica e citogenética e apenas 2% progridem para a fase acelerada ou crise blástica (DRUKER *et al.*, 2006). Na fase inicial da doença, ou fase crônica, ocorre resposta hematológica completa em 98% e em 87% ocorre resposta citogenética completa.

Em alguns casos ocorre a falha no uso desse medicamento e isso pode ser interpretado, segundo os critérios do LeukemiaNet, pela ausência de resposta hematológica com três meses, ausência de resposta hematológica completa ou qualquer resposta citogenética aos seis meses, ausência de resposta citogenética maior aos 12 meses ou resposta citogenética completa aos 18 meses de tratamento. Em casos como esses deve ser feita alguma intervenção terapêutica, como aumento de dose, mudança para outro inibidor ou encaminhamento para transplante de medula óssea (PAGNANO, 2008).

Uma resposta subótima não significa falha total desse inibidor e ocorre quando existe resposta hematológica completa aos três meses de tratamento, porém ausência de resposta citogenética parcial aos seis meses, ausência de resposta citogenética completa aos 12 meses ou ausência de resposta molecular maior aos 18 meses. Nesses casos o inibidor pode ser trocado por outro considerado de segunda geração, como o dasatinibe e o nilotinibe, e em geral a resposta é recuperada (BACCARANI *et al.*, 2006).

A resistência pode ser causada por diversos fatores como a má absorção, metabolização, ligação alterada com proteínas plasmáticas, mudanças no influxo e efluxo para dentro da célula e inativação enzimática. A avaliação dos níveis séricos pode ser usada para auxiliar nos casos de toxicidade, na falha de resposta ou resposta subótima, além de ajudar também quando há suspeita de não aderência ao tratamento ou interação medicamentosa (LARSON *et al.*, 2008).

Normalmente o imatinibe é um medicamento bem tolerado pelos pacientes. Os efeitos adversos, quando presentes, são de gravidade leve a moderada como náuseas, vômitos, diarreia, câibras musculares, dor muscular esquelética, erupções cutâneas e retenção de fluídos (JABBOUR *et al.*, 2007). Antes do aparecimento dessa droga o transplante de medula óssea era considerado o método mais eficiente para induzir a remissão citogenética e molecular completa. Atualmente esse procedimento é reservado para os casos de resistência ou toxicidade importantes (BACCARANI *et al.*, 2009).

2.3.2 Dasatinibe

O dasatinibe, um derivado da piperazinila, possui ação potente por se ligar a conformações ativas e inativas do domínio ABL (DUKER *et al.*, 2006). A ação anti-leucêmica desse fármaco ocorre sobre a conformação fechada e aberta da molécula do BCR-ABL. Trata-se de uma droga que atinge multialvos dentro dessa molécula e atua tanto sobre o domínio da Abl quinase quanto inibindo as quinases das famílias Src e Lyn. Após 5 meses, em média, o paciente em uso deste fármaco atinge a resposta citogenética completa (MASSZI *et al.*, 2008).

Em 2006, o uso do dasatinibe 70 mg duas vezes ao dia foi demonstrado para tratamento de pacientes com LMC em todas as fases e em pacientes resistentes ou intolerantes ao imatinibe. Os principais efeitos colaterais com o uso desta droga são: retenção de fluidos, derrame pleural, diarreia, vômito, sangramento, náusea, dor abdominal, cefaleia e mielotoxicidade, dos casos apresentados 21% apresentavam neutropenia, 19% trombocitopenia e 10% anemia (BACCARANI, 2008; BOLLMANN e GIGLIO, 2011).

Recentemente, recomenda-se o uso na dose de 100 mg uma vez ao dia para pacientes em fase crônica, resistentes ou intolerantes ao imatinibe, e 140 mg uma vez ao dia para pacientes em fase acelerada ou crise blástica. Estudos demonstram taxas de respostas semelhantes com a dose de 70mg duas vezes ao dia ou 100mg uma vez ao dia, com perfil de toxicidade mais favorável, principalmente em relação ao derrame pleural, na posologia de uma vez ao dia (KANTARJIAN *et al.*, 2009; LARSON *et al.*, 2008).

2.3.3 Nilotinibe

Esse inibidor é uma aminopirimidina mais seletiva para a quinase do rearranjo BCR-ABL e em 2007 foi aprovado para o tratamento de pacientes com LMC em fase acelerada da doença e na crise blástica quando resistentes ou intolerantes ao imatinibe, na dose de 400 mg duas vezes ao dia. Pode causar náusea, prurido, fadiga, cefaleia e

aumento de enzimas pancreáticas, reversível com ajuste da dose (KANTARJIAN *et al.*, 2008).

As anormalidades laboratoriais mais comuns são: elevação da lipase, hipofosfatemia, hiperglicemia e elevação da bilirrubina total, já as alterações hematológicas como neutropenia, plaquetopenia e anemia são mais frequentes (KANTARJIAN *et al.*, 2008). O nilotinibe é uma droga ativa, de boa tolerabilidade e aceitação para o paciente, acarretando respostas efetivas no tratamento para LMC. Os efeitos adversos relatados pelos pacientes foram considerados de leve a moderada intensidade e de fácil resolução com a redução da dose e medidas clínicas de suporte (DEININGER *et al.*, 2007).

2.4 RELEVÂNCIA

A citogenética é fundamental para o diagnóstico da LMC, mas após essa etapa saber qual caminho seguir no cuidado desses pacientes é muito importante, indicando a terapia e principalmente sua manutenção ou alteração. Diante dessas informações e do grande impacto socioeconômico proporcionado pela pior evolução e mortes por esta neoplasia, o presente estudo tem como propósito avaliar a importância do diagnóstico mais específico e sensível, além de proporcionar dados epidemiológicos de pacientes com essa patologia no Estado da Bahia.

Outro ponto importante é fortalecer a implantação da medicina diagnóstica na área hemato-oncológica no Serviço de Genética Médica do Complexo Hospital Universitário Edgard Santos/Universidade Federal da Bahia (COM-HUPES/UFBA). Além disso, existe um número muito reduzido de pesquisas nesta área, em nosso Estado, portanto, pretendemos fortalecer as nossas bases em pesquisa, atentando para a assistência, o auxílio diagnóstico, a capacitação técnica e científica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi demonstrar a importância da utilização da técnica da Citogenética Molecular (FISH) aliada à Citogenética Clássica no monitoramento de pacientes com LMC em terapia com TKI no Estado da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade da Citogenética Clássica na detecção de alterações cromossômicas em paciente com LMC em terapia com TKI.
- Avaliar a sensibilidade do FISH na detecção de alterações cromossômicas em paciente com LMC em terapia com TKI.
- Apresentar dados que contribuam para o monitoramento terapêutico mais eficiente e sensível de pacientes com LMC tratados com TKI no Estado da Bahia.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

O grupo de estudo foi constituído por 20 pacientes com diagnóstico de LMC em tratamento com TKI, de ambos os gêneros e maiores de 18 anos, procedentes de todo o Estado da Bahia e admitidos no Complexo Hospital Universitário Edgard Santos/Universidade Federal da Bahia (COM-HUPES/UFBA). Todos os participantes da pesquisa foram informados sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), permitindo a realização da pesquisa.

As amostras do aspirado da medula óssea desses pacientes foram recebidas no Serviço de Genética Médica do COM-HUPES/UFBA entre setembro e novembro de 2012 e tratou-se de uma amostra de conveniência. A punção aspirativa da medula óssea foi realizada pelo Hematologista responsável na região da crista ilíaca ou esterno. Foram colhidos 4 ml do material em seringa estéril e heparinizada e encaminhada ao laboratório para as análises cromossômicas. Os dados selecionados para o estudo foram coletados a partir de prontuários.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ambos os sexos;
- Maiores de 18 anos;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado;
- Pacientes com LMC em terapia com TKI.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Menores de 18 anos;
- Desacordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Pacientes com outra doença oncohematológica que não seja LMC;

4.4 COLETA DE DADOS

Os dados dos pacientes (data do diagnóstico, idade ao diagnóstico, data que iniciou o uso de inibidores de tirosina quinase, resultados anteriores de cariótipos, uso de outras medicações, outras doenças) foram coletados de prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) da instituição, no período de setembro a novembro de 2012.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

4.5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os participantes foram informados sobre o teor do estudo, inclusive a respeito dos objetivos, técnicas utilizadas, vantagens, eventuais riscos e, apenas após a assinatura voluntária do termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídos na pesquisa (Apêndice B).

4.5.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Complexo Hospital Universitário Edgard Santos/Universidade Federal da Bahia (COM-HUPES/UFBA), Parecer/Resolução Aditiva nº 104.789, em 20/09/2012 (Anexo A).

4.6 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

4.6.1 Cultura Celular

A primeira etapa para que a análise possa ser concluída é a realização da cultura celular, que requer determinadas condições e cuidados específicos para evitar contaminação da amostra. O transporte rápido até o laboratório, esterilidade, condições dos meios de cultura utilizados, temperatura para o crescimento das células de 37°C, entre outros, são fundamentais para o sucesso da cultura. Por esses motivos, foi importante a separação e esterilidade de todo o material utilizado como: gaze, pipeta, luvas, tubo, estantes, amostra a ser cultivada e o meio de cultura descongelado em banho-maria a 37°C.

O meio de cultura foi preparado em alíquotas de 8,5ml de meio RPMI e 1,5ml de soro bovino fetal, em tubos Falcon de 15 ml, que foram identificados e armazenados em freezer a -20°C, até o momento da semeadura. No momento da cultura o tubo foi identificado com o nome do paciente, número de registro, data da semeadura e tipo de cultura, se direta ou 24 horas. As amostras de todos os pacientes foram semeadas em culturas direta e de 24 horas e todo o material de medula recebido foi semeado em quantidades iguais de 2 ml nos dois tubos, até esgotamento total, não havendo armazenamento ou banco de material biológico.

Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C com inclinação de 30°, para aumentar a área de superfície. Após a semeadura foi adicionado 0,1 ml da solução de colchicina, um inibidor mitótico. A amostra foi homogeneizada e permaneceu em estufa a 37°C por mais 45 minutos. Essa é a primeira etapa da preparação celular e ocorre logo após o cultivo na cultura direta e 24 horas depois nos tubos de cultura de 24 horas. É um

processo importante, pois essa solução tem a capacidade de manter os cromossomos em metáfase, facilitando a análise.

4.6.2 Hipotonização Celular

Após a cultura e uso do inibidor mitótico, a amostra foi dividida em dois tubos Falcon de 15 ml e a etapa de hipotonização realizada com solução salina. A solução salina utilizada foi preparada com 5,6 g de cloreto de potássio e 1 litro de água destilada. Para essa etapa os dois tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 RPM, o sobrenadante descartado e adicionado 8 ml da solução hipotônica, previamente aquecida a 37°C.

A amostra foi mais uma vez homogeneizada e permaneceu em banho-maria a 37°C por 18 minutos. O tratamento com a solução hipotônica, devido ao seu efeito nas células, é uma fase crítica que requer um tempo exato, pois em excesso pode fragilizar as células levando à ruptura das membranas e, conseqüentemente, perda dos cromossomos.

4.6.3 Fixação Celular

O fixador é constituído por uma mistura de 3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético. Foi adicionado 8 ml de fixador na primeira fixação com o uso do vortex e logo em seguida a amostra centrifugada por 5 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante foi descartado e a segunda fixação realizada com a adição de mais 8 ml de fixador. Esse procedimento foi realizado mais uma vez, o sobrenadante foi retirado e as amostras reunidas em um único tubo com 6 ml de fixador para serem guardadas em geladeira por no mínimo uma hora.

Após esse período a amostra foi lavada por mais duas vezes com fixador e na última foi confeccionada a lâmina convencional para observação da quantidade de material que deve ser gotejado na preparação das lâminas definitivas. Essa amostra foi utilizada tanto

na citogenética clássica como na molecular, entretanto a maneira de preparar as lâminas é que as diferenciaram.

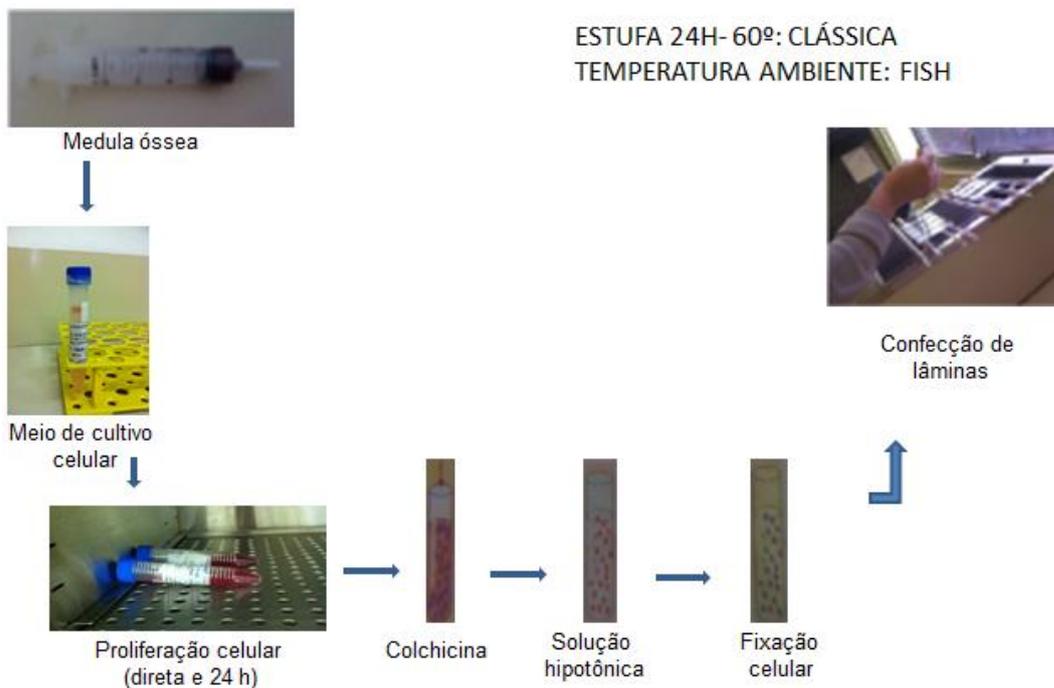


Figura 5- Preparação da amostra para realização dos exames citogenéticos clássico e molecular (FISH). Fonte própria.

4.7 PREPARAÇÃO DA LÂMINA

4.7.1 Lâminas para Citogenética Clássica

Após observação da lâmina convencional, as lâminas definitivas foram confeccionadas. Inicialmente seis lâminas (previamente lavadas e acondicionadas em água destilada dentro da geladeira) foram preparadas. Com a lâmina ainda molhada a amostra foi gotejada, de acordo com a quantidade de gotas definida na lâmina convencional, e passada em chama até secar completamente. Após essas etapas ficaram em estufa a 60°C, por 24 horas para envelhecimento e posterior bandeamento.

No dia seguinte foi realizado o processo de bandeamento, no qual os cromossomos são submetidos à ação de uma enzima, a tripsina, e corados posteriormente com Giemsa. As lâminas permaneceram de 1 a 5 segundos na tripsina (tempo este que pode variar e necessita ser adequado juntamente com visualização por microscopia ótica) foram mergulhadas em Phosphate-buffered solution (PBS) gelado parando a ação da enzima, coradas com Giemsa por 4 minutos, lavadas com água destilada, secas e analisadas.

A solução de tripsina é preparada com 0,1 g de tripsina em pó e 100 ml de PBS. O PBS é preparado com 8,2 g de cloreto de sódio, 0,2 g de sódio fosfato monobásico monoidrato, 1,6 g de sódio fosfato bibásico dodecahidrato e 1 litro de água destilada. O corante Giemsa é preparado com o PBS em proporção de 3:1, sendo 3 ml de PBS e 1 ml de corante.

As metáfases foram observadas em microscópio óptico (Olympus BX40) e foi realizada a montagem dos cariótipos. Segundo normas internacionais, para cada amostra devem ser analisadas 20 metáfases de pelo menos duas culturas diferentes, e dessa forma foi conduzido o estudo. Os cariótipos foram descritos de acordo com a nomenclatura do ISCN, 2009.

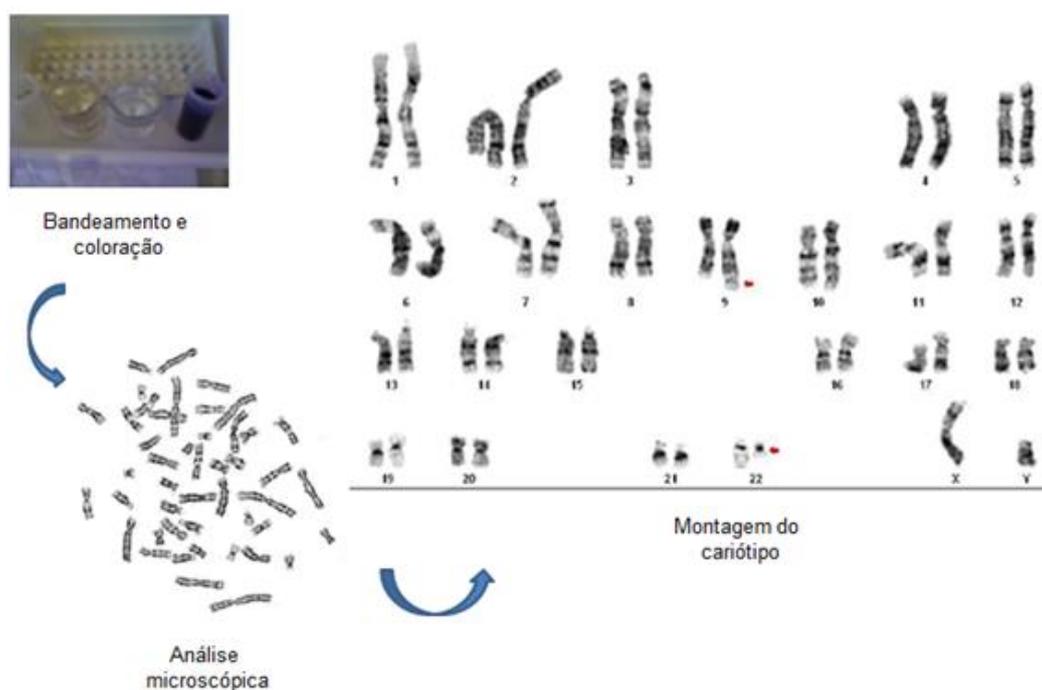


Figura 6- Passos para o resultado na citogenética clássica. Fonte própria.

4.7.2 Lâminas para Citogenética Molecular (FISH)

A FISH foi realizada com a sonda para a translocação entre os cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)], LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans (CML,ALL) (Cytocell) e todas as lâminas para realização do procedimento foram gotejadas no dia anterior. O material estocado em freezer a -20° C, após realização da citogenética convencional, foi lavado mais uma vez com fixador e gotejado em lâminas de vidro limpas, secas e anteriormente acondicionadas em álcool 70% na geladeira. Após esse processo as lâminas secaram a temperatura ambiente (TA) por 24 horas até o início da técnica.

O protocolo foi realizado em dois dias. No primeiro dia ocorreu o pré-tratamento, a lâmina foi colocada em solução de 2x Saline Sodium Citrate (SSC) pH 7 durante 2 minutos com o objetivo de estabilizar o pH e deixar os cromossomos menos suscetíveis à desnaturação. Logo em seguida as lâminas passaram por baterias de desidratação no etanol a 70%, 85% e 100%, também por 2 minutos para desidratação, e secas à TA. Nesse tempo a sonda foi retirada do freezer (-20°C) e transferida para tubos tipo Eppendorf na quantidade de 10µl por lâmina e a solução total voltou ao freezer.

A sonda permaneceu em banho-maria por 10 minutos a 37°C, foi colocada sobre a lâmina que foi coberta com lamínula, previamente limpa e estocada em álcool 70%, e selada com cola específica. Após a etapa de pré-desnaturação, a desnaturação foi realizada com a transferência da lâmina para uma placa aquecida a 75°C por 2 minutos, favorecendo desnaturação para posterior pareamento entre a sonda e a região a ser estudada. A lâmina foi acondicionada em câmara úmida e escura e permaneceu até o dia seguinte em estufa a 37°C.

No dia seguinte foram realizadas as lavagens pós-hibridização. A cola e a lamínula foram removidas e a lâmina lavada em 0,4x SSC a 72°C por 2 minutos e em solução 2x SSC, 0,05% Tween-20 pH 7, à TA por 30 segundos e sob agitação para remover ligações inespecíficas. Após as lavagens as lâminas foram coradas com 10µl de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), cobertas com nova lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência da marca Olympus modelo BX51 com filtros DAPI (365-400 λ), Fluorescein isothiocyanate (FITC) (450-520 λ) e Texas Red (510-590 λ). Todo

o processo de FISH foi realizado em sala escura para a proteção da fluorescência. Todos os casos foram analisados por dois observadores, com a contagem de 200 núcleos por cada um, e o resultado foi calculado pela média das duas análises.

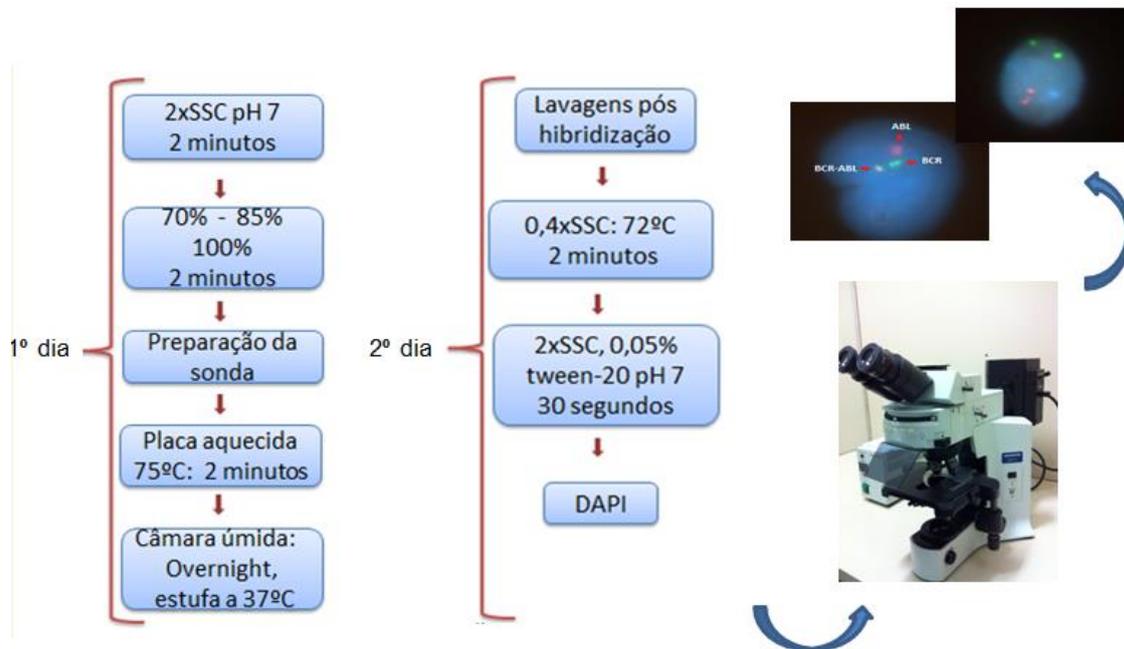


Figura 7- Passos para o resultado na citogenética molecular (FISH). Fonte própria.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos dados clínicos e demográficos, extraídos dos prontuários médicos, foi utilizada a análise descritiva. Compararam-se os resultados positivos das amostras de medula óssea dos 20 pacientes através de duas técnicas citogenéticas: a clássica e a molecular (FISH). Foi realizada a análise de todos os pacientes em cada técnica, comparando o sexo, a idade, a procedência e a fase da doença no momento do estudo.

O programa utilizado foi o SPSS versão 20. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados e confirmou que se tratava de um teste não-paramétrico. Foi calculado o valor de P (Teste de Mann-Whitney e X^2) e somente os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.8.1 Teste X^2

O teste X^2 foi utilizado para testar a hipótese de igualdade ou não entre os resultados das duas técnicas citogenéticas empregadas. Outro ponto levado em conta foi o tamanho da amostra, pois esse teste se aplica quando a amostra é maior ou igual a 20 e menor ou igual a 40.

4.8.2 Teste de Mann-Whitney

Foi utilizado para comparar os resultados obtidos através de duas técnicas diferentes, por ser um teste não-paramétrico. Este teste possibilitou a comparação entre a diferença das medianas e o grupo que foi analisado com citogenética clássica e molecular com, além de avaliar se duas populações possuem a mesma distribuição.

5 RESULTADOS

Neste trabalho foram analisadas, por citogenética clássica e molecular (FISH), 20 amostras de medulas ósseas de pacientes com LMC em tratamento com TKI, procedentes de todo o Estado da Bahia. Os dados clínicos obtidos nos prontuários destes pacientes estão apresentados na Tabela 1. Destes, 8 eram do sexo feminino (40%) e 12 do sexo masculino (60%). A faixa etária dos pacientes variou entre 20 e 65 anos, com média de 43,6 anos. Em relação à fase da doença, no momento do diagnóstico, 13 (65%) estavam na fase crônica, 7 (35%) em fase acelerada e nenhum em crise blástica.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes.

Caso	Sexo	Idade	Fase da doença ao diagnóstico
1	Feminino	21	Acelerada
2	Masculino	20	Acelerada
3	Feminino	56	Acelerada
4	Masculino	60	Crônica
5	Masculino	60	Crônica
6	Feminino	30	Acelerada
7	Feminino	52	Crônica
8	Masculino	56	Acelerada
9	Masculino	57	Crônica
10	Feminino	32	Crônica
11	Masculino	28	Crônica
12	Masculino	48	Acelerada
13	Masculino	47	Acelerada
14	Masculino	41	Crônica
15	Feminino	41	Crônica
16	Masculino	58	Crônica
17	Masculino	28	Crônica
18	Feminino	44	Crônica
19	Masculino	29	Crônica
20	Feminino	65	Crônica

A Figura 8 demonstra a relação dos resultados positivos na técnica da citogenética clássica com as variáveis clínicas apresentadas na Tabela 1. Em relação ao sexo, 50% eram do sexo masculino e 50% do sexo feminino. Quanto à fase da doença, 75% dos pacientes estavam na fase acelerada e apenas 25% na fase crônica. Em relação à faixa etária, 25% tinham mais de 40 anos e 75% menos de 40 anos.

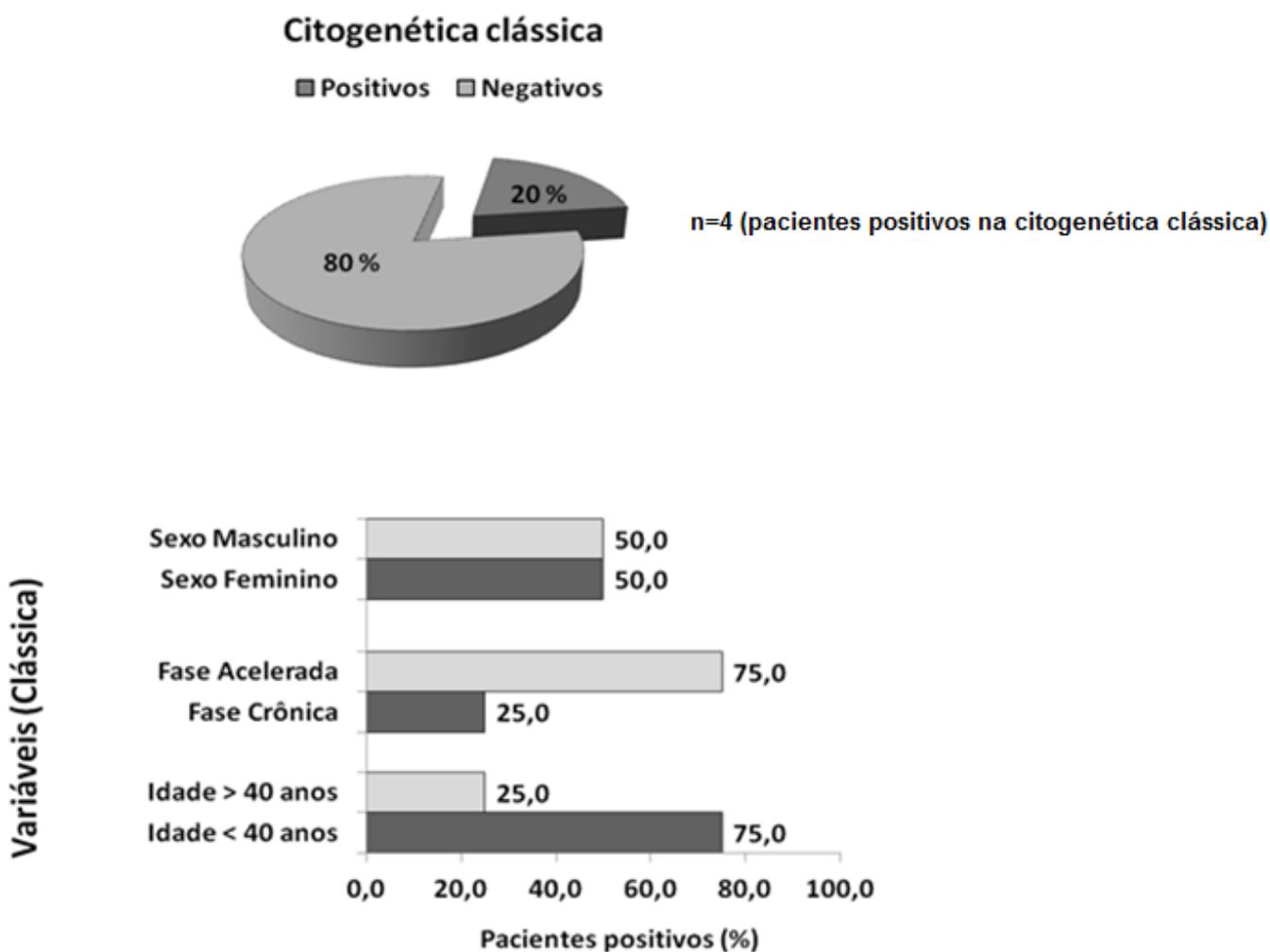


Figura 8- Análise das variáveis clínicas dos pacientes positivos na técnica clássica.

A Figura 9 demonstra a relação dos resultados positivos na técnica molecular (FISH) com as variáveis clínicas apresentadas na Tabela 1. Dentre estes, 55,6% era do sexo masculino, revelando discreta predominância em relação ao sexo feminino, que foi de

44,4%. A fase da patologia que a FISH apresentou mais resultados positivos foi a crônica, com 66,7% e na acelerada com 33,3%. Em relação à faixa etária 66,7% tinham mais de 40 anos e 33,3% menos de 40 anos.

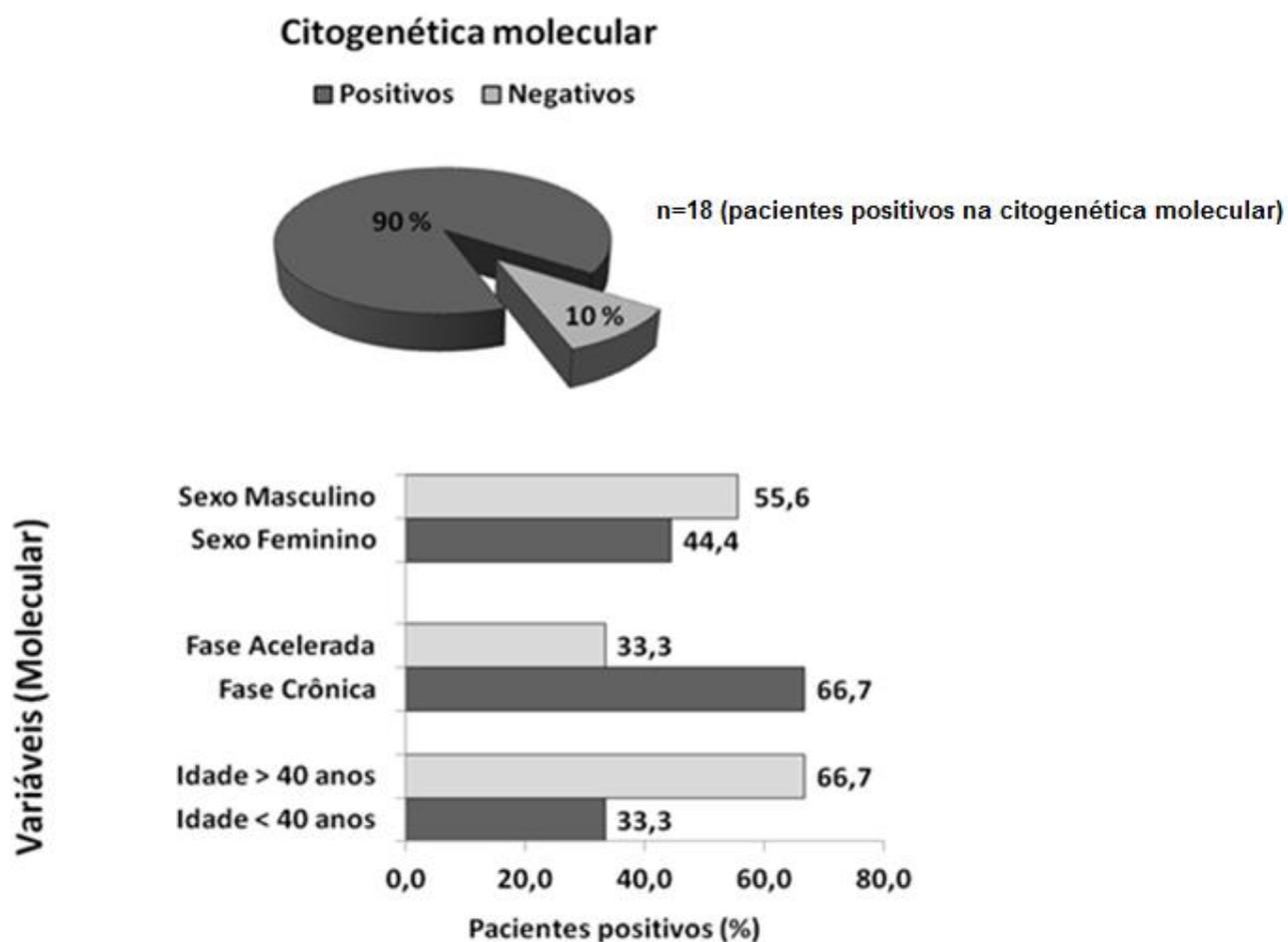


Figura 9- Análise das variáveis clínicas dos pacientes positivos na técnica molecular (FISH).

Dados referentes à data em que o paciente foi diagnosticado com LMC, o resultado da citogenética clássica ao diagnóstico e o inibidor utilizado no início do tratamento, estão representados na Tabela 2. No momento do diagnóstico, 17 pacientes (85%) apresentaram 100% de células com cromossomo Ph positivo e 3 (15%) apresentaram mais de 80% de células com cromossomo Ph positivo. Em um dos casos, além de células Ph positivo foi observada a presença da trissomia do cromossomo 8.

Tabela 2. Data, citogenética clássica e TKI ao diagnóstico.

Caso	Data do diagnóstico	Citogenética clássica ao diagnóstico	TKI ao diagnóstico
1	02.2011	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
2	2007	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
3	09.2011	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
4	2004	46,XY[4]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[16]	Imatinibe
5	02.2011	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]	Imatinibe
6	03.2012	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
7	2005	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
8	2009	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
9	2003	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
10	2007	46,XX[1]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]	Imatinibe
11	2010	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
12	2004	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
13	2009	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[8]/ 47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[12]	Imatinibe
14	2002	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
15	2006	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
16	2003	46,XY[3]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[17]	Imatinibe
17	2003	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
18	2008	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10]	Imatinibe
19	2007	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe
20	2009	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	Imatinibe

Todos os pacientes iniciaram o tratamento com o imatinibe, um inibidor de primeira linha que está relacionado a uma acentuada melhora no prognóstico em todas as três fases da doença. Em relação ao tempo de tratamento até o momento da coleta de medula óssea, 19 (95%) pacientes já faziam uso de inibidor por mais de doze meses e em apenas 1 (5%) caso, essa terapia era administrada em um tempo menor que doze meses.

A Tabela 3 sumariza os inibidores utilizados pelos pacientes quando a medula óssea foi encaminhada para a realização das análises citogenéticas e os resultados dessas análises

após uso do TKI. No momento do estudo, 12 pacientes (60%) ainda estavam utilizando o imatinibe, 6 (30%) estavam utilizando o dasatinibe e 2 (10%) passaram a utilizar nilotinibe. Os pacientes que sofreram mudança na conduta terapêutica, e as causas que levaram a essa alteração, estão representados na Tabela 4.

Tabela 3. TKI utilizado no momento do estudo e citogenética clássica durante o uso do TKI.

Caso	TKI no estudo	Citogenética Clássica durante o tratamento
1	Imatinibe	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/ 46,XX[27]
2	Imatinibe	Inconclusivo
3	Dasatinibe	Inconclusivo
4	Dasatinibe	46,XY,inv(9)(p11;q12)[30]
5	Imatinibe	Inconclusivo
6	Imatinibe	46,XX, t(9;22)(q34;q11)[15]
7	Imatinibe	46,XX[20]
8	Dasatinibe	46,XY[25]
9	Imatinibe	46,XY[30]
10	Imatinibe	46,XX[20]
11	Dasatinibe	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/ 46,XY[23]
12	Nilotinibe	46,XY[20]
13	Imatinibe	47,XY,+8[30]/ 46,XY[14]
14	Imatinibe	46,XY[12]
15	Dasatinibe	46,XX[12]
16	Nilotinibe	46,XY[15]
17	Imatinibe	46,XY[20]
18	Imatinibe	46,XX[20]
19	Dasatinibe	Inconclusivo
20	Imatinibe	46,XX[20]

Tabela 4. Causas para mudança da terapia em alguns pacientes do estudo.

Caso	Imatinibe	Tempo até a falha/intolerância	Dasatinibe	Tempo até a falha/intolerância	Nilotinibe
3	Intolerante	8 meses	Em uso		
4	Intolerante	8 anos	Em uso		
8	Intolerante	8 meses	Em uso		
11	Refratário	15 meses	Em uso		
12	Refratário	5 anos	Refratário	2 anos	Em uso
15	Refratário	3 anos	Em uso		
16	Refratário	4 anos	Intolerante	2 anos	Em uso
19	Refratário	12 meses	Em uso		

Após o uso do TKI, 4 resultados (20%) foram inconclusivos, devido a falta de crescimento celular ou impossibilidade de análise. O cariótipo normal foi observado em 12 pacientes (60%), 6 do sexo masculino (54,5%) e 5 do sexo feminino (45,5%). Entre os casos alterados 3 (15%) apresentavam a translocação entre os cromossomos 9 e 22 (cromossomo Ph) e 1 ainda apresentava trissomia do cromossomo 8 (5%), que indica uma pior evolução do quadro leucêmico. Apenas 1 paciente (5%), apresentou inversão do cromossomo 9, um polimorfismo normal, que até o presente momento não acarreta nenhuma consequência para o paciente.

A Figura 10 demonstra estatisticamente a importância de observar o tempo de uso dos inibidores pelos pacientes. Apenas 1 paciente (5%) utilizava um dos inibidores a menos de 12 meses e ainda não apresentava resposta citogenética, possuindo 100% de células com cromossomo Ph positivo. Dos pacientes que utilizavam inibidor a mais de 12 meses, 84,2% responderam a terapia, demonstrando resultados negativos, enquanto 15,8% ainda possuíam citogenética clássica positiva.

A Figura 11 sumariza a evolução da citogenética clássica e da terapia utilizada. Inicialmente todos os pacientes apresentaram alteração cromossômica específica da LMC, o cromossomo Ph, que determinou o diagnóstico e possibilitou a utilização do uso do inibidor de TK.

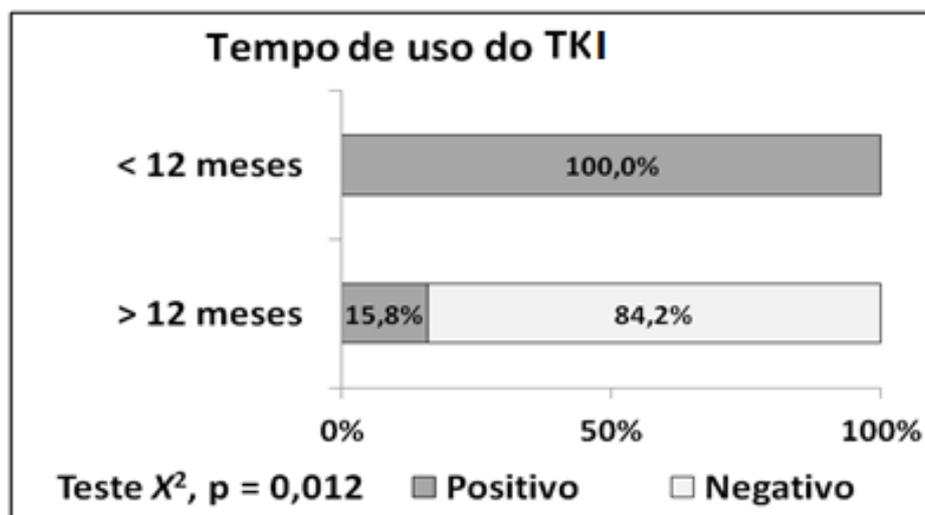


Figura 10- Resposta citogenética em relação ao tempo de uso do TKI nos pacientes

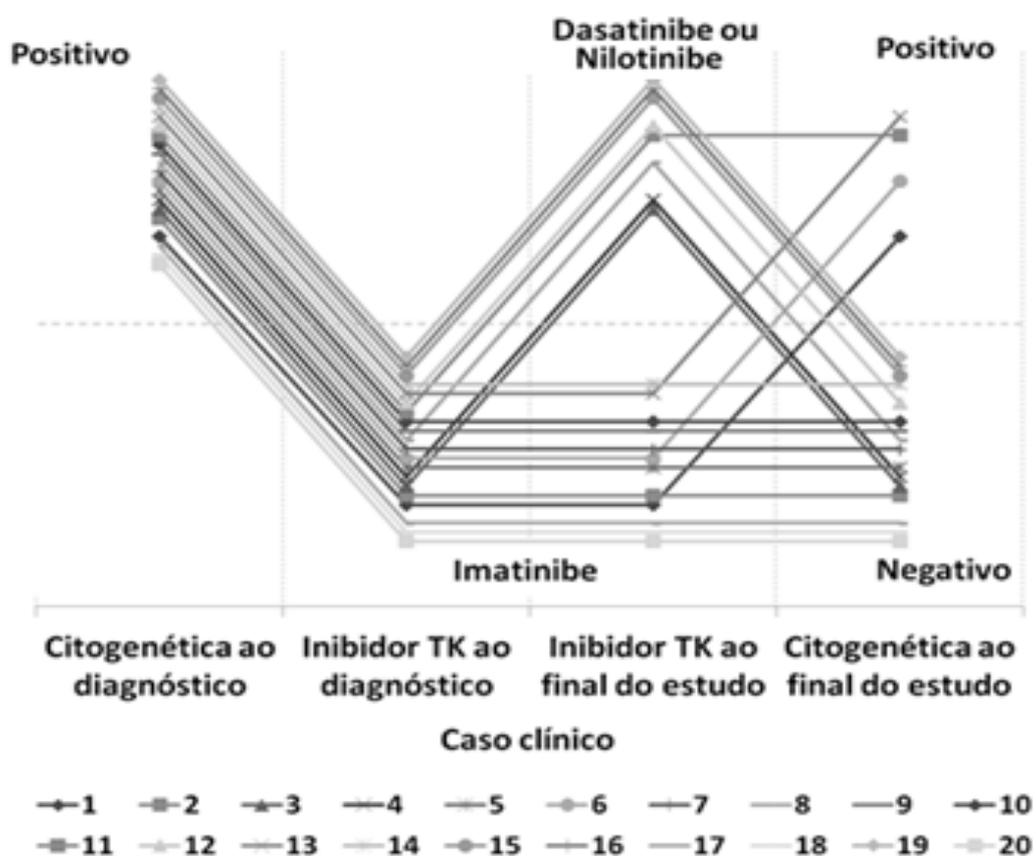


Figura 11- Evolução da citogenética clássica e terapia utilizada

Na Tabela 5 estão descritos os resultados obtidos na citogenética molecular (FISH), onde 18 pacientes (90%) apresentaram o rearranjo BCR-ABL e apenas 2 (10%) demonstraram ausência do rearranjo. Não ocorreu nenhum óbito até o momento em que os pacientes foram acompanhados por esse estudo.

Tabela 5 Resultados da citogenética molecular (FISH).

Caso	Resultado da Citogenética Molecular (FISH)
1	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[34/200]
2	nuc ish(ABL,BCR)x2[200]
3	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[33/200]
4	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
5	nuc ish(ABL,BCR)x2[200]
6	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[200/200]
7	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[36/200]
8	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[12/200]
9	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
10	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]
11	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[42/200]
12	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
13	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
14	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]
15	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
16	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[12/200]
17	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
18	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
19	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[26/200]
20	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]

De acordo com os resultados, a citogenética clássica demonstra uma menor sensibilidade para observar as alterações presentes na LMC. A técnica molecular possibilitou resultados em todas as análises, revelando a presença do rearranjo BCR-

ABL quando o Ph não era identificado na técnica convencional ou confirmando sua ausência (Figura 12). Nos casos com resultados inconclusivos essa técnica foi fundamental para a conclusão diagnóstica e posterior acompanhamento, manutenção ou mudança na conduta terapêutica realizada. A evolução completa dos resultados da citogenética e a terapia utilizada estão apresentadas no Apêndice A.

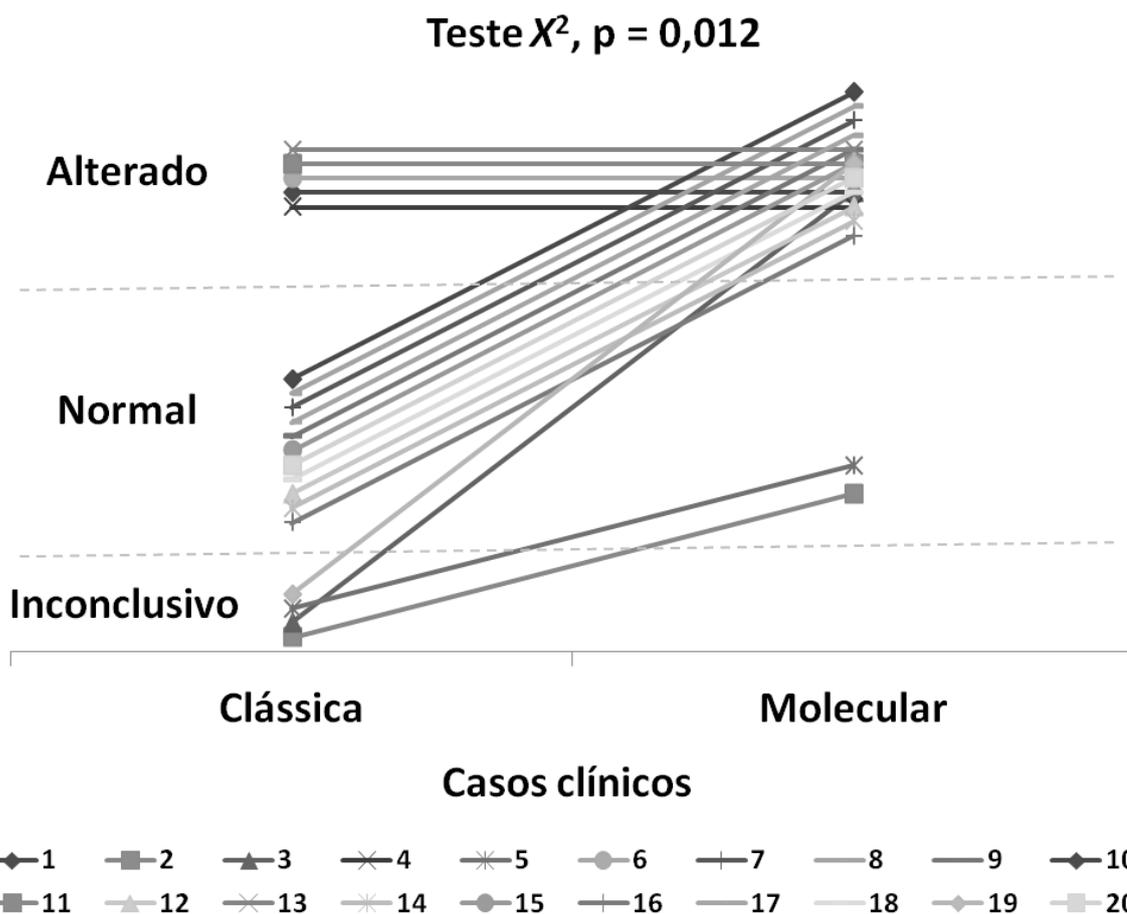


Figura 12- Comparação entre os resultados clássico e molecular (FISH). Teste X^2 quadrado.

As frequências relativas do cromossomo Ph, observadas na análise citogenética por bandamento G e as frequências do rearranjo BCR-ABL detectados pela técnica de FISH, estão apresentadas na Tabela 6 e Figura 13. O cromossomo Ph foi observado em 3 dos casos estudados por citogenética convencional (15%), enquanto o rearranjo BCR-

ABL foi identificado em 18 casos pela FISH (90%). A figura 13 demonstra estatisticamente a sensibilidade e especificidade da técnica molecular (FISH).

Tabela 6. Frequência de metáfases submetidas ao bandamento G com a translocação t(9;22)(q34;q11) e frequência de núcleos com o rearranjo BCR/ABL detectados por FISH.

Caso	Frequência de metáfases com Ph (%)	Núcleos com fusão BCR-ABL (%)
1	10	17
2	0	0
3	0	16,5
4	0	8
5	0	0
6	100	100
7	0	18
8	0	6
9	0	5
10	0	7
11	23,33	21
12	0	8
13	0	5
14	0	7
15	0	5
16	0	6
17	0	5
18	0	8
19	0	13
20	0	7

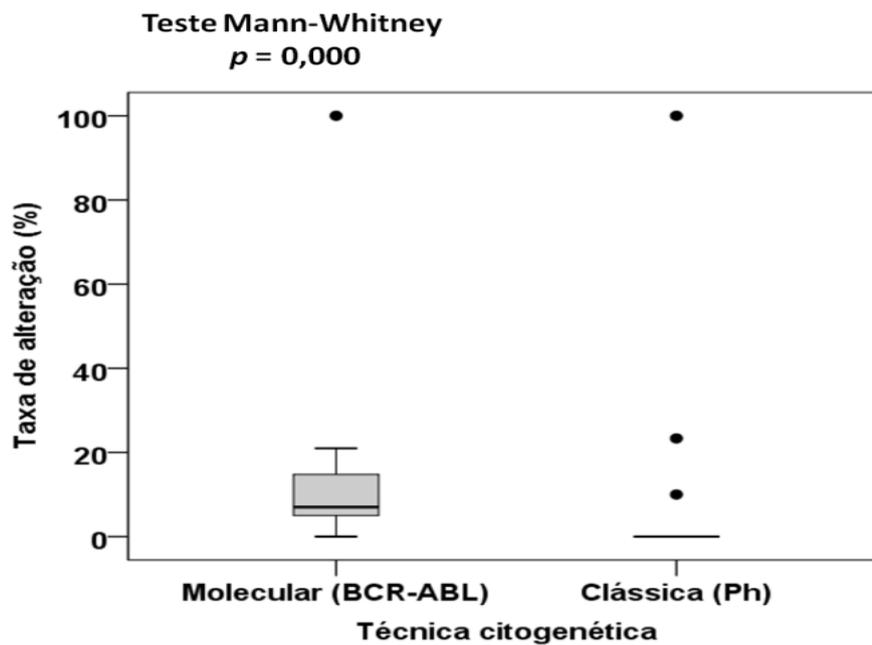


Figura 13- Percentual de alterações nas técnicas citogenéticas clássica (cromossomo Ph) e molecular (rearranjo BCR-ABL). Teste de Mann-Whitney.

5.1 RESULTADOS DA CITOGÉNÉTICA CLÁSSICA



Figura 14- Ilustração do cariótipo de um caso normal. Captura realizada em sistema computadorizado Applied Imaging.

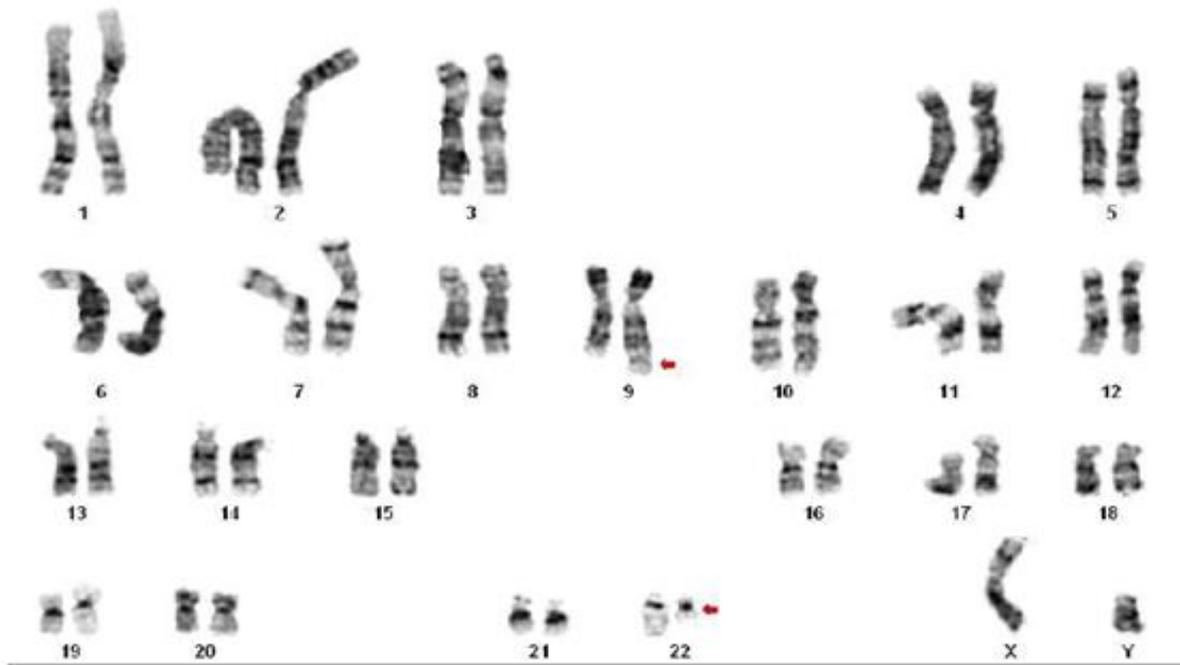


Figura 15- Ilustração do cariótipo de um caso alterado, paciente com t(9;22). Captura realizada em sistema computadorizado Applied Imaging.

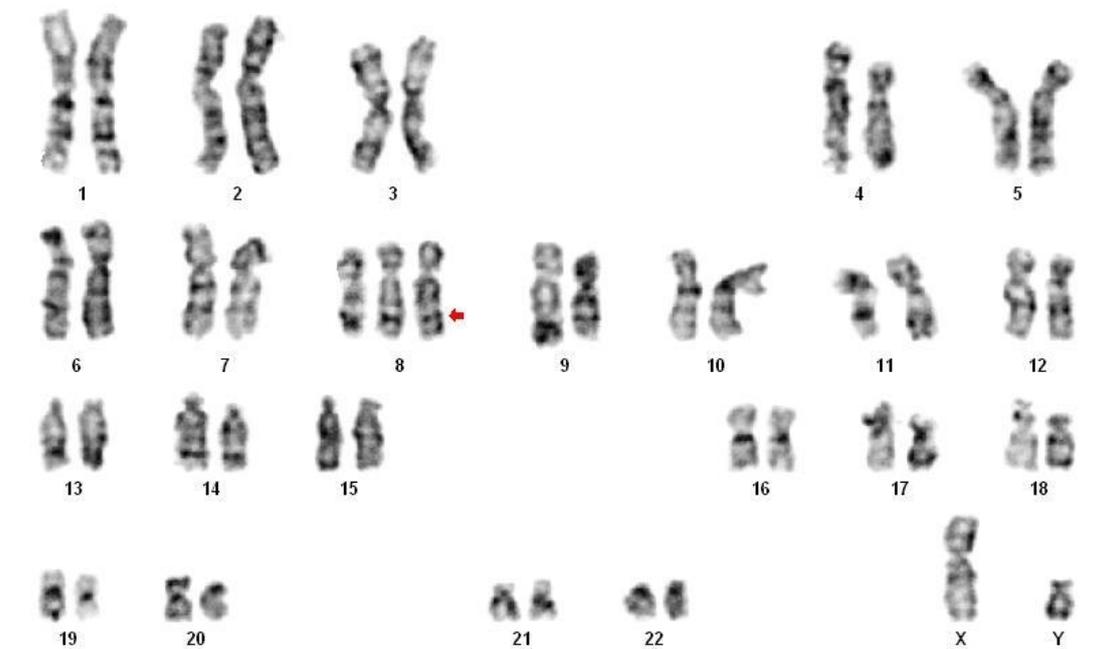


Figura 16- Ilustração do cariótipo de um caso alterado, paciente com trissomia do cromossomo 8. Captura realizada em sistema computadorizado Applied Imaging.

5.2 RESULTADOS DA CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH)

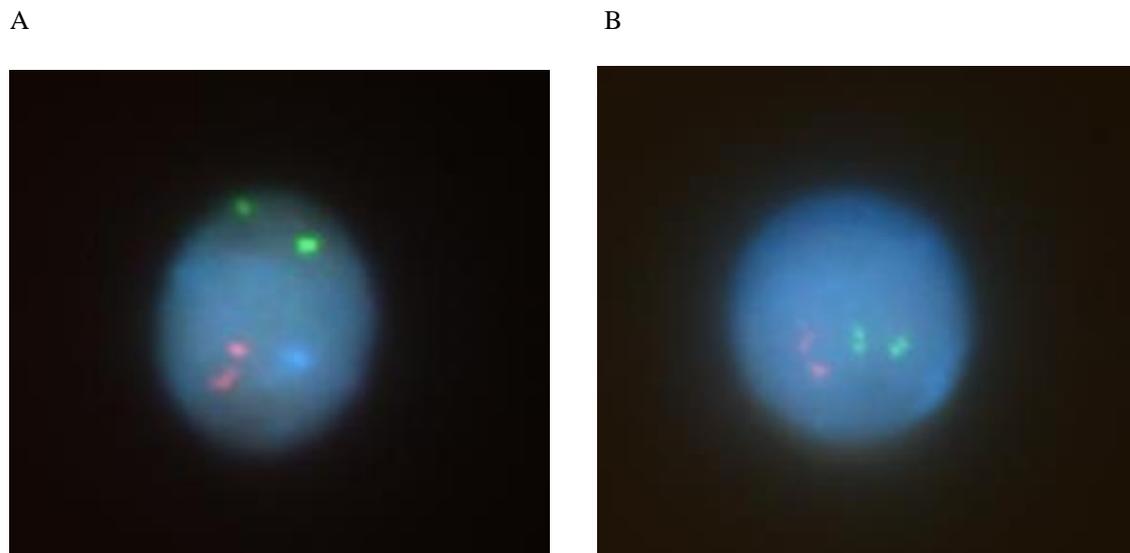


Figura 17- Ilustração da FISH com sonda a LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans. Em A e B, casos normais com presença de dois sinais vermelhos e dois sinais verdes. (Captura realizada em sistema computadorizado Applied Imaging. Aumento: 100X).

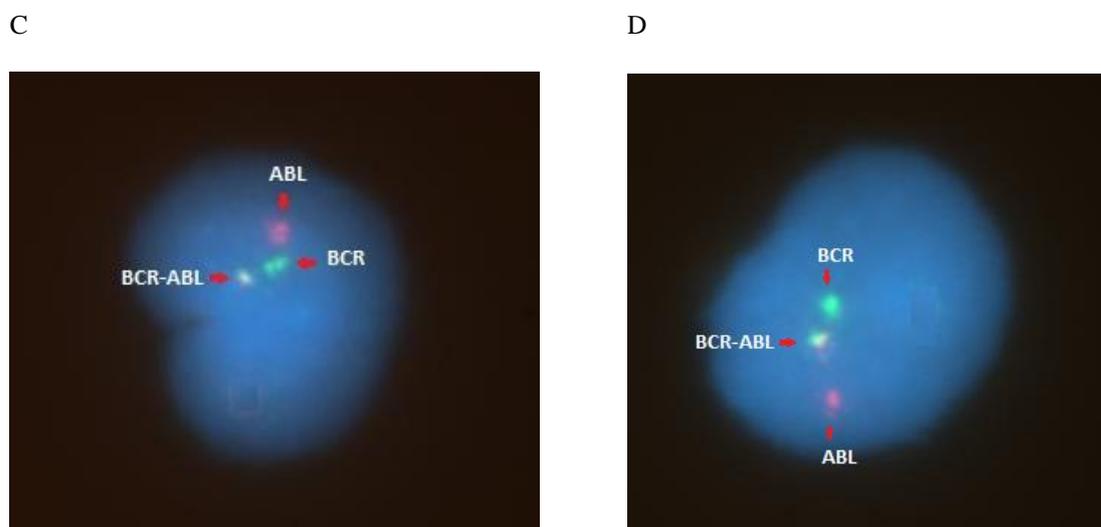


Figura 18- Ilustração da FISH com sonda a LSI BCR/ ABL Dual C, Dual F, Trans. Em C e D, casos alterados com uma fusão representando a t(9;22), um sinal verde e um sinal vermelho. (Captura realizada em sistema computadorizado Applied Imaging. Aumento: 100X).

6 DISCUSSÃO

A LMC é uma neoplasia com curso clínico heterogêneo que varia a depender da fase da doença. Todo o avanço tanto no diagnóstico mais precoce, quanto na melhora da conduta terapêutica desses pacientes, tem estimulado muitos estudos na busca do aperfeiçoamento do conhecimento acerca de todos os mecanismos envolvidos na transformação maligna da célula. Nesse contexto as alterações cromossômicas possuem grande importância e são consideradas fundamentais na gênese e evolução do quadro.

São diversas as estratégias de análise genética das células leucêmicas e estas incluem além da citogenética clássica e da técnica de FISH, a técnica de polymerase chain reaction (PCR), a reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR), a comparative genomic hybridization (CGH), entre outras. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de FISH aliada à citogenética clássica no monitoramento de pacientes com LMC em terapia com TKI. Essas técnicas permitem a detecção do rearranjo BCR-ABL e do cromossomo Ph, fundamentais para o diagnóstico e prognóstico da LMC.

As alterações mais comuns nessa patologia e as técnicas utilizadas para identificá-las já foram demonstradas em muitos trabalhos na literatura, entretanto a realização desse estudo ganha importância em decorrência da carência de dados e pesquisas nesta área em nosso Estado. Com os dados obtidos no presente estudo objetiva-se fortalecer as nossas bases em pesquisa, atentando para a assistência, auxílio diagnóstico, capacitação técnica e científica, além de permitir um diagnóstico mais específico dos pacientes.

A Tabela 1 sumarizou os dados clínicos como o sexo, idade e fase da doença em que o paciente desse estudo estava no momento do diagnóstico da LMC, mostrando discreta predominância do sexo masculino, corroborando com dados apresentados na literatura (GIGLIO e BOLLMANN, 2011; BORTOLHEIRO e CHIATTINE, 2008). A faixa etária mais atingida pela LMC, segundo Ferdinand *et al.*, 2012 varia entre 45 a 55 anos com média de 66 anos, entretanto esse estudo demonstrou uma variação entre 20 e 65 anos, com média de 43,6 anos. De acordo com a fase da doença no momento do diagnóstico, houve uma predominância da fase crônica em relação à fase de aceleração,

corroborando com dados apresentados no estudo realizado por Vendrame-Goloni *et al*, 2006.

A análise clássica, embora mais demorada e dependente da obtenção de metáfases em boas condições, tem grande importância. De acordo com Chauffaille, 2008, para que o acompanhamento adequado da resposta dos pacientes à utilização da terapia com TKI seja possível é necessário que se conheça o padrão inicial do cariótipo. Ao diagnóstico existem além do cromossomo Ph clássico, cromossomos Ph com alterações adicionais, variantes simples do cromossomo Ph, evolução clonal ou outras anomalias (CORTES *et al.*, 2003), que são importantes para o monitoramento desses pacientes.

A Tabela 2 mostra os dados obtidos dos prontuários em relação ao resultado da citogenética clássica e o inibidor utilizado ao diagnóstico. Todos apresentavam o cromossomo Ph, dados que coincidem com os resultados apresentados por Vendrame-Goloni *et al*, 2006. Esses pacientes foram tratados inicialmente com o imatinibe, um inibidor de TK de primeira escolha, que segundo Negrine e Schiffer, 2012, é considerado muito eficiente no tratamento inicial para a maioria dos pacientes em fase crônica. Os pacientes que foram diagnosticados já em fase acelerada também receberam o imatinibe, pois os inibidores de segunda geração devem ser administrados somente quando não existir resposta citogenética (KANTARJIAN *et al.*, 2008).

Somente em um dos casos (5%), o caso 13, além do clone Ph positivo verificou-se a presença de outro clone com trissomia do cromossomo 8, dado que coincide com o estudo realizado por Alimena *et al.*, 2006, que relatou que a detecção da evolução clonal apresenta correspondência clínica com a progressão da doença para fase acelerada ou crise blástica e está presente em 7% dos casos de LMC ao diagnóstico.

A resposta ao tratamento é dependente do tempo em que o TKI está sendo administrado. Dos pacientes selecionadas para esse trabalho, com exceção do caso 6, todos estavam em tratamento a mais de 12 meses. Dos que iniciaram o tratamento com o imatinibe e estavam em uso a mais de 18 meses, 77,8% apresentaram resposta citogenética maior (RCM), corroborando com os dados do estudo de O'Brien *et al*, 2003. Este comparou o imatinibe com o interferon associado à citarabina em pacientes com LMC ainda não tratados e demonstrou que a taxa estimada de RCM aos 18 meses era de 87,1% para o

grupo do imatinibe e de 34,7% no grupo que recebeu interferon e citarabina, comprovando a eficácia desse fármaco quando administrado ao diagnóstico.

O inibidor utilizado no momento da coleta de medula óssea para a análise desse estudo e os resultados da citogenética clássica durante tratamento estão representados na Tabela 3, revelando dados importantes para entender a evolução citogenética após tratamento com TKI. Destes, 12 pacientes (60%) apresentaram RCM e 4 (20%) ainda não apresentavam resposta ao tratamento (ABREU e LOPES, 2009). Os casos 2, 3, 5 e 19 (20%) não foram avaliados quanto à evolução por apresentarem resultado inconclusivo na técnica clássica, devido ausência de crescimento celular ou impossibilidade de análise, o que foi observado também em outros estudos.

Os pacientes que iniciaram o tratamento com imatinibe passaram a usar o dasatinibe devido à falha terapêutica ou intolerância. Os pacientes refratários, que falharam ao tratamento inicial, foram avaliados após 12 meses, conduta que coincidem com a apresentada por Pagnano, 2008. Destes pacientes, 3 (50%) apresentaram RCM, 1 (16,7%) apresentou resposta citogenética parcial e 2 (33,3%) apresentaram resultado inconclusivo pela ausência de crescimento celular (DELAMAIN e CONCHON, 2008)

Segundo Chauffaille , 2009, os pacientes que não respondem ou apresentam intolerância ao imatinibe e ao dasatinibe passam a utilizar a terceira opção de tratamento, o nilotinibe, e apresentam RCM, o que também foi observado no presente estudo onde 100% dos pacientes tratados com nilotinibe apresentaram citogenética clássica normal. Tanto o dasatinibe quanto o nilotinibe são muito eficazes em pacientes resistentes ao imatinibe, exceto naqueles portadores da mutação T315I, e também em pacientes resistentes por mecanismos independentes da mutação BCR-ABL (ABREU e LOPES, 2009).

Os resultados das análises da citogenética molecular (FISH) estão sumarizados na Tabela 5. Em todos os casos a técnica possibilitou um diagnóstico, estabelecendo resultado nas análises e demonstrando sua especificidade. Os casos 2 e 5 não apresentaram o rearranjo BCR-ABL, entretanto a FISH foi importante para estabelecer um diagnóstico, pois por falta de crescimento celular, logo impossibilidade de análise, obtiveram resultado inconclusivo na técnica convencional. Os casos 3 e 19 também

foram inconclusivos na técnica clássica, entretanto revelaram um percentual consideravelmente elevado de rearranjo BCR-ABL, 16,5% e 13% respectivamente (Tabela 6), demonstrando que a FISH foi fundamental para estabelecer a conduta terapêutica a ser adotada nesses pacientes.

Nos casos 1, 6 e 11 a análise molecular concordou com os achados na técnica convencional, entretanto foi importante para concluir de maneira mais segura o resultado, pois, mesmo após alteração do inibidor inicialmente utilizado, esses pacientes ainda apresentavam o cromossomo Ph e, de acordo com Chauffaille 2008, a FISH é fundamental em casos de resistência ao tratamento quando pode evidenciar reaparecimento do rearranjo ou mesmo mais de uma cópia por ocasião da amplificação da fusão gênica.

O caso 7 apresentou resultado normal na técnica convencional, entretanto ao ser analisado pelo método molecular revelou a presença de 18% de rearranjo BCR-ABL (Tabela 6), demonstrando a importância de aliar o diagnóstico molecular ao clássico. Segundo Chauffaille, 2008, na ausência do cromossomo Ph em caso clinicamente compatível com LMC se tornam necessária a investigação do rearranjo BCR-ABL por métodos moleculares, tais como, FISH ou PCR, já que o mesmo pode estar presente na ausência de alteração cromossômica quando essas células não entram em divisão e, por conseguinte, o clone não pode ser detectado pelo método convencional.

Desse modo, este trabalho demonstrou a importância da associação das técnicas citogenéticas clássica e molecular (FISH) no acompanhamento de pacientes com LMC em tratamento com TKI. Tendo em vista as limitações desse estudo, novos trabalhos que possibilitem uma avaliação mais completa se fazem necessários para comprovar os resultados aqui apresentados.

7 CONCLUSÃO

Na LMC existem algumas alterações genéticas que surgem a depender da fase da doença e são identificadas no estudo genético. Nas últimas décadas, a análise citogenética tem se tornado crucial na conduta de pacientes com essa patologia, uma vez que permite o diagnóstico, análise da evolução do quadro, acompanhamento mais direcionado e a definição terapêutica, o que resulta em uma conduta mais específica e sensível por apresentarem as vantagens e desvantagens das duas análises.

A técnica citogenética detectou 20% de alterações cromossômicas, o que pode ser explicado pela dificuldade em obter metáfases e devido a essa dificuldade, 4 pacientes apresentam resultado inconclusivo. É uma técnica mais trabalhosa e requer qualificação profissional, pois a identificação dos cromossomos não é simples. A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) possibilitou resultado em 100% dos casos, sendo que 90% apresentaram o rearranjo estudado, é mais rápida, com maior especificidade e resolução muito específica, mas não possibilita a identificação de outras alterações.

Esse trabalho compreende o primeiro passo para um entendimento mais completo acerca do perfil epidemiológico e molecular dos pacientes com LMC no Estado da Bahia, entretanto seria de grande importância um estudo com maior número de pacientes com mais situações clínicas, a fim de proporcionar melhor avaliação e permitir a definição de orientações mais eficientes. A padronização das técnicas utilizadas é um avanço importante para o Estado da Bahia, pois além de tornar possível a resolução de casos críticos, supre uma necessidade local da utilização dos recursos dessas técnicas no estudo de muitas outras doenças onco-hematológicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. T. C. L.; LOPES, N. R. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 449-453, dec. 2009.
- ABRUZZESE, E. et al. Characterization of Ph negative abnormal clones emerging during imatinib therapy. **Cancer**, v. 109, n. 12, p. 2466-2472. June 2007.
- ALIMENA, G. et al. Sudden blast crisis in patients with Philadelphia chromosomepositive chronic myeloid leukemia who achieved complete cytogenetic remission after imatinib therapy. **Cancer**, n. 107, p. 1008-1013. 2006
- ALVARENGA, T. F. et al. Efeitos adversos e resposta citogenética em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com imatinibe. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 32, n. 2, p. 116-122, set. 2010.
- ANDRIKOVICS, H. et al. First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL transcripts. **Hematol Oncol**, v. 25, n. 3, p. 143-147, Sep. 2007.
- BACCARANI M, *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **J. Clin. Oncol**, v. 27, n. 35, p 6041-6051, Dec. 2009.
- BACCARANI, M. et al. Dasatinib time to and durability of major and complete cytogenetic response (MCyR and CCyR) in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP). **Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts), v. 112, p. 450, Nov. 2008.
- BACCARANI, M. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the european leukemia net. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1809-1820, 2006.
- BAO, F. et al. Comparative gene expression analysis of a chronic myelogenous leukemia cell line resistant to cyclophosphamide using oligonucleotide arrays and response to tyrosine kinase inhibitors. **Leuk Res**, v. 31, n. 11, p. 1511-20, 2007.
- BARCH, M. J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J et al. **The AGT cytogenetics laboratory**: manual. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1997.
- BEJANI, B.; SHAFFER, L. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**, v. 9, p. 71-86, May 2008.
- BOLLMANN, P. W.; GIGLIO, A.D. Leucemia mieloide crônica: passado, presente, futuro. **Einstein**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 236-243, mai. 2011.

BORTOLHEIRO, T. C; CHIATTONE, C.S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 3-7, abr. 2008.

BRASIL. Portaria nº347, de 23 de junho de 2008. Altera o item 4 do anexo da portaria SAS/MS Nº 431, de 03 de outubro de 2001, conforme anexo desta portaria. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 de out. 2001. p. 85, seção I.

CAMPOS, M. V. G. et. al. Cromossomo Ph mascarado em crise blástica linfóide de LMC. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 25, p. 81, 2003. Suplemento 2.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 308-316, ago. 2010.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Leucemia mielóide crônica: tratamento baseado em evidências. **Diagn. Tratamento**, v. 14, n. 2, p. 62-65, abr./jun. 2009.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Cytogenetics and FISH monitoring CML during tyrosine kinase inhibitors treatment. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São Paulo, v. 30, p. 13-19, Apr. 2008. Suplemento 1.

CLOUSTON, H. J. Lymphocyte culture. In: ROONEY, D. E. (Eds.). **Human Cytogenetics**, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

CONCHON, M. Leucemia mielóide crônica: diagnóstico e tratamento. **Prática Hospitalar**, v. 11, n. 65, set./out. 2009.

CONNOR, J.; FERGUNSON-SMITH, M. **Essential medical genetics**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1984.

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

DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. São Paulo. v.30, apr. 2008 Suplemento 1.

DEININGER, M. et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1509-1519. Oct. 2007.

DRUKER B. J, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v. 355, n. 23, p. 2408-2417. Dec. 2006.

FAUSEL, C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. **J. Manag. Care Pharm.**, v. 13, p. 8-12, Oct. 2007. Suppl. A.

FERDINAND, R.; MITCHELL, S. A.; BATSON, S.; TUMUR, I. Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review. **Journal of Blood Medicine**, v. 3, p. 51–76. Aug. 2012.

FUNKE, V. M. et al. Leucemia mieloide crônica e outras doenças mieloproliferativas crônicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São Paulo, v. 32, p. 71-90, mai. 2010. Suplemento 1.

GOLDMAN, J. M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2828-2837. Oct 15. 2007.

GUERRA, M. (Ed.). **FISH: conceitos e aplicações**. Ribeirão Preto-SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.

GUSTASHAW, K. M. Chromosome stains. In: Barch, M. J.; Knutsen T.; Spurbeck, J. (Eds.). **The AGT cytogenetics laboratory: manual**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1997.

HAFERLACH, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. **J. Clin. Oncol**, v. 28, n. 15, p. 2529-2537. May. 2010.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **J. Pediatr**, Porto Alegre, v. 84, n. 4, p. 52-57. ago. 2008.

HOFBRAND, A. F.; CATOVSKY, D.; TUDDENHAM, E. G. D. (Eds.). **Postgraduate haematology**. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p. 492-95

ISCN. **An International System for Human Cytogenetics Nomenclature**. Basel: Karger, 2009.

JABBOUR, E. et al. Current and Emerging Treatment Options in Chronic Myeloid Leukemia. **Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2171-2181. Mar. 2007.

JAMIESON, C. H. Chronic myeloid leukemia stem cells. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 436-442. Jan. 2008.

JOSKE, D. J. Chronic myeloid leukemia: the evolution of gene-targeted therapy. **Med. J. Aust**, v. 189, n. 5, p. 277-282. 2008.

KANTARJIAN, H. M. et al. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6322-6329. 2009.

KANTARJIAN, H. M. et al. Dasatinib 140mg once daily (QD) demonstrates equivalent efficacy and improved safety compared with 70mg twice daily (BID) in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia (CML-AP): 2-year follow-up data from CA180-035. **Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts), v. 112, p. 3224. Nov. 2008.

KOLDEHOFF, M. et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukemia. **Bone Marrow Transplant.** v. 34, n. 12, p. 1047-1050, 2004.

KURAMATO, A. C. K.; SILVA, A. E. B. B.; ULBRICH, A. et al. Desenvolvimento de abordagens moleculares para o estudo da transformação maligna por BCR-ABL: da genômica a novos quimioterápicos. In: 1º **Prêmio Saúde Oncologia da América Latina**, São Paulo. abr./mai. 2006.

LANDSTROM, A. P. et al. Utility of peripheral blood dual color, double fusion fluorescent in situ hybridization for BCR/ABL fusion to assess cytogenetic remission status in chronic myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 47, n. 10, p. 2055-2061. 2006.

LARSON, R. et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of IRIS study. **Blood**, v. 111, n. 8 p. 4022-4028. Apr. 2008.

LAWCE, H. J.; BROWN, M. G. Cytogenetics: an overview. In: BARCH, M. J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK J., **The AGT cytogenetics laboratory**: manual. Philadelphia: Lippincott Ravn Publishers. 1997. p. 19-73.

LEE Y.K. et al. Deletion of any part of the BCR or ABL gene on the derivative chromosome 9 is a poor prognostic marker in chronic myelogenous leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.**, v.166, n.1, p. 65-73. Apr. 1. 2006.

LIMA, C. P. **Genética humana**. 3. ed. São Paulo: Harbra, 1996, 442 p.

LORENZI, T. F. (Ed). Patologia dos Leucócitos. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2006.

LUNDÁN, T. et al. Comparison of bone marrow high mitotic index metaphase fluorescence in situ hybridization to peripheral blood and bone marrow real time quantitative polymerase chain reaction on the International Scale for detecting residual disease in chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 93, n. 2, p. 178-185. 2008.

MARIN, D. et al. Transient benefit only from increasing imatinib dose in CML patients who do not achieve complete cytogenetic remissions on conventional doses. **Blood**, v. 102, p. 2702-2703. 2003.

MARK, H. F.; SOKOLIC, R. A.; MARK, Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). **Exp. Mol. Pathol**, v. 81, n. 1, p. 1-7. 2006.

MASSZI. et al. Dasatinib 140 mg once daily (QD) demonstrates equivalent efficacy and improved safety compared with 70 mg twice daily (BID) in patients with chronic myeloid leukemia in blast phase (CML-BP): 2-Year Data from CA180-035. **Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts), v. 112, p. 3226. Nov 2008.

- MITELMAN, F. (**ISCN**): an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland: Karger, 1995.
- MONTENEGRO, V. S.; SANTOS, V. M. V. O.; VEITH, M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. **Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 10, n. 3, p. 5-12. 2008.
- MOOREHEAD, P. S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v. 20, p. 613-6. 1960.
- MORTON. Current protocols in Human Genetics. **Current Protocols**. 1994.
- NEGRINE, R.; SCHIFFER, C. A. Overview of the treatment of chronic myeloid leukemia. [On line]. Disponível em: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-chronic-myeloid-leukemia>. Acesso em: nov. 14 2012.
- NOWELL, P. C. Cytogenetic approaches to human cancer genes. **FASEB J** 8, p. 408-413. 1994.
- O'BRIEN, S. G. et al. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.** v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003
- PAGNANO, K. B. B. Leucemia Mielóide Crônica – Causas de falha do tratamento com mesilato de imatinibe **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 30, p. 22-26. 2008. Suplemento 1.
- QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, 2009.
- RAANANI, P. et al. Philadelphia-chromosome-positive T-lymphoblastic leukemia: acute leukemia or chronic myelogenous leukemia blastic crisis. **Acta Haematol**, v. 113, n. 3, p. 181-189. 2005.
- ROHRBACHER, M. 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**, v. 23, n. 3, p. 602-604. 2008.
- SANTOS, L. R.; MORRONE, F. B. Resultados do mesilato de imatinibe no tratamento da leucemia mielóide crônica: uma revisão bibliográfica. **Revista da Graduação**, v. 1, n. 1. 2008.
- SERAKINCI, N.; KOLVRAA, S. Molecular cytogenetic applications in diagnosis and research: an overview. In T. Liehr, **Fluorescence in situ hybridization (FISH): application guide** (p. 3). Berlin: Springer. 2009.
- SMEETS, D. Historical perspective of human cytogenetics: from microscope to microarray. **Clinical biochemistry**, v. 37, p. 439-446. 2004.

SPECTOR, N. Análise crítica das recomendações formuladas por um painel de experts para o cuidado clínico de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 30, p. 8-12. 2008. Suplemento 1.

SPEICHER, M.; CARTER, N. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Reviews**, v. 6, p. 782-792. 2005.

VALENT, P. et al. Diagnostic algorithms, monitoring, prognostication, and therapy in chronic myeloid leukemia (CML): a proposal of the Austrian CML platform. **Wien Klin Wochenschr**, v. 120, n. 21-22, p. 697-709. 2008.

VASCONCELOS, B. et al. Anormalidades cromossômicas nos pacientes atendidos em serviço de genética. **Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 26-32. 2007.

VEDRAME-GOLONI, C. B. et al. Análise do rearranjo BCR/ABL por bandamento GTG e FISH: comparação das frequências ao diagnóstico da LMC. **Arq. Cienc. Saúde**, 2006.

VIANNA, J. C. C.; ALMEIDA, E. C. P. Leucemia Mielóide Crônica: Tratamentos Empregados Nas Diferentes Fases Da Doença. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 1, n. 2, p. 60-69, jul-dez. 2006.

VIGORIOTO, A. et al. Análise do tratamento atual da leucemia mielóide crônica no Brasil: um estudo de 703 pacientes tratados com mesilato de imatinib em diversas instituições do País. In: 1º **Prêmio Saúde Oncologia da América Latina**; abr./mai; São Paulo, 2006.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A G. **Human Genetics**: problems and approaches. 3rd. ed. Berlin: Springer. 1997.

YAMAMOTO, J. F.; GOODMAN, M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. **Cancer Causes Control**, v. 19, n. 4, p. 379-390. 2008.

APÊNDICE A- Tabela com a evolução diagnóstica e terapêutica dos pacientes.

Caso	Citogenética Clássica ao diagnóstico	Inibidor de TK ao diagnóstico	Tempo de uso	Inibidor de TK no estudo	Citogenética Clássica após uso de TKI	Citogenética Molecular (FISH)
1	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[3]/46,XX[27]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[34/200]
2	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	Inconclusivo	nuc ish(ABL,BCR)x2[200]
3	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	Inconclusivo	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[33/200]
4	46,XY[4]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[16]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	46,XY,mv(9)(p11;q12)[30]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
5	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	Inconclusivo	nuc ish(ABL,BCR)x2[200]
6	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	> de 12 meses	IMATINIBE	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[15]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[200/200]
7	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XX[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[36/200]
8	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	46,XY[25]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[12/200]
9	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XY[30]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
10	46,XX[1]/46,XX,t(9;22)(q34;q11)[8]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XX[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]
11	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[7]/46,XY[23]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[42/200]
12	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	NILOTINIBE	46,XY[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
13	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[8] 47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11)[12]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	47,XY,+8[30]/46,XY[14]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
14	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XY[12]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]
15	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	46,XX[12]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
16	46,XY[3]/46,XY,t(9;22)(q34;q11)[17]	IMATINIBE	< de 12 meses	NILOTINIBE	46,XY[15]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[12/200]
17	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XY[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[10/200]
18	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XX[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[16/200]
19	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	DASATINIBE	Inconclusivo	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[26/200]
20	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]	IMATINIBE	< de 12 meses	IMATINIBE	46,XX[20]	nuc ish(ABLx2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[14/200]

APÊNDICE B-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **“Análise Citogenética e Molecular (FISH) de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em terapia com Inibidores de Tirosino quinase no Estado da Bahia.”** Caso tenha mais do que 18 anos, leia atentamente as informações a seguir antes de dar seu consentimento. Em caso de dúvida peça esclarecimento e só assine após ter certeza sobre todas as informações. Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: Análise Citogenética e Molecular (FISH) de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em terapia com Inibidores de Tirosinoquinase, no Estado da Bahia.

Pesquisador Responsável: Dra. Ivana Lúcia de Oliveira Nascimento

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (71) 92364424

Pesquisadores participantes: Dra. Maura Alice Santos Romeo; Mestranda Máilla Rebouças Viana.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo foi demonstrar a importância da utilização da técnica de citogenética molecular (FISH) aliada à citogenética clássica em pacientes com LMC em terapia com TKI.

O grupo de estudo será constituído por 20 pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica em terapia com TKI, acompanhados em um dos serviços de referência de hematologia do Estado da Bahia, o Hospital Universitário Edgar Santos. A coleta será realizada com o uso de protocolo já estabelecido e em pacientes que já são acompanhados e já realizariam o procedimento. Os critérios de inclusão são todos os pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica em terapia com TKI. Existe um risco em relação a coleta, porém já é um procedimento realizado para o acompanhamento da doença e nenhum desses será provocado apenas para a realização da pesquisa.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença clonal com origem na célula progenitora hematopoiética, caracterizada pela presença do cromossoma Filadélfia (Ph) que gera a proteína de fusão BCR-ABL com atividade enzimática tirosina quinase alterada.

Para estabelecer o diagnóstico da LMC deve ser realizada uma avaliação clínica e laboratorial para caracterizar as diferentes fases da doença, e são igualmente importantes na definição do grupo de risco a que pertence cada doente.

A monitorização da resposta à terapêutica é fundamental para os pacientes com LMC, uma vez que permite avaliar o tipo de resposta e detectar eventuais resistências ao tratamento. Essa monitorização deve ser efetuada em períodos de tempo pré-estabelecidos e englobar uma avaliação clínica e laboratorial, que inclui a citogenética e o estudo molecular.

Avaliar citogeneticamente esses pacientes pelo método clássico, faz parte dos protocolos determinados pela European LeukemiaNet. Técnicas moleculares podem ser usadas para detectar o rearranjo BCR/ABL, ao diagnóstico, e para as situações em que não se tem metáfases para análise ou onde o Ph está mascarado no cariótipo.

O presente estudo pretende demonstrar a importância da técnica citogenética molecular (FISH) aliada a citogenética clássica para pacientes com LMC em terapia com inibidores de tirosina quinase (TKI).

DE QUE FORMA POSSO AUXILIAR NESSE ESTUDO?

Você pode auxiliar nesse estudo autorizando a participação e publicação de dados da consulta, além de amostras da coleta da medula óssea que já serão realizadas para exames médicos de rotina.

QUAIS OS RISCOS QUE PODEM EXISTIR NOS EXAMES?

Para realizar o exame citogenético será necessário coleta da medula óssea, um procedimento trabalhoso, demorado e doloroso que proporciona incomodo ao paciente, porém sua importância vem da possibilidade de detecção precoce de recaídas, evoluções clonais e surgimento de clones anormais nas células Ph negativas. A coleta utilizada

para o estudo já seria realizada pela equipe médica com o objetivo de acompanhar a evolução do quadro e dessa forma, nenhuma coleta será realizada somente para o estudo. Não é necessário estar em jejum e nem tomar nenhum medicamento. Os resultados obtidos são absolutamente confidenciais, portanto serão comunicados somente à pessoa e ao profissional médico que a acompanha. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização do interessado.

COMO SERÁ FEITA A PESQUISA?

As amostras da medula óssea de pessoas que atendem aos objetivos da pesquisa serão encaminhadas ao laboratório para realização do estudo citogenético clássico e molecular.

O QUE SERÁ FEITO COM O MATERIAL E OS DADOS COLETADOS DE CADA PACIENTE?

A coleta será realizada uma única vez para o estudo, o material e a ficha-protocolo com o resultado serão armazenados no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos-Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras não serão oferecidas a outros centros ou laboratórios e a identificação do paciente será mantida em absoluto sigilo sobre responsabilidade dos pesquisadores responsáveis.

Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Local e data _____, _____/_____/_____.

De acordo,

Assinatura do sujeito ou responsável

ANEXO A- Formulário de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa –
CEP-HUPES

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-UFBA
- HUPES



PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise Citogenética e Molecular (FISH) de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em terapia com inibidores de tirosinoquinase, no Estado da Bahia.

Área Temática:

Área 1. Genética Humana.

Versão: 1

CAAE: 06160212.8.0000.0049

Pesquisador: IVANA LUCIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Instituição: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 104.769

Data da Relatoria: 20/09/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de corte transversal para avaliar até onde a citogenética molecular(FISH)melhora o diagnóstico realizado pela citogenética clássica de pacientes com leucemia mielóide crônica, tratados com inibidores de tirosinoquinase e atendidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Bahia.O presente estudo pretende demonstrar a importância da utilização da técnica de citogenética molecular (FISH) aliada a citogenética clássica para o diagnóstico de pacientes com leucemia mielóide crônica em terapia com inibidores de tirosinoquinase. Acreditamos que conhecendo o percentual de anormalidades observadas nestes pacientes através do FISH poderá ser realizada comparação com o resultado encontrado na citogenética clássica e dessa forma poderemos auxiliar a literatura na definição da importância da utilização das duas técnicas para um diagnóstico mais preciso.

O grupo de estudo será constituído por 20 pacientes de ambos os sexos e maior de 18 anos, com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) em terapia com inibidores de tirosinoquinase acompanhados em um dos serviços de referência de hematologia do Estado da Bahia, o Hospital Universitário Edgar Santos. As amostras de medula óssea serão encaminhadas ao Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), para realização do estudo citogenético, molecular e análise dos dados. A partir dos resultados obtidos na citogenética clássica e molecular será realizada a análise estatística com o auxílio do programa SPSS para análise dos resultados, onde iremos avaliar a distribuição da amostra através do teste kolmogorov-Smirnov para que então o teste estatístico mais adequado seja selecionado. Essas informações serão demonstradas através de gráficos e tabelas e irão comparar a eficiência do uso da técnica de FISH no aumento na sensibilidade no diagnóstico desses pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

O objetivo deste estudo é demonstrar a importância da utilização da técnica de citogenética molecular (FISH) aliada a citogenética clássica para o diagnóstico de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) em terapia com inibidores de tirosinoquinase (TKI).

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela **CEP:** 40.110-060
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-8141 **Fax:** (71)3283-8140 **E-mail:** cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-UFBA
- HUPES



Objetivos específicos

- ¿ Avaliar a sensibilidade da citogenética clássica na detecção de alterações cromossômicas em paciente com LMC em terapia com TKI.
- ¿ Avaliar a sensibilidade do FISH na detecção de alterações cromossômicas em paciente com LMC em terapia com TKI.
- ¿ Demonstrar a importância do uso da técnica de FISH em conjunto com a citogenética clássica no diagnóstico de pacientes com LMC em terapia com TKI.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos adicionais para as pessoas participantes do estudo, pois os participantes que irão ser recrutados já estão sendo acompanhados. A coleta de medula óssea é realizada periodicamente para o acompanhamento desse paciente.

Benefícios:

O benefício do estudo está relacionado a um diagnóstico mais sensível e específico para esses pacientes participantes, pois além da citogenética clássica será utilizada a molecular (FISH)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Satisfatórios.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela **CEP:** 40.110-060
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-8141 **Fax:** (71)3283-8140 **E-mail:** cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-UFBA
- HUPES



SALVADOR, 24 de Setembro de 2012

Assinado por
Roberto José da Silva Badaró

ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8141 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com