

MELISSA PEREIRA MACHADO

**MONITORAMENTO MOLECULAR DOS
TRANSCRITOS *BCR/ABL* DE PACIENTES
COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA
EM USO DE IMATINIBE ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVO EM
TEMPO REAL (*REAL-TIME*)**

CAMPINAS

2009

MELISSA PEREIRA MACHADO

**MONITORAMENTO MOLECULAR DOS
TRANSCRITOS *BCR/ABL* DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM USO DE
IMATINIBE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR
QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (*REAL-TIME*)**

*Dissertação apresentada à Comissão de Pós-
graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Clínica Médica –
área de concentração: Ciências Básicas*

Orientadora: Dra. Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Co-orientador: Dr. Afonso Celso Vigorito

CAMPINAS

UNICAMP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M18m Machado, Melissa Pereira
Monitoramento molecular dos transcritos BCR-ABL de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em uso de imatinibe através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (real time) / Melissa Pereira Machado. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Kátia Borgia Barbosa Pagnano, Afonso Celso Vigorito

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mielóide crônica. 2. Mesilatos. 3. Cromossomo de par 9. 5. Cromossomo de par 22. 6. Cromossomo Filadélfia. I. Pagnano, Kátia Borgia Barbosa. II. Vigorito, Afonso Celso. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. I.V Título.

Título em inglês : Molecular monitoring of BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib using real-time PCR

Keywords: • Chronic myeloid leukemia
• Mesylates
• Chromosome 9
• Chromosome 22
• Philadelphia chromosome

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Médicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Kátia Borgia Barbosa Pagnano
Profa. Dra. Paula de Oliveira Montandon Hokama
Prof. Dr. André Fattori

Data da defesa: 31-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Melissa Pereira Machado

Orientador: Prof^a. Dr^a. Katia Borgia Barbosa Pagnano

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Katia Borgia Barbosa Pagnano *Katia B. Barbosa Pagnano*
2. Prof^a. Dr^a. Paula de Oliveira Montandon Hokama *Paula de O. M. Hokama*
3. Prof. Dr. André Fattori *André Fattori*

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2009



Dedico

Aos meus *pais*: José Luis e Maria de Lourdes

Ao meu namorado: *Alan*

Às minhas queridas: *Milena e Beatriz*

À minha avó: *Clarice*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, sem a bênção Dele, a existência desse projeto não faria sentido e esse grande sonho jamais seria concretizado. E à Nossa Senhora Auxiliadora, minha adorável Mãe e Protetora.

À Dra. Kátia, ou simplesmente “Katinha”, por tudo que ela fez, por tudo que ela não fez, enfim, foram quase cinco anos de convivência de momentos bons e ruins.

Ao Dr. Afonso, pelo seu trabalho no Transplante de Medula Óssea.

Ao Dr. Aranha e Dra. Nicola pelas sugestões durante a qualificação para a defesa.

Aos membros da banca examinadora da defesa: Dra. Paula Hokama, da Unesp Botucatu que durante este trabalho me recebeu gentilmente em seu laboratório e contribuiu com sugestões importantes, e também pela disposição em participar da minha banca. E Dr. André Fattori, pelo seu trabalho maravilhoso no Hemocentro com os pacientes de leucemia, acompanhando-os com reconhecida dedicação. E também pela gentileza de dar seu parecer diante deste trabalho.

Aos nobres Profs. Drs. Cármino, Irene, Israel e Noemi, todos grandes nomes na Medicina brasileira e Hematologia que engrandeceram o artigo, fruto deste trabalho, com dicas, sugestões, correções e contribuições significativas para que este seja publicado e contribua para o cenário médico e científico.

À maravilhosa e gentil, Eliana Miranda da Comissão de Estatística do Hemocentro, pelo seu apoio importantíssimo para a conclusão da dissertação e pelo trabalho árduo na realização de todas as análises estatísticas.

Às funcionárias e amigas do Laboratório de Diagnóstico Molecular de Doenças Oncohematológicas do Hemocentro da Unicamp: Daiane e Mariana e à biomédica Janine, do Laboratório de Vírus do Hemocentro, minhas queridas “flores”, obrigada pelo companheirismo, amizades verdadeiras, pelo convívio e momentos maravilhosos eternizados pelo carinho.

Ao amigo, colega de trabalho e meu ”co-co-orientador”, Prof. Dr. Juarez Pires Tomaz, ou simplesmente “Ju”, um geneticista fantástico, um profissional exemplar e um grande amigo pessoal que certamente é um dos maiores responsáveis pela minha conquista deste título. Obrigada pela dedicação, pelos ensinamentos, por sempre acreditar em mim e me guiar para conquistar todas as etapas deste sonho sempre me apoiando e orientando. Ter você me acompanhando foi um grande presente.

Aos companheiros de Hemocentro que passaram por lá durante estes cinco anos de trabalho, em especial: Rosana, Si Sene, Lena, Anderson, Nicete, Fernanda, Sula e Isa.

À Cristiane e a Adriana, da Secretaria de Pós-graduação que foram pessoas muito pacientes e prestativas, que fizeram tudo o que foi possível para me orientar nos processos, e até ouvindo meus lamentos, frustrações e momentos de estresse. Desculpem por qualquer coisa.

Aos meus amigos que nunca se esquecem de mim: Ériquinha, Pôlinha, Patch, Gi, Rapha, Gê e Wal. Mesmo não convivendo dia-a-dia ao lado de vocês, todos participaram em vários momentos dessa conquista que alguma maneira e esse apoio me encorajou a seguir em frente, acreditar no meu sonho e chegar ao final.

Aos meus novos amigos e colegas de trabalho da Fuji: Marcello e Valmir pela compreensão, paciência e importantíssimo apoio nestes últimos meses críticos.

Às Irmãs Dominicanas do Pensionato São Domingos, especialmente: Ir. Inês (minha tia-avó), Ir. Cecília, Ir. Pureza e Ir. Augusta, por me darem um lar e me acolherem com carinho e orações.

À Capes pela bolsa de mestrado, e a Novartis pelo apoio financeiro ao Laboratório.

E agradeço por fim os maiores responsáveis pelo meu sucesso:

Ao “meu benzinho”, Alan, que entrou para minha vida durante esse mestrado. Sem ele ao meu lado, eu sei que não teria forças para superar tantas dificuldades e obstáculos. Obrigada por estar na minha vida, me trazer alegria e inspiração e, por me amar, me apoiar e me incentivar sempre em momentos bons e ruins. Eu o amo e admiro profundamente. Você é a música que dá o ritmo à minha vida!

Aos meus dois anjinhos e presentes de Deus: Beatriz, minha linda e amada sobrinha e Mateus, meu priminho e eterno bebê.

À minha avó Clarice, pelas demonstrações lindas de quanto me ama e mesmo com Alzheimer, nunca se esquece de mim. Tenho certeza que se não fosse esta doença esses cinco anos teriam sido mais fáceis, pois eu a teria todos os dias do meu lado.

Por fim, agradeço aos meus amados e admirados pais (Zé e Malu) e minha querida irmã Milena, que estiveram de longe e de perto, me amando e apoiando, incondicionalmente, com todo carinho e dedicação do mundo. Obrigada por tudo e perdão pelos problemas que causei e pelos sacrifícios que fizeram para que esse meu grande sonho ser concretizado. Vocês são a minha essência, meu porto-seguro e a razão do meu viver e o meu maior estímulo para não desistir de tudo sempre foi vocês. Os amo demais!!

Bom mesmo é ir à luta
com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence
a quem se atreve
e a vida é "muito"
para ser insignificante.

Charles Chaplin

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by the presence of Philadelphia chromosome (Ph), the result of *bcr* and *abl* gene fusion, which product is a protein with kinase activity, inhibited by imatinib.

Imatinib is currently the first-line treatment of CML and molecular monitoring of BCR-ABL transcripts is essential in monitoring of patients and for the early detection of loss of response to treatment.

The aim of this study was to standardize quantitative PCR (RQ-PCR) method for molecular monitoring of BCR-ABL transcripts in patients with CML treated with imatinib.

Peripheral blood samples from chronic phase patients were collected for RQ-PCR at diagnosis and every three months after treatment with imatinib. Taqman method was used for RQ-PCR. A standard curve with dilutions of 10^8 to 10^3 of a plasmid with the b3a2 and b2a2 transcripts and ABL gene, used as the control gene, was constructed. The runs were made in duplicates. The threshold used was 0.05 and the efficiency was determined as 99%. The results were reported as a BCR-ABL/ABL ratio (%). For the reference value of the baseline of the laboratory 30 samples from patients at diagnosis were quantified and the median value calculated was 83.66%. Major molecular response (MMR) was considered a three log reduction from the baseline value. MMR values were adjusted to international scale, using a conversion factor of 1.19.

After standardization, BCR-ABL levels of 60 CML patients in chronic phase treated with imatinib were measured at diagnosis and then every three months. Hematological, major cytogenetic and complete cytogenetic responses were achieved in 57 (95%), 45 (75%) and 38 (63%) patients, respectively. Twenty-four out of 60 patients achieved a MMR (40%), in a median time of 8.5 months. Overall survival was superior for patients with CCR (100%) *versus* patients with no CCR (77%) ($p= 0.01$) in 48 months. Patients with CCR and with MMR had a superior event free-survival (EFS) in comparison with patients with CCR and no MMR ($p= 0.007$). In conclusion, we could demonstrate the prognostic impact of achieving CCR and a major molecular response and also the importance of molecular monitoring in the follow-up of CML patients.

Key-words: CML, imatinib, real-time PCR.

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultado da fusão do gene *abl* e do gene *bcr* cujo produto é uma proteína de atividade de tirosina quinase, inibida pelo mesilato de imatinibe. O imatinibe é hoje o tratamento de primeira linha da LMC e o monitoramento molecular dos transcritos BCR-ABL é fundamental no acompanhamento dos pacientes e na detecção precoce da perda de resposta ao tratamento.

O objetivo deste trabalho foi realizar a padronização do método de PCR quantitativo (RQ-PCR) para o monitoramento molecular dos transcritos BCR-ABL de pacientes com LMC em tratamento com imatinibe. Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com LMC para RQ-PCR ao diagnóstico e a cada três meses após o tratamento com imatinibe. Foi utilizado o método Taqman. Como gene controle foi utilizado o ABL. Foi criada uma curva standard com diluições de 10^8 a 10^3 de um plasmídeo com os transcritos b3a2 e b2a2 e com ABL. As quantificações foram feitas em duplicatas, assim como a curva standard. O *threshold* utilizado foi de 0,05 e a eficiência foi determinada em 99%. Os resultados foram reportados como uma relação entre BCR-ABL/ABL. Para o valor de referência basal do laboratório foram analisadas 30 amostras de pacientes ao diagnóstico, e calculada a mediana, sendo esse valor 83,66%. Resposta molecular maior (RMM) foi definida como redução dos transcritos BCR-ABL em 3 *log* a partir do valor basal do laboratório. Os valores foram ajustados à escala internacional, usando-se um fator de conversão de 1.19.

Após a padronização do método, foram avaliados 60 pacientes com LMC, cujas amostras foram coletadas ao diagnóstico e a cada 3 meses. Respostas hematológica, citogenética maior e citogenética completa foram obtidas em 57 (95%), 45 (75%) e 38 (63%) dos pacientes, respectivamente. Vinte e quatro de 60 pacientes atingiram a RMM (40%), numa mediana de 8,5 meses. A sobrevida global foi superior nos pacientes com RCC (100%) vs pacientes sem RCC (77%) em 48 meses. Pacientes com RCC e com RMM tiveram uma sobrevida livre de eventos superior em relação aos pacientes que não atingiram os dois tipos de resposta (100% vs 60% respectivamente) ($p= 0.007$). Em resumo, neste estudo demonstramos o impacto prognóstico em atingir RCC e RMM e também a importância do acompanhamento molecular nos pacientes com LMC.

Palavras-chave: LMC, mesilato de imatinibe, PCR real-time.

LISTA DE ABREVIATURAS

CB	Crise blástica
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
NA	Não avaliável
Ph	Cromossomo Philadelphia
PDGRF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RQ-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RT-PCR	PCR qualitativo
RCC	Resposta citogenética completa
RCM	Resposta citogenética maior
RCP	Resposta citogenética parcial
RH	Resposta hematológica
RMM	Resposta molecular maior
RMC	Resposta molecular completa
SLE	Sobrevida livre de eventos
SG	Sobrevida global

SUMÁRIO

ABSTRACT	ix
RESUMO	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	14
<i>1.1. Leucemia mielóide crônica</i>	15
<i>1.2. LMC – tratamento e acompanhamento da resposta</i>	18
<i>1.3. PCR em tempo real (RQ-PCR): princípios da técnica</i>	23
2 OBJETIVOS	26
<i>2.1. Gerais</i>	27
<i>2.2. Específicos</i>	27
3 PACIENTES E MÉTODOS	28
<i>3.1. Pacientes</i>	29
<i>3.2. Amostras</i>	29
<i>3.3. Metodologia</i>	30
<i>3.3.1. Lise de hemácias</i>	30
<i>3.3.2. Extração de RNA</i>	31
<i>3.3.3. Quantificação de RNA</i>	32
<i>3.3.4. Síntese de cDNA</i>	32
<i>3.3.5. Plasmídeo PNC210G</i>	34
<i>3.3.6. PCR Quantitativo em tempo real (RQ-PCR)</i>	35
<i>3.3.7. Análise estatística</i>	39

4 RESULTADOS I	40
5 RESULTADOS II	45
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO 1 - (ARTIGO SUBMETIDO) BCR-ABL levels monitoring in CML patients in chronic phase treated with imatinib -importance of a major molecular response	63
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	81



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) foi a primeira neoplasia relacionada a uma anormalidade genética. É uma cromossomopatia autossômica não congênita e que se caracteriza pela elevação considerável de leucócitos do sangue e por acúmulo de todas as formas de granulócitos maduros e imaturos. Pode manifestar-se em qualquer idade, mas a idade média ao diagnóstico é de 53 anos. Metade dos pacientes são assintomáticos ao diagnóstico (1).

Em 1960, foi identificado um pequeno cromossomo do grupo G, o cromossomo *Philadelphia* ou Ph₁, nas células da medula óssea de pacientes com LMC. Este cromossomo é um aspecto quase que constante da doença, sendo encontrado em > 95% dos pacientes com LMC. Os pacientes podem ser Ph₁-positivos ou Ph₁-negativo, com base na presença ou ausência do cromossomo *Philadelphia*, respectivamente (2). O cromossomo Ph₁ é originado da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Essa translocação forma um gene quimérico, que consiste da fusão da extremidade 5' do gene *bcr* (éxon b2 ou b3) localizado no cromossomo 22 e com a extremidade 3' do éxon 2 do gene *abl*, localizado no cromossomo 9. Essa fusão resulta na expressão do RNAm quimérico *BCR/ABL* e da produção da proteína de fusão *BCR/ABL*, de atividade tirosina-quinase maior que a proteína p145 normal codificada por *c-abl*, e tem uma participação direta e crucial no

desenvolvimento da LMC (3), já que possui papel importante no estímulo à proliferação celular e inibição da apoptose (4).

Pode haver a formação de vários transcritos, dependendo do ponto de quebra. Três

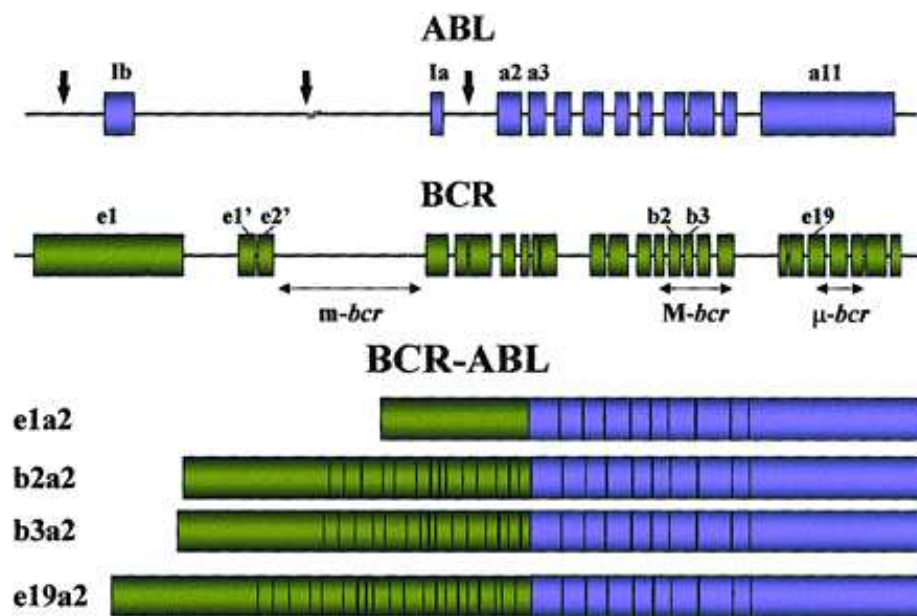


Figura 1.1 - Representação esquemática dos genes *ABL* e *BCR* na t(9;22)(q34;q11). Os éxons são representados como caixas coloridas e os íntrons através de linhas horizontais. As quebras no *ABL* (flechas verticais) ocorrem antes do éxon *Ib*, entre *Ib* e *Ia* ou entre *Ia* e *a2*. Os pontos de quebra do gene *BCR* geralmente ocorrem em uma das três regiões (*bcr*). A localização e a extensão são demonstradas pelas três flechas horizontais. Na parte inferior da figura mostra a estrutura dos vários transcritos de RNAm do *BCR/ABL* que são formados dependendo do ponto de quebra do *BCR*. Quebras na região *m-bcr* origina moléculas com a junção *e1a2*. Quebras na região *M-bcr* ocorrem entre os éxons *b2* (*e13*) e *b3* (*e14*) e *b4* (*e15*), gerando transcritos de fusão com a junção *b2a2* e *b3a2* respectivamente. Quebras na região μ -*bcr* resulta no transcrito *e19a2*. (5).

diferentes pontos de quebra são descritos no gene *BCR*: maior (*M-bcr*), menor (*m-bcr*) e μ -*bcr* (Figura 1.1). Uma nomenclatura foi desenvolvida para descrever esses diferentes pontos de quebra. O primeiro par alfanumérico refere-se ao éxon do gene *bcr* que se funde ao segundo éxon do *abl*. Os éxons da região *M-bcr* são chamados *b1* a *b5*; os éxons da *m-bcr* de *e1*, *e2*, *e1'* e *e2'*; os éxons do μ -*bcr* de *e19* e *e20*. Geralmente, na LMC, o híbrido *BCR/ABL* resulta de uma junção *b3a2* ou *b2a2*, que codificam uma proteína de fusão de

210kD (p210). Uma minoria dos pacientes contém os transcritos e1a2 (p190), frequentes em pacientes com Leucemia linfóide aguda (LLA) de criança (2/3 dos casos) e presente em 30% dos casos de LLA de adulto. Sua presença está relacionada com pior prognóstico nos pacientes com LLA e novas propostas terapêuticas têm sido sugeridas para esses casos. O transcrito p210 também pode ocorrer alguns casos de Leucemia mielóide aguda (LMA) Ph+. A junção e19 e e20 ocorre raramente na LMC e na leucemia neutrofílica crônica, originando a proteína p230 (6).

A LMC progride através de três fases distintas, caracterizadas por piora clínica e laboratorial. São elas: fase crônica, acelerada e blástica. O avanço da doença torna o tratamento mais difícil a cada fase. Em 85% dos pacientes o diagnóstico é realizado na fase crônica da doença (7).

- *Fase Crônica*

A fase crônica (FC) é definida por um aumento na contagem dos leucócitos $\mu 20 \times 10^3$ μL e menos de 10% de blastos em sangue periférico ou medula óssea. Os sinais e sintomas no início são leves tornando-se piores com a progressão da doença. Na evolução natural da doença, a fase crônica da LMC dura aproximadamente 5 a 6 anos.

- *Fase Acelerada*

A fase acelerada (FA) é definida pela presença de 10% a 19% de células blásticas no sangue periférico ou medula óssea, basofilia no sangue periférico $>20\%$, trombocitopenia ($<100 \times 10^9/\text{L}$) persistente ou trombocitose persistente ($>1000 \times 10^9$) não responsivas à terapia (8). Sintomas geralmente são de média intensidade e incluem febre de origem desconhecida, dor óssea, náuseas e dor abdominal devido a esplenomegalia e ou

hepatomegalia. A citogenética pode apresentar novas ou múltiplas anormalidades cromossômicas adicionais ao cromossomo Ph1 (evolução clonal). A fase acelerada, em evolução natural, da LMC dura aproximadamente de 6 a 9 meses.

- *Fase Blástica*

A fase blástica ou crise blástica (CB) é definida pela presença de mais de 20% de blastos no sangue periférico ou medula óssea, proliferação blástica extramedular ou grandes focos de blastos na biópsia de medula óssea. Sintomas incluem fadiga relacionada à anemia, sangramento, infecção, linfadenopatia e disfunção do sistema nervoso central. Pacientes em crise blástica têm péssimo prognóstico; esta fase é rapidamente fatal, com uma média de sobrevida de 3 a 6 meses.

Embora a maioria dos pacientes manifeste a doença na fase crônica e avance para a fase acelerada, aproximadamente 25% dos pacientes progridem diretamente da fase crônica para a fase blástica sem evidência de transição pela fase acelerada (3).

1.2. LMC - Tratamento e acompanhamento da resposta

O tratamento da LMC tem como objetivo inicial a estabilização da contagem das células sanguíneas (resposta hematológica), ou seja: normalização da contagem absoluta e distribuição no sangue periférico de leucócitos, erradicação de sinais e sintomas da doença e manutenção de resposta por mais de 4 semanas. Posteriormente, deve-se obter resposta citogenética e se possível molecular. Resposta citogenética pode ser definida pela

proporção de células Ph⁺ residuais, sendo completa ou RCC (0% de metáfases Ph⁺), parcial ou RCP (1-35% de metáfases Ph⁺), menor (36-65% de metáfases Ph⁺), mínima (66-95%) ou sem resposta (>95%). Consideramos resposta citogenética maior a soma da RCC+ RCP (até 35%). Resposta molecular é definida pela diminuição da proporção de transcritos de RNAm do *BCR/ABL* detectados por RQ-PCR. Também pode ser definida como resposta molecular maior (RMM), ou seja, uma redução de 3 log no número de transcritos detectados pelo RQ-PCR, em relação a uma referência de 100% de transcritos. Outro parâmetro é a resposta molecular completa (RMC), definida com quanto os transcritos atingem níveis indetectáveis pelo método do PCR quantitativo, e confirmada pela não detecção do transcrito *BCR/ABL*, pelo método de RT-PCR qualitativo. (9)

O desenvolvimento do mesilato de imatinibe (Glivec®), um inibidor da tirosina quinase que bloqueia a atividade quinase do *BCR/ABL* ampliou as opções de tratamento para pacientes com LMC e outros tipos de leucemias Ph⁺ (10) e atualmente é a droga de escolha no tratamento dessa doença. A resposta ao imatinibe pode ser expressa em três níveis de resposta: hematológica, citogenética e molecular. O mesilato de imatinibe quimicamente designado como 4-[(4-Metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]metassulfonato de benzamida, é um derivado de 2-fenilaminopirimidina. Sua fórmula molecular é C₂₉H₃₁N₇OCH₄SO₃ e a sua massa molecular relativa é 589,7. O mesilato de imatinibe é o primeiro fármaco disponível comercialmente capaz de inibir a enzima bcr/abl tirosino-quinase, a qual é crucial para o desenvolvimento da LMC. Sendo assim sua farmacodinâmica consiste no bloqueio seletivo da proliferação celular e indução de apoptose em linhagens celulares *BCR/ABL* positivas, bem como em células leucêmicas de pacientes com LMC e LLA Ph⁺. O imatinibe é um inibidor da transdução do sinal celular que inibe potentemente a tirosino-quinase *BCR/ABL*

em níveis celular, *in vitro*, celular e *in vivo*. Nos ensaios de transformação de colônias celulares usando amostras *ex vivo* de sangue periférico e medula óssea, o imatinibe induz à inibição seletiva de colônias *BCR/ABL* positivas de pacientes com LMC. *In vivo*, o composto mostra atividade anti-tumoral quando utilizado como um agente único em modelos animais usando células tumorais *BCR/ABL* positivas (11).

Adicionalmente, o imatinibe é um inibidor potente dos receptores da tirosino-quinase para o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGRF) e o c-Kit, inibindo os eventos celulares mediados pelos PDGRF (11). Antes do surgimento do Glivec®, as opções terapêuticas para LMC incluíam: quimioterapia com Bussulfan, Hidroxiurea ou Interferon- α (7).

Foram conduzidos três grandes estudos internacionais, abertos, não randomizados, de fase II, em pacientes com LMC Ph+ em fase blástica ou acelerada, outras leucemias Ph+ ou em LMC em fase crônica com insucesso na terapêutica anterior com Interferon+ARA-C. Resposta citogenética maior ocorreu em 64% (completa em 49%) dos pacientes em fase crônica tardia tratados com imatinibe após terapia com IFN (12). Por fim, 26% dos pacientes em crise blástica apresentaram resposta hematológica e um aumento na sobrevida (11, 13).

O imatinibe foi estabelecido como terapia de primeira linha após os resultados do estudo IRIS, um estudo prospectivo, de fase III, randomizado, que comparou o tratamento em primeira linha de pacientes com LMC em FC recém diagnosticados com imatinibe 400mg/dia vs. Interferon+ARA-C, até então o tratamento padrão para LMC. Os resultados demonstraram que o imatinibe foi superior ao INF+AraC, com maior taxa de resposta citogenética, molecular e sobrevida livre de progressão da doença. A taxa de resposta citogenética completa (RCC) após 18 meses foi 76% para pacientes randomizados para

imatinibe e 14,5% para pacientes do braço do INF+AraC. Além disso, após 18 meses, a sobrevida livre progressão para a fase acelerada ou crise blástica da LMC foi 96,7% para o grupo do imatinibe enquanto no grupo do IFN+ARA-C foi 91,5%. O imatinibe foi melhor tolerado que a terapia combinada com AraC e INF (14).

Uma preocupação na terapia com imatinibe é a ocorrência de resistência ao tratamento, na maioria das vezes devido ao surgimento de mutações no *BCR/ABL* que alteram o sítio de ligação da droga (15) ou a conformação da proteína, impossibilitando a ação adequada da droga. A detecção dessas mutações pode auxiliar em decisões terapêuticas. Alguns grupos observaram que o aumento dos níveis de transcritos do *BCR/ABL* correlacionou-se com a presença de mutações (16). Brandford et al (17), observou que de 56 pacientes que tinham um aumento de transcritos > 2 vezes, 34 (61%) apresentavam mutações e 91% destes adquiriram resistência ao imatinibe.

O transplante de medula ainda permanece como único tratamento curativo para a LMC, mas não tem sido indicado como primeira linha de tratamento em vista dos excelentes resultados com imatinibe e da mortalidade do transplante no primeiro ano. Têm sido indicado atualmente na falha terapêutica aos inibidores de tirosina quinase de segunda geração, nos casos com a mutação T315I, que é resistente a todos os inibidores e nos casos de doença avançada, onde pode ser utilizado um inibidor de tirosina quinase para se obter um retorno a FC antes de se realizar o transplante (18). Nas recaídas pós-transplante pode-se utilizar a reinfusão de linfócitos do doador, tratamento com Interferon- α ou imatinibe, ou ainda um segundo transplante (19, 11).

Portanto, em todas as etapas do tratamento da LMC torna-se cada vez mais importante monitorar adequadamente a resposta do paciente, para que intervenções terapêuticas possam ser feitas no intuito de se evitar a progressão da doença.

A metodologia para identificação dos transcritos *BCR/ABL* evoluiu ao longo dos anos. Durante muitos anos utilizou-se o PCR qualitativo de uma ou duas etapas (*nested*), possibilitando a identificação ou não dos transcritos (20). O RT-PCR qualitativo permite a detecção de células leucêmicas residuais em um nível de uma célula em meio a 10^5 - 10^6 células normais.

Cross et al (21) desenvolveram a técnica de RQ-PCR competitivo, que posteriormente foi adaptada para o RQ-PCR por Hughes et al (22). Durante o estudo IRIS a técnica de PCR quantitativo foi realizada em 3 diferentes laboratórios. Para que os resultados pudessem ser expressos de modo semelhante, foi necessário padronização da técnica e da maneira de reportar o resultados, sendo criado o conceito de redução de *logs* a partir de um valor basal de pacientes não tratados.

A análise quantitativa oferece informações mais precisas dos níveis de transcritos *BCR/ABL*, podendo detectar sujeitos em recaída precoce (2). Um aumento nos níveis de transcritos precede a detecção do cromossomo Ph^+ em metáfases de medula óssea. Outra vantagem do método é sua sensibilidade e a correlação entre o número de transcritos *BCR/ABL* e a porcentagem de metáfases Ph^+ na medula óssea, o que possibilita um monitoramento freqüente, de alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão, sem que o paciente se sujeite ao procedimento doloroso e invasivo de coleta de medula (19).

A partir do seu desenvolvimento, avaliação da resposta molecular pelo método de PCR em tempo real tornou-se o método de escolha para monitoração molecular dos

pacientes com LMC em uso de imatinibe e do enxerto nos pacientes submetidos a transplante alogênico (23, 13).

A padronização da técnica de PCR quantitativo tem sido amplamente discutida, e as publicações sobre o assunto têm tentado estabelecer recomendações na escolha do gene controle, metodologia, controles, sensibilidade e expressão dos resultados numa escala internacional (24, 25). As recomendações de monitoramento foram descritas por um grupo de especialistas do grupo da *Leukemia Net*, em 2006 (9). A falha em se atingir uma resposta molecular maior (RMM) aos 18 meses de tratamento foi considerada como resposta sub-ótima.

Nos pacientes em tratamento com imatinibe, a resposta molecular precoce é preditiva de resposta citogenética (26). A redução dos níveis de transcritos *BCR/ABL* de pelo menos 3log em pacientes com RCC após 12 meses de terapia com imatinibe correlacionou-se com uma maior taxa de sobrevida livre de progressão (SLP) (27). (19).

1.3. PCR em tempo real (RQ-PCR): princípios da técnica

A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa e em tempo real (RQ-PCR ou *real-time* PCR) permite uma quantificação apurada dos produtos do PCR durante a fase exponencial do processo de amplificação deste. Por causa da detecção, do RQ-PCR, de sinais fluorescentes durante e/ou após cada subsequente ciclo do PCR, os dados quantitativos do PCR podem ser obtidos em um período curto de tempo e não após o

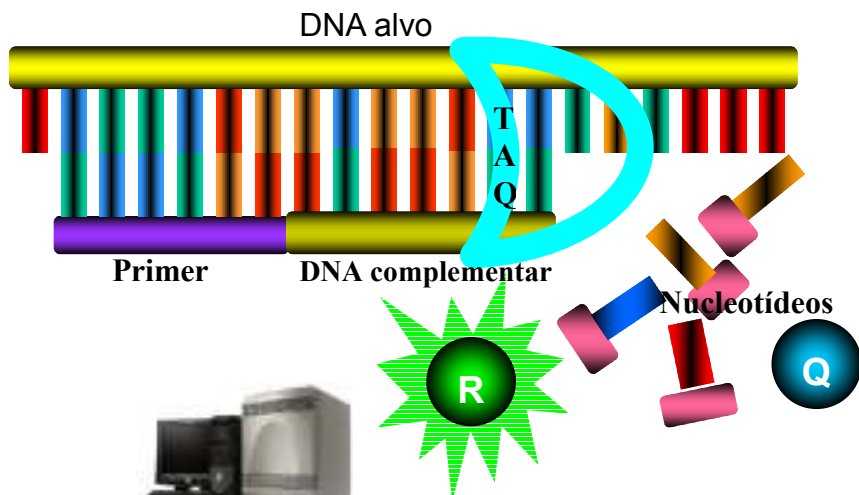
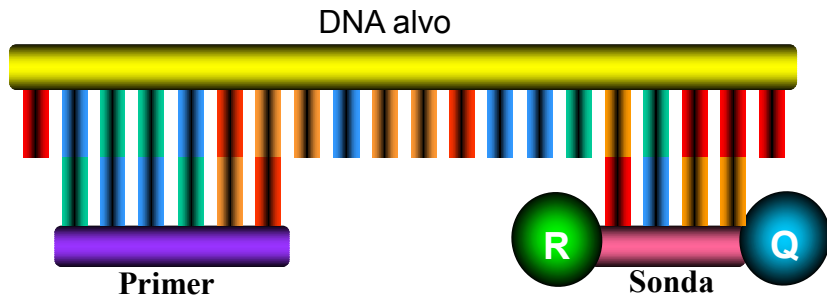
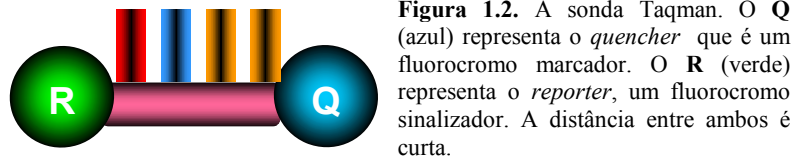
processo do PCR necessariamente, o que reduz o risco de contaminação do produto do PCR (24, 28, 25).

Até o momento, três métodos de RQ-PCR foram descritos: (a) análise usando marcador SYBRGreen I; (b) análise usando sondas de hidrólise e; (c) análise usando sondas de hibridização (29).

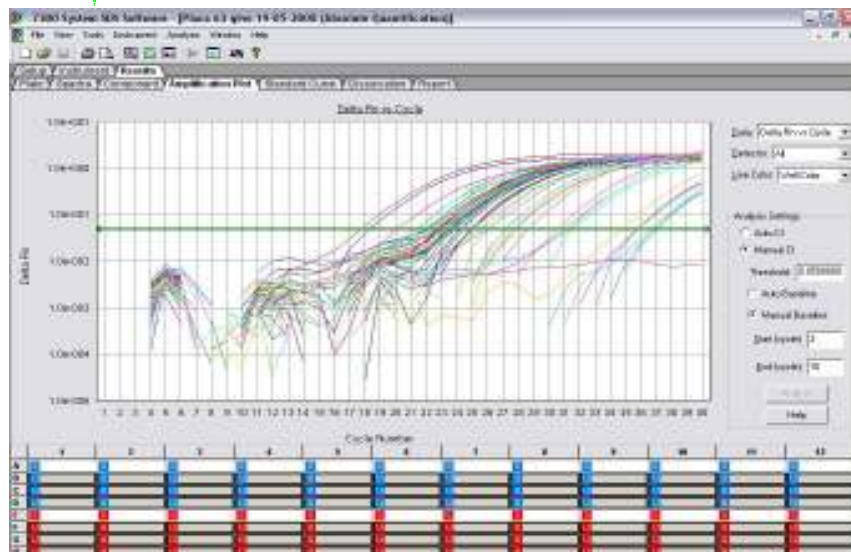
A quantificação de alvos de doença residual mínima por PCR pode ser feita por comparação do sinal da PCR (logo após a marcação ou hibridização) com uma série de diluições de um padrão, o qual sabe-se a quantidade de DNA ou RNA alvo (29, 30).

Baseando-nos objetivos, descritos adiante, nos concentraremos na análise de doença residual mínima por PCR em tempo real através da utilização de sondas de hidrólise. Análises com este tipo de sonda explora, a atividade exonuclease 5'→3' da *Thermus aquaticus* (TAQ) polimerase para detectar e quantificar produtos específicos do PCR (31). A sonda de hidrólise denominada sonda Taqman (**Figura 1.2**) ou sonda de oligonucleotídeo de dupla coloração, é conjugada com fluorocromo sinalizador - *reporter* - (ex: FAM, VIC ou JOE) e com um marcador fluorocrômico - *quencher* - (ex: TAMRA) que deve estar posicionado junto a sequência alvo. Contanto que os dois fluorocromos estejam bem próximos, isto é, contanto que a sonda esteja intacta, a emissão fluorescente pelo *quencher* será absorvida pelo *reporter*. Contudo, antes da amplificação da sequência alvo, a sonda é inicialmente deslocada pelo DNA alvo pela TAQ polimerase e subsequentemente hidrolisada pela atividade exonuclease 5'→3' do *reporter*, conseqüentemente, a fluorescência *reporter* torna-se detectável. Durante cada ciclo consecutivo do PCR, esta fluorescência torna-se mais detectável, por causa do acúmulo progressivo e exponencial de *reporters* livres (32).

Atualmente, o RQ-PCR tem sido amplamente utilizado no acompanhamento de pacientes com LMC (33, 29, 2, 34, 26, 23, 35, 36, 37, 25).



ABI 7300
Applied Biosystems®





Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo principal deste trabalho foi padronizar a técnica de PCR quantitativo para quantificação dos transcritos *BCR/ABL* de pacientes com LMC acompanhados no Hemocentro-Unicamp, tratados com imatinibe, para monitoramento de doença residual mínima (DRM).

2.2. Específicos

1. Estabelecer um valor basal para o laboratório, a partir do qual será considerada a resposta molecular maior (diminuição de 3 logs).
2. Padronizar a técnica de RQ-PCR para detecção dos transcritos *BCR/ABL*, desde a coleta das amostras, extração de RNA, estabelecimento do gene controle, curva padrão e parâmetros de análise.
3. Realizar a quantificação dos transcritos *BCR/ABL* de pacientes com LMC durante o tratamento com mesilato de imatinibe, através da técnica do RQ-PCR.
4. Correlacionar a diminuição no número de transcritos com resposta citogenética.
5. Correlacionar a resposta molecular com sobrevida global e livre de eventos.

Pacientes e Métodos



3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram incluídos, de modo prospectivo, pacientes com diagnóstico de LMC, independente de faixa etária, sexo e fase da doença, acompanhados no Hemocentro da Unicamp, de 14/2/06 a 23/4/08.

Os critérios utilizados para a inclusão dos pacientes foram:

- casos novos de LMC, não tratados previamente, que usariam o imatinibe como primeira linha de tratamento.
- pacientes já em uso de imatinibe e com resposta citogenética completa ao tratamento

3.2. Amostras

Foram coletados 20 mL de sangue periférico em 4 tubos com EDTA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até serem processadas em no máximo 24 horas. As

amostras foram coletadas seguindo o fluxograma atual de tratamento da LMC do Hemocentro da Unicamp: ao diagnóstico (pré-tratamento), e a cada três meses.

3.3. Metodologia

3.3.1. Lise de hemácias

As amostras coletadas foram processadas em até 24 horas. Foi utilizada solução de lise para a hemólise das hemácias com Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) (Sigma®) 0,01M e Cloreto de amônio (NH_4Cl) (Fluka®) 0,144M, na proporção de 1: 8. As amostras foram processadas em centrífuga refrigerada a 4°C e 3500 rpm. O *pellet* de leucócitos foi ressuspendido em solução de isolamento de RNA (Trizol – Invitrogen®). Em seguida, as

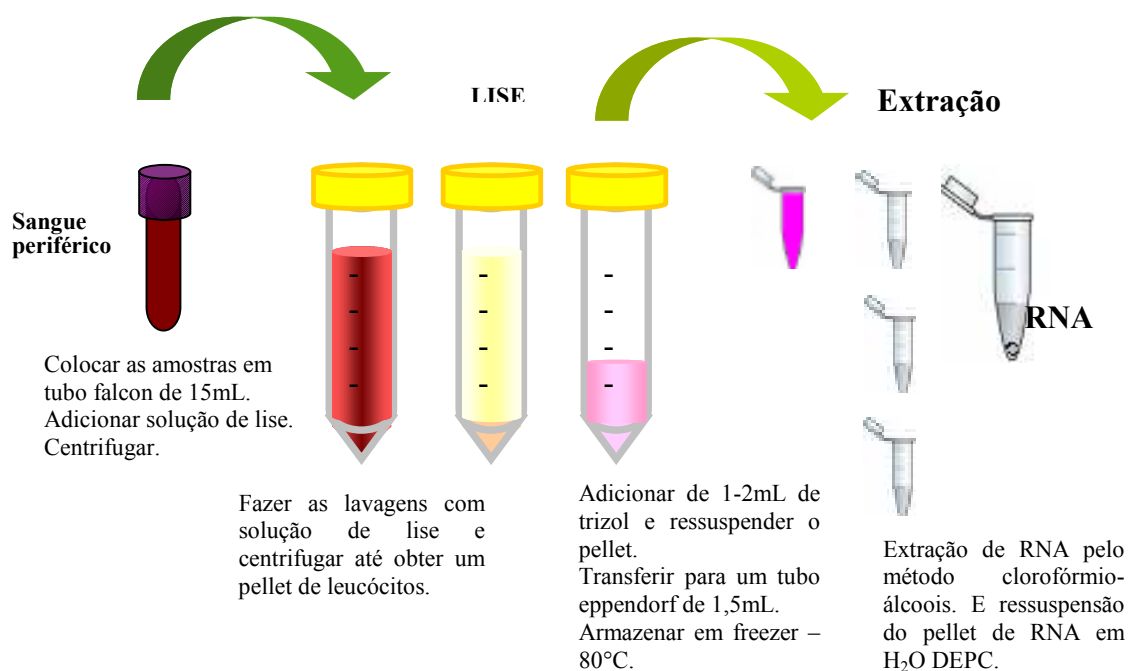


Figura 3.1. Lise de hemácias e Extração de RNA.

amostras foram armazenadas à -80°C até ser feita extração de RNA.

3.3.2. *Extração de RNA*

A metodologia foi adaptada da indicada pelo fabricante do *Trizol* (Invitrogen®). As amostras foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo. Em cada uma delas foram adicionados 200uL de clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente. A seguir foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C . Aproximadamente 600uL do sobrenadante foram retirados cuidadosamente e transferidos para um novo tubo plástico cônico (Eppendorf®). Foram adicionados 600uL de isopropanol e os tubos foram agitados por inversão e em seguida centrifugadas por 10 minutos a 12000g a 4°C . Retirou-se o sobrenadante e sobre o precipitado foi adicionado 1mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas por 7500g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Novamente, retirou-se o sobrenadante e sobre o precipitado foi adicionado 250uL de etanol 100%. As amostras foram centrifugadas por 7500g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. Os tubos foram abertos, invertidos e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos para a secagem do RNA. A seguir foram adicionados de 25 a 50uL de água com DEPC, dependendo do tamanho do botão de RNA obtido. As amostras foram mantidas a 55°C por 10 minutos e a seguir colocadas em freezer -80°C .

3.3.3. Quantificação de RNA

Após a extração, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop® 3.2.1) e foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do material.

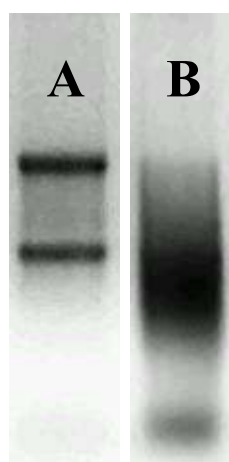


Figura 3.2. Gel de eletroforese. Amostras de RNA em A amostra íntegra e em B amostra degradada.

3.3.4. Síntese de cDNA

Depois de verificada a integridade do RNA, o cDNA foi sintetizado a partir de 1µg do RNA total utilizando uma concentração de 100µM de Random primers (RP) hexâmeros (Invitrogen®) e 200U de SuperScript II Rna H⁻ Reverse transcriptase (Invitrogen®). Foi utilizado DNTP (10nM) (Invitrogen®), DTT 0,1M (Invitrogen®) e First Strand Buffer 5x (Invitrogen®) na síntese de cDNA de acordo com o protocolo do fabricante da SuperScript II Rna H⁻ Reverse transcriptase (Invitrogen®). Foram adicionados em um tubo plástico

cônico (Eppendorf®) 1μg de RNA, 1μL de RP e água DEPC, após spin de 12000g as amostras foram levadas ao termociclador por 10 minutos à 70°C. Em seguida, as amostras foram retiradas do termociclador e colocadas em gelo. Foram adicionados a cada uma das amostras o *mix* de síntese de cDNA contendo: 1μL de DNTP, 2μL de DTT e 4μL de First Strand Buffer 5x. Em seguida as amostras foram agitadas, centrifugadas por 30 segundos a 12000g e levadas ao termociclador por mais 2 minutos a 42°C. Novamente foram retiradas e colocadas em gelo, e em seguida foi adicionado 1μL de SuperScript II. Por fim, as amostras foram homogeneizadas com a pipeta e foi feito mais um *spin* a 12000g por 30 segundos. A seguir, as amostras voltaram para o termociclador seguindo o programa:

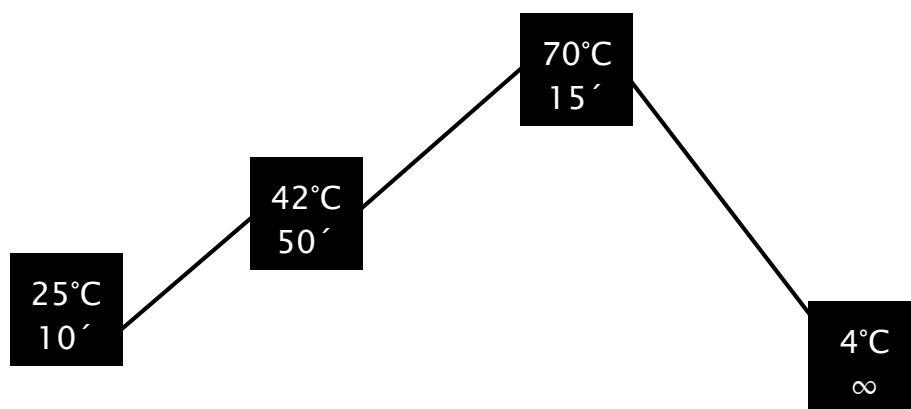


Figura 3.3. Programa de transcrição de cDNA utilizando SS II

3.3.5. Plasmídeo PNC210G

Para a curva padrão foi utilizada uma diluição seriada do plasmídeo pNC210/G. Não há descrição da construção deste plasmídeo em literatura até o momento. E não foi realizada a sua construção para este trabalho. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Federal do Paraná. O preparo da solução estoque do plasmídeo foi feito em fluxo laminar. Foi inoculado 100µL do plasmídeo pNC210/G em 5mL de meio de cultura LB (com 5µL de ampicilina). A cultura cresceu *overnight*, a 37°C e 3500rpm. Depois foi realizada uma miniprep com kit (Promega®), seguida por uma digestão completa com Bam HI (Invitrogen®). Para os cálculos de diluição foi calculado o valor da concentração do plasmídeo (6,26kb e 1µg corresponde a $3,04 \times 10^{11}$ moléculas de fita única). Feito os cálculos, foram realizadas as diluições seriadas em uma solução diluente contendo: Tris 1nM pH7,5 com 0,5M EDTA contendo 50µg/mL de RNAt de *E. coli* (Sigma®).

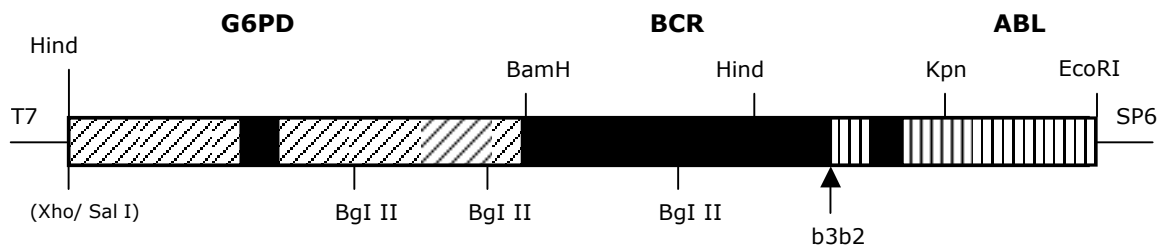


Figura 3.4. Plasmídeo pNC210/G

3.3.6. PCR Quantitativo em tempo real (RQ-PCR)

Os genes quantificados no RQ-PCR foram *ABL* (gene controle) e o *BCR/ABL*. O RQ-PCR foi realizado no equipamento ABI 7300 da Applied Biosystems. Foram utilizados: kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems® (cat. N°4304437) contendo: AmpliTaq Gold DNA polimerase, AmpErase UNG com dUTP, referência passiva (ROX) e componentes do tampão. Fornecido 2X concentrado), os primers: gene *ABL* 80,000 pmol (Applied Biosystems®) (Forward 5' GAT ACG AAG GGA GGG TGT ACC A 3'e Reverse 5'CTC GGC CAG GGT GTT GAA 3'), gene *BCR/ABL*80,000 pmol (Applied Biosystems®) b3a2 (Forward 5' TCC GCT GAC CAT CAA TAA GGA 3'e Reverse 5' CAC TCA GAC CCT GAG GCT CAA 3'); as sondas: *ABL* 6,000 pmol (Applied Biosystems®) (6^{FAM}TSC TTC TGA TGG CAA GCT CTA CGT CTC CTT^{TAMRA}), *BCR/ABL*6,000 pmol (Applied Biosystems®) (6^{FAM}CCC TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG A^{TAMRA}, todos com concentração de uso de 5µM e de acordo com Brandford et al (19). Placas ópticas (Applied Biosystems®) para RQ-PCR foram utilizadas para o preparo das reações de PCR que tiveram um volume final de 15µL. Foi utilizado 3µL de cDNA para cada uma das amostras quantificadas. A curva de diluição foi realizada em triplicata, assim como as amostras do pacientes e dos controles positivo (linhagem K562) e negativo (linhagem HL60), ambas linhagens controle obtidas gentilmente pela equipe de cultura de células do Hemocentro da Unicamp e o branco (NTC), além desses controles, após a padronização entre as amostras do pacientes eram colocados um paciente com baixo nível de transcritos e outro com alto nível de transcritos,

como controle de qualidade. Na Figura 3.6. é possível ver como ficaram dispostas as amostras nas placas, após a padronização, onde as reações passaram a ser feitas em duplicata.

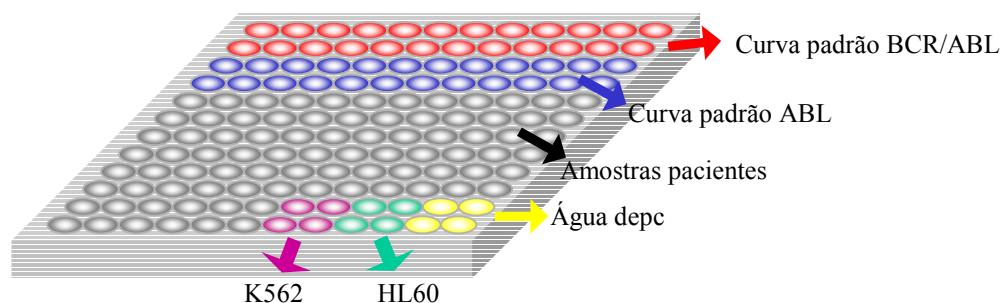


Figura 3.6. Placa de RQ-PCR, disposição das amostras

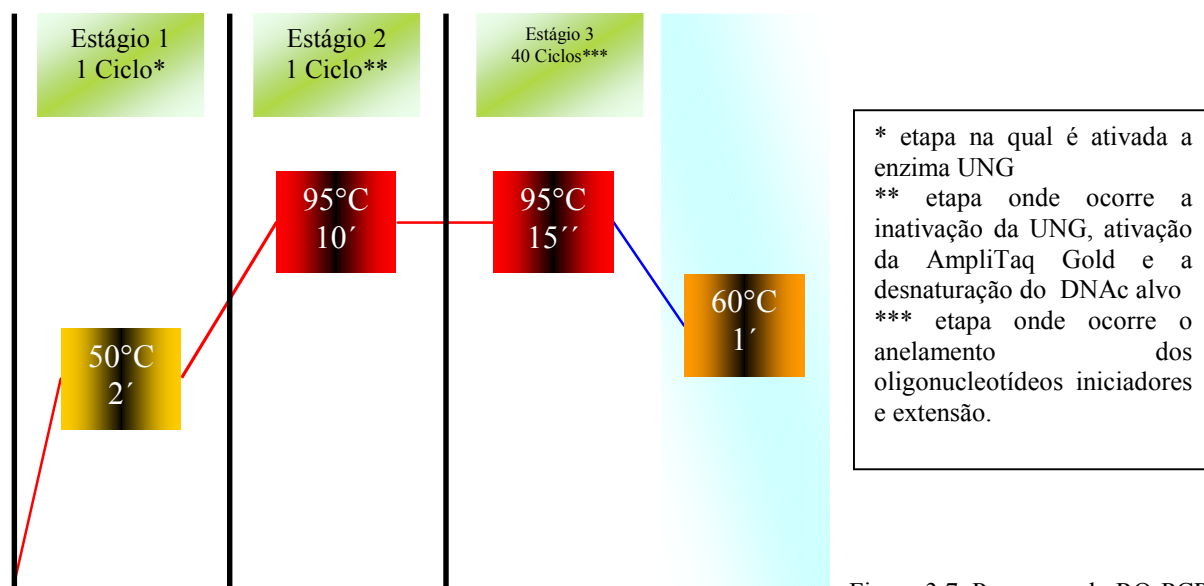


Figura 3.7. Programa do RQ-PCR

Após a corrida, foram aplicados o *threshold* 0,05 de acordo com (41) e o *baseline* de corrida (Ct de início da corrida $-4C_t$ s, exemplo: $C_{t_{inicial}} = 21 - 4 = 17$). Após a análise automática do programa de corrida foram verificados os seguintes parâmetros na análise: a eficiência da reação (R^2), que devia ser igual ou acima de 0.99 (99%) e o slope (inclinação da curva) que deveria estar entre $-3,3$ e $-3,6$. Na Figura 3.8, observamos um gráfico de

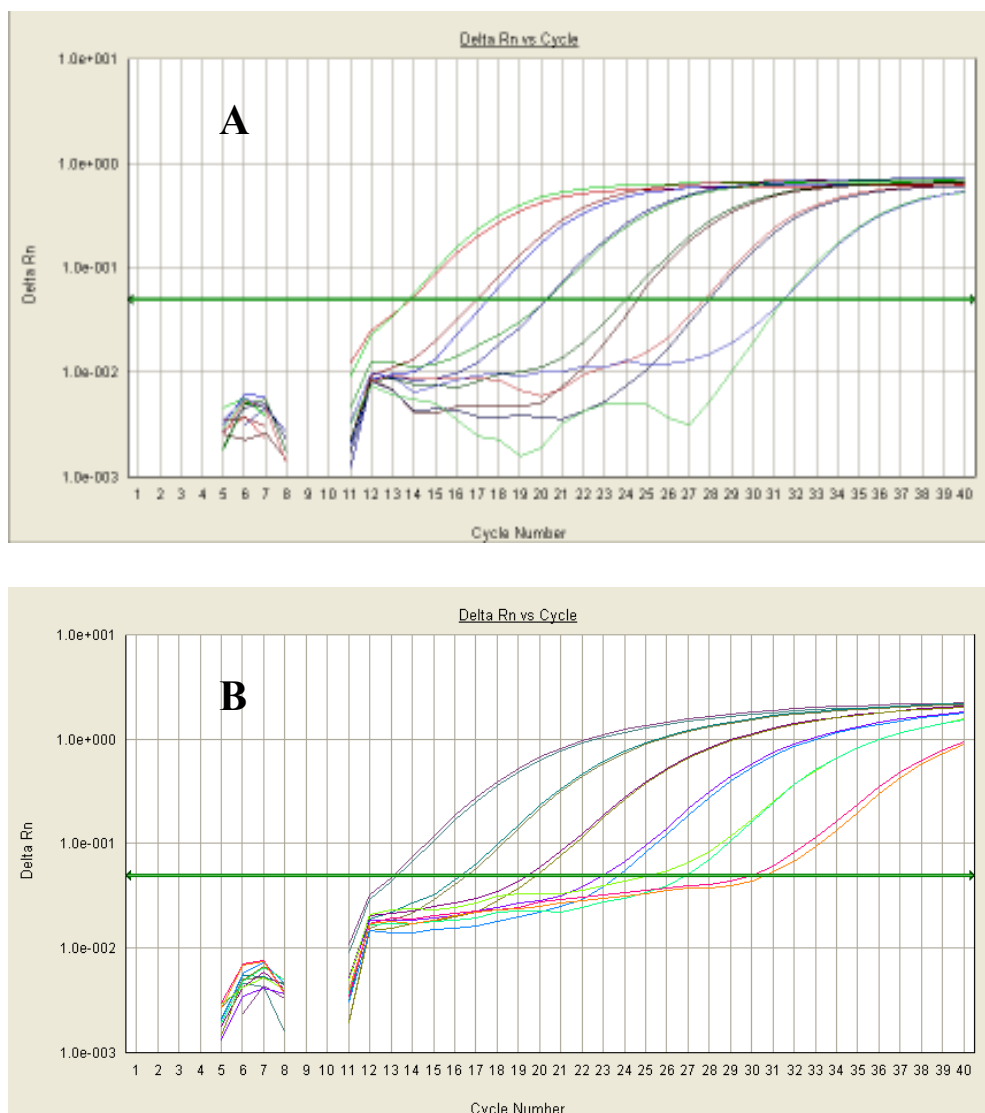


Figura 3.8. Quantificação da curva de diluição do plasmídeo PNC210G, em A para o gene *ABL* e em B para o gene *BCR/ABL*.

quantificação e na Figura 3.9, observamos as curvas padrão dos genes *ABL* e *BCR/ABL*.

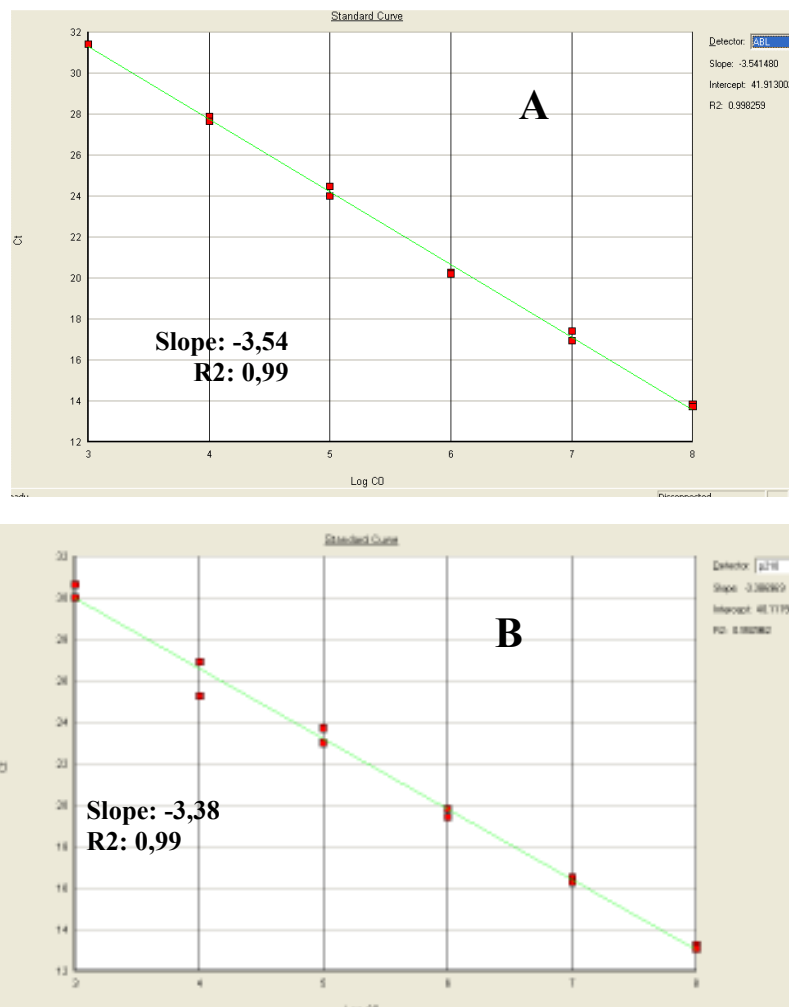


Figura 3.9. Em A, curva padrão do gene *ABL* e em B, curva padrão do gene *BCR/ABL*.

Além disso, os Ct entre as réplicas da amostra não deveriam exceder mais de 1 Ct e os valores de Ct referentes ao NTC deviam ser indeterminados, sendo aceitável que uma das repetições apresentasse valores de Ct (40).

Os dados foram exportados para o Windows Excel (Microsoft®) onde todos os cálculos foram feitos. Primeiramente foi feita a média dos Ct de cada amostra para cada um dos genes. Em seguida, foi calculada a relação entre as quantidades de transcritos encontradas do gene *ABL* e do gene *BCR/ABL*:

$$\frac{\text{BCR/ABL}}{\text{ABL}} \times 100 = \%$$

Os valores finais foram reportados em porcentagem.. Os resultados das quantificações tiveram como valor de referência o *baseline* de pacientes pré-tratamento. Esse valor foi determinado através do cálculo da mediana dos valores das quantificações dos transcritos de 30 pacientes com LMC ao diagnóstico.

3.3.7. *Análise estatística*

A data de corte para a análise foi abril de 2009. Foi feita análise da sobrevida global (SG), sobrevida livre de progressão (PFS) usando o método de Kaplan-Meier. A sobrevida global (SG) foi calculada a partir do início do imatinibe até data de morte ou último follow-up. A sobrevida livre de eventos (SLE) foi calculada a partir do início do imatinibe até qualquer evento (morte, progressão para FA ou CB, perda da resposta hematológica, perda da resposta citogenética). O score prognóstico foi calculado utilizando-se o método de Sokal (42). Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS, versão 14.0.



Resultados

4 RESULTADOS I

O *baseline* do laboratório foi determinado através da mediana da quantificação dos transcritos *BCR/ABL* de 30 amostras de pacientes ao diagnóstico, conforme descrito nos métodos. Esse valor basal foi 83,63%. Resposta molecular maior foi considerada redução de 3 *logs*, ou seja, valores $\leq 0.083\%$. Os valores de RMM foram ajustados de acordo com a escala internacional, usando um fator de conversão de 1,19.

O Quadro 4.1 é uma adaptação feita do quadro de Hughes et al (25) onde demonstramos como foi feito o cálculo do fator de correção (FC).

Quadro 4.1 – Cálculo do FC para obtenção dos níveis de transcritos em escala internacional (ESC. INT) e EQ = Equivalente.

Quadro 4.1: Cálculo do FC.

Laboratório	RMM _{EQ}	RMM _{ESC. INT}	FC=RMM _{EQ} / RMM _{ESC. INT}	BCR/ABL _{ESC.INT}
Adelaide	0,080	0,10	1,25	BCR/ABLx1,25
Hemocentro	0,083	0,10	1,19	BCR/ABLx1,19
Londres	0,045	0,10	2,22	BCR/ABLx2,22

Foram inicialmente avaliados 62 pacientes com LMC cujas amostras foram coletadas para análise de PCR quantitativo. Foram analisadas 274 amostras de sangue periférico. Na tabela 4. 1. seguem as características dos pacientes analisados.

Tabela 4.1. Características dos pacientes da padronização.

Características	N= 62	
Idade ao diagnóstico (mediana)	44.4	19,7-79,4
Idade no início do imatinibe (mediana)	44.8	20-79
Sexo (m;f)	36/26	58.1/41.9%
Fase da doença		
Crônica	52	84%
Acelerada	10	16%
Sokal score		
Baixo	15	30.0 %
Intermediário	17	33.5 %
Alto	19	37.5 %
Última avaliação		
RMM+RCC	26	42%
RCM, sem RMM	21	34%
Somente RHC	14	22.5%
Ausência de RHC, retorno a FC	01	1.5%
Status atual (morto/vivo)	4/58	6.5/93.5%

O tratamento com imatinibe foi iniciado em até seis meses após o diagnóstico em 79% dos pacientes, ou seja, em 49 pacientes, sendo uma mediana de 3 meses para o início.

Em 39 pacientes (63%) o imatinibe foi utilizado como primeira linha de tratamento, com exceção de hidroxiuréia. Vinte e três pacientes usaram previamente Interfero- α . Os pacientes em FC foram tratados com imatinibe 400 mg ao dia e os pacientes em fase acelerada com 600 mg ao dia. A avaliação clínica e hematológica foi mensal nos primeiros 6 meses e posteriormente a cada 2-3 meses. Coleta de mielograma e cariótipo foram feitos com 6, 12 e 18 meses para acompanhamento da resposta. Após confirmação da RCC o

cariótipo passou a ser repetido anualmente. Os pacientes foram tratados com imatinibe de 2 a 90 meses (mediana de 28 meses).

Cinqüenta e nove pacientes foram avaliáveis. As respostas obtidas por estes pacientes ao longo de 24 meses de tratamento estão representadas no gráfico abaixo:

A maior parte dos pacientes analisados atingiu resposta citogenética maior, conforme pode ser observado na Tabela 4.2:

Tabela 4.2.Respostas citogenéticas dos pacientes tratados com imatinibe.

	Frequência	%
Completa	41	66,1
Parcial	9	14,5
Ausente	7	11,3
Menor	2	3,2
NA	2	3,2
desconhecida	1	1,6
Total	62	100

Na figura 4.2, abaixo podemos observar o aumento progressivo ao longo de 24 meses de tratamento na porcentagem de pacientes com RMM.

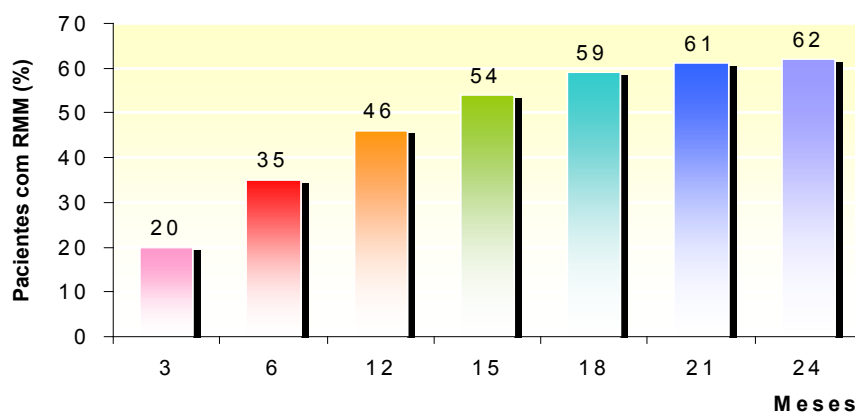


Figura 4.2 – RMM ao longo de 24 meses.

Na Figura 4.3, podemos acompanhar ao longo do tratamento como se comportaram dois pacientes do estudo. Um paciente responsivo que atingiu a RCC com 3 meses de tratamento com mesilato de imatinibe e atingiu a RMM aos 9 meses de tratamento e manteve seu PCR indetectável ao longo dos 24 meses que foi monitorado. E um paciente resistente, que obteve uma resposta molecular 2% de transcritos e uma RCP de 5% de metáfases Ph+ na sua citogenética. Após um ano de tratamento, os níveis de transcritos aumentaram progressivamente, correspondendo ao aumento na porcentagem de metáfases Ph+ na citogenética. Devido à perda da resposta citogenética, o imatinibe foi suspenso e o paciente foi tratado com um inibidor de tirosina quinase de segunda geração e uma amostra foi encaminhada para o estudo de uma possível mutação.

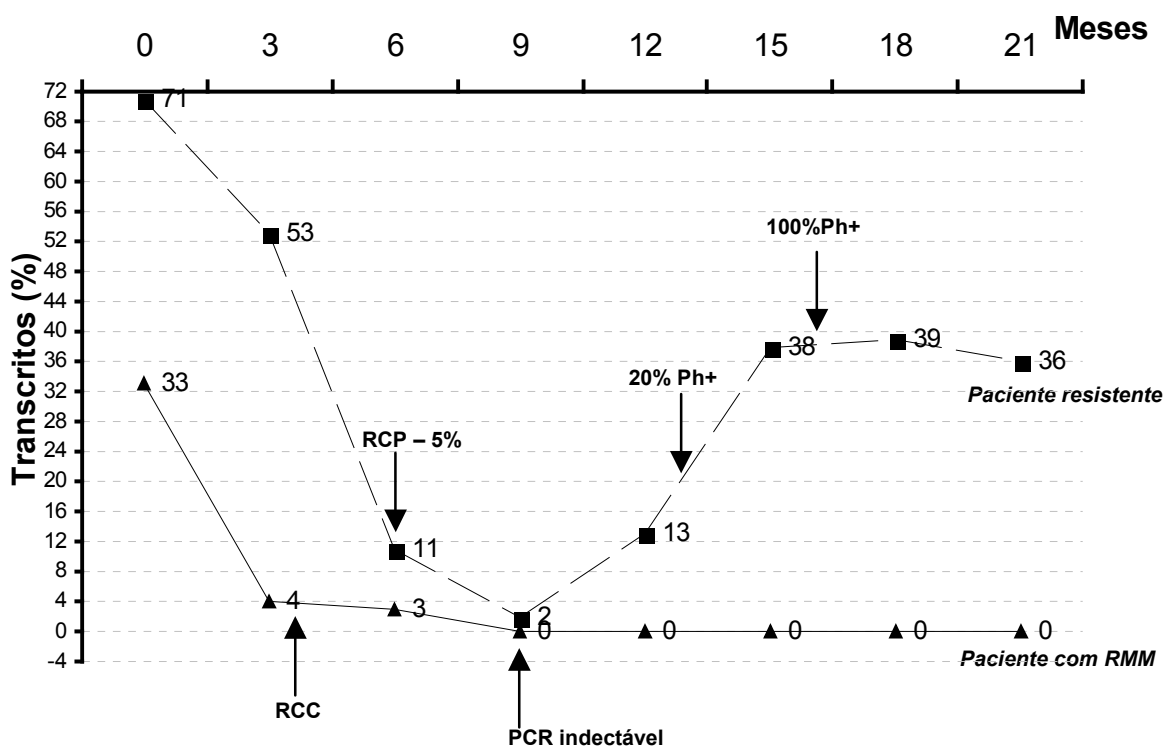


Figura 4.3. Respostas ao tratamento de dois pacientes do estudo.

5 RESULTADOS II

Nessa segunda análise, avaliamos 60 pacientes consecutivos, com LMC em FC, tratados com imatinibe e com acompanhamento molecular desde o diagnóstico, com o objetivo de avaliar a correlação da resposta molecular com sobrevida global e livre de eventos. Foram coletadas amostras para análise molecular ao diagnóstico e a cada 3 meses durante o tratamento. As principais características dos pacientes estão descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1. Características dos pacientes segundo estudo.

Características	N= 60	
Idade ao diagnóstico (mediana-média)	47.6	17.9-79.4
Idade no início do imatinibe (mediana-média)	48	18-79.5
Gênero (masc/fem)	28/32	47/53%
Hb (g/dL) (mediana-média)	12.8	6.8-17.1
WBC x10 ⁹ /l (mediana-média)	18	2.9-234
Plaquetas x10 ⁹ /l (mediana-média)	322.5	30.2-1,736
Índice de Sokal score		
Baixo	21	43 %
Intermediário	16	33 %
Alto	12	24 %
Ignorado	11	

Citogenética		
Ph positivo	58	97%
Ph negativo	02	3%
Tratamento prévio		
Hidrea	53	88%
Hidrea, IFN	7	12%
Ultima avaliação		
RCC+RMM	24	40
RCC, sem RMM	17	28
Sem RCC	19	32
Estado atual (vivos)%	58	97%

Os pacientes foram tratados com imatinibe durante uma mediana de 22 meses (0.9-44.6 meses). Foi utilizado como primeira linha de tratamento em 53 pacientes (88.6%). A dose inicial foi de 400 mg, com exceção de quatro pacientes participantes do estudo TOPS que iniciaram o tratamento com 800 mg.

Respostas

Respostas cumulativas: 57 (95%) pacientes atingiram resposta hematológica completa (RHC), numa mediana de 21 dias (0-147 dias). Um paciente foi primariamente resistente e dois foram intolerantes, com toxicidade hepática grau 3, sendo necessário descontinuação do imatinibe. Quarenta e cinco (75%) pacientes atingiram uma resposta citogenética maior (MCyR) e 38 (63%) resposta citogenética completa (RCC), numa mediana de 8 meses (3.4-29 meses). Em 3 pacientes a resposta citogenética não pode ser avaliada: um por número insuficiente de metáfases para análise e os outros por serem Ph negativos ao diagnóstico. No grupo que atingiu RCC, quatro pacientes perderam resposta: um atualmente está em uso de Hydrea, um em uso de dasatinibe e dois estão em uso de imatinibe 600 mg. Nenhum deles havia obtido RMM até o momento.

Vinte e quatro de 60 pacientes obtiveram RMM (40%), numa mediana de 8.5 meses (0.4-31 meses). Houve uma boa correlação entre RCC e RMM ($p= 0.04$). A sobrevida global (SG) e livre de eventos (SLE) para todos os pacientes foram de 96% e 77%, respectivamente, em 48 meses (Figura 5.1). SG e SLE foi superior nos pacientes com RCC (100%) *versus* pacientes que não obtiveram RCC (77%) ($p= 0.01$)(figura 5.2). Pacientes com RCC e RMM tiveram uma SLE maior em comparação com os pacientes com RCC e sem RMM ($p= 0.007$) (figura 5.3). Não houve diferença significativa na SG de acordo com os grupos de Sokal (figura 5.4). No entanto, os grupos de Sokal alto e intermediário tiveram mais eventos.

Três pacientes progrediram: um para CB, um para FA e um perdeu a RHC em FC. O tempo mediano para a progressão foi de 13.5 meses.

O Imatinibe foi descontinuado em 10/60 pacientes (15%): 6 (10%) por intolerância (toxicidade hepática grau 3 em 3 pacientes toxicidade hematológica grau 4 em 3 pacientes e em 4 (6.5%) devido a resistência. Os três pacientes com toxicidade hepática estão atualmente em tratamento com nilotinibe. Todos atingiram RCM e, dois deles atingiram RMM. Os pacientes que descontinuaram imatinibe por toxicidade hematológica foram tratados com dasatinibe. Um deles progrediu para CB e morreu de progressão de doença. Quatro pacientes descontinuaram o imatinibe por resistência: um perdeu a RCC e tinha a mutação T315, dois tiveram resistência citogenética e progrediram para FA e o quarto tinha a mutação M244V e morreu por progressão de doença. Os dois pacientes com resistência citogenética estão vivos: um foi submetido a transplante alogênico e está com RMC e o outro obteve RCM com dasatinibe. Portanto durante o tratamento somente dois pacientes morreram, um por progressão e outro por morte não relacionada a LMC.

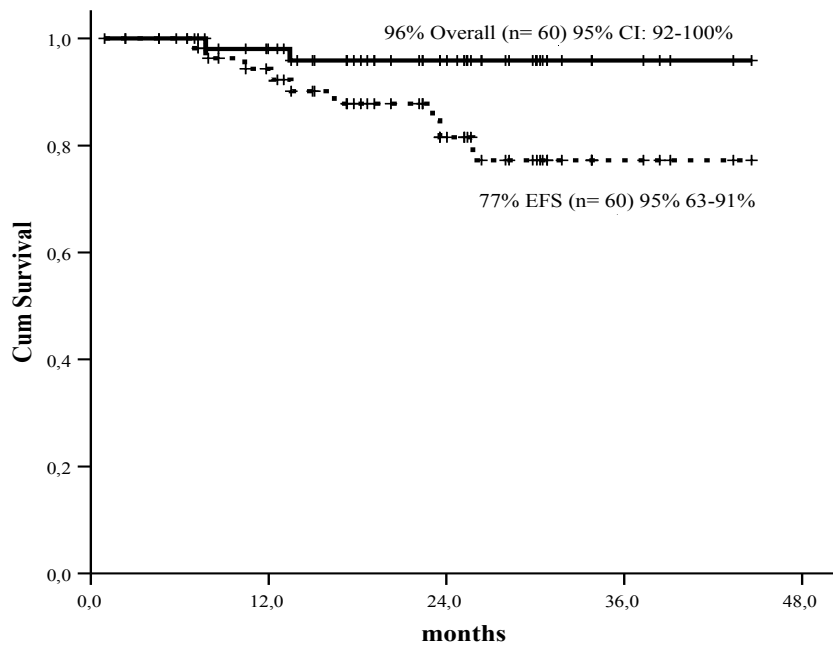


Figura 5.1.Sobrevida global e Sobrevida Livre de Eventos de pacientes com LMC tratados com imatinibe - FC

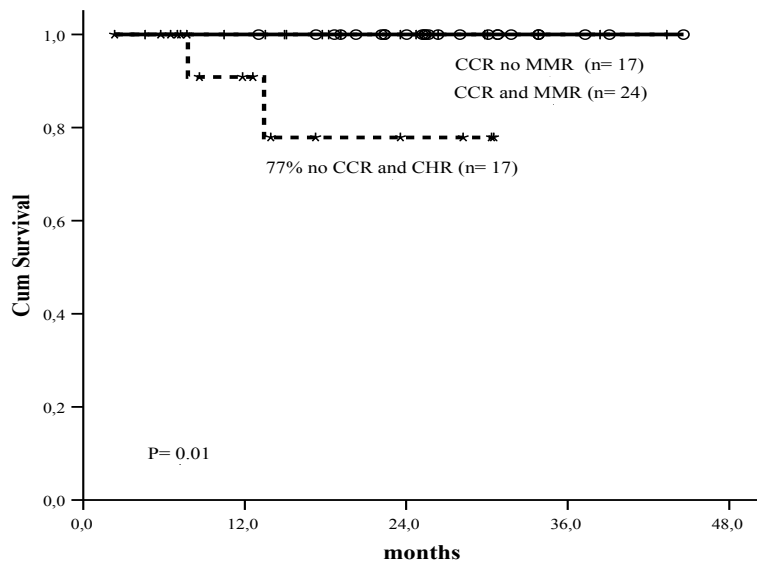


Figura 5.2.: Sobrevida global de acordo com as respostas hematológica, citogenética e molecular. CCR= RCC; MMR= RMM, CHR= RHC

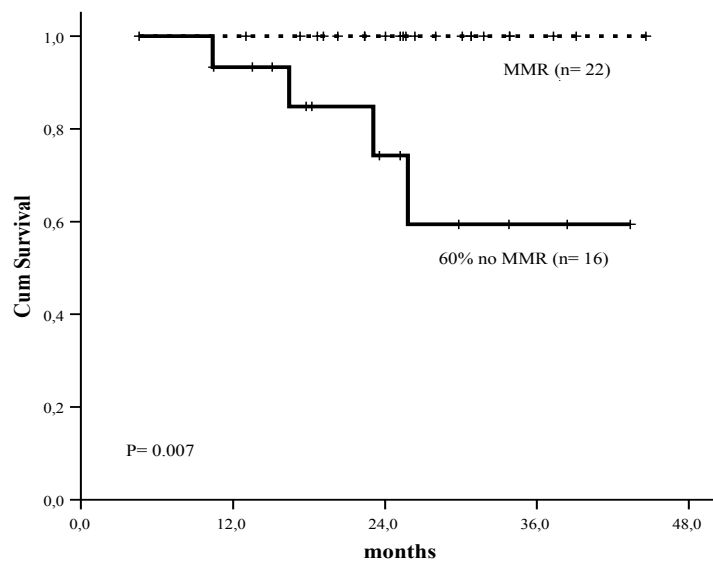


Figura 5.3.: Sobrevida livre de eventos do grupo com RCC de acordo com a resposta molecular.

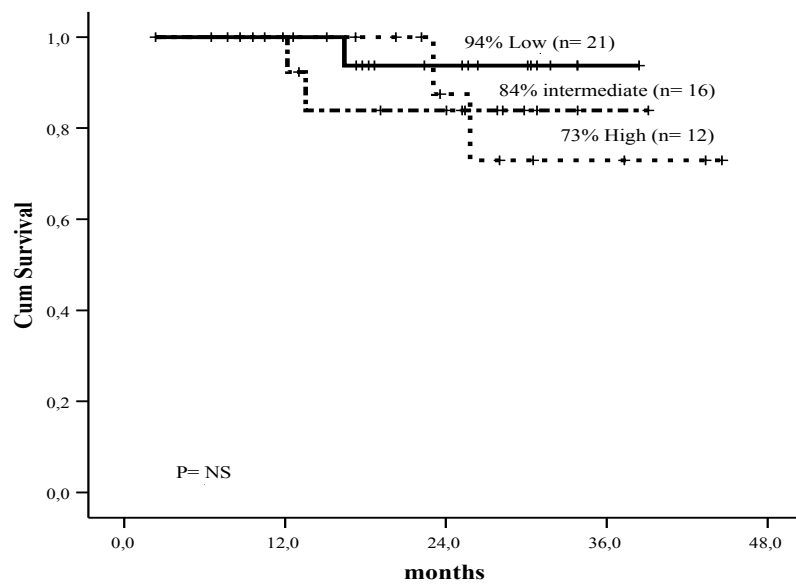


Figura 5.4.: Sobrevida livre de eventos do grupo com RCC de acordo com a resposta molecular.



Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste estudo nosso principal objetivo foi padronizar a técnica de PCR quantitativo para avaliação dos transcritos *BCR/ABL* em pacientes com LMC. Foram avaliados os pacientes tratados com mesilato de imatinibe acompanhados no Hemocentro da Unicamp. Preferencialmente, as amostras foram coletadas no momento do diagnóstico e depois a cada três meses. Mas por motivos de irregularidade nas coletas e de alguns pacientes já terem sido tratados em outros centros, nem sempre foi possível ter todas as amostras planejadas. A padronização envolveu uma série de procedimentos, desde a coleta adequada, processamento das amostras, extração do RNA, síntese de cDNA, a escolha do controle gene (*ABL*), o equipamento de termociclagem em tempo real, o preparo das curvas padrão de controle dos genes *BCR/ABL* e *ABL*. Seguimos as recomendações para a harmonização do protocolo de quantificação do *BCR/ABL* descrito por Hughes et al (25) e (27), embora o gene controle endógeno usado por estes seja o *BCR*, escolhemos o gene *ABL* por ter uma maior expressão. Muitos dos procedimentos discutidos foram utilizados para padronização dos procedimentos em nosso laboratório. Recentemente Branford et al (38) validou a utilização de uma escala internacional para reportar os resultados da PCR, permitindo a comparação das taxas de resposta molecular entre diferentes laboratórios através do cálculo do fator de conversão. O uso do fator de correção é permite que seja feita uma comparação dos resultados do tratamento em diferentes populações.

Nós obtivemos o *baseline* de quantificação do nosso laboratório, ou seja, o valor que representa 100% de transcritos entre os nossos pacientes através da mediana de 30 amostras de LMC diagnóstico.

Encontramos uma boa correlação entre resposta citogenética e resposta molecular como descrito anteriormente (19), onde o PCR-Q real-time se demonstra uma ótima alternativa aos exames citogenéticos com medula óssea. A perda de resposta molecular mostrou seguir um padrão paralelo aos testes citogenéticos e em vários pacientes podemos observar a perda de resposta ao tratamento antes de ter resultado de exames citogenéticos. Ou seja, o método tem sensibilidade e eficiência para monitorar pacientes com LMC em tratamento com mesilato de imatinibe, confirmando as informações descritas na literatura (34, 39, 25, 38, 27).

Após a padronização do método e dos resultados descritos anteriormente, avaliamos o monitoramento molecular de 60 pacientes consecutivos em FC tratados com imatinibe. Nessa população o acompanhamento com PCR em tempo real foi feito desde o início do tratamento. Por ser uma população mais homogênea, permitiu que analisássemos a influência da resposta molecular na sobrevida global e livre de eventos. Conforme descrito anteriormente em nossos resultados, encontramos uma proporção significativa dos pacientes que obtiveram RCC e RMM, apresentando uma evolução favorável em termos de sobrevida global e livre de evento. No entanto, não encontramos diferença estatística significativa na sobrevida global dos pacientes com RCC que atingiram RMM e os que não atingiram a RMM. Uma possível explicação é o número de pacientes avaliados e o tempo de acompanhamento da população estudada, cuja mediana foi de 22 meses. Provavelmente mais pacientes alcançarão uma RMM, porque a resposta molecular tende a aumentar com o tempo, sendo que no IRIS após 68 meses houve um aumento para 68% RMM. Além deste fato, aproximadamente 40% dos pacientes incluídos neste estudo não receberam imatinibe como tratamento de primeira linha.

Observamos neste estudo que a taxa de progressão foi maior nos pacientes que não atingiram RMM. De fato, pacientes que obtêm RMM não progrediram durante o seguimento. Iacobucci et al (39) mostraram que a obtenção da RMM na mesma época que a RCC está relacionada com maior duração da remissão citogenética (39). Resultados semelhantes foram relatados por Marin et al (43), que mostraram que pacientes com RCC, porém sem RMM aos 12 ou 18 meses têm mais chance de perder a RCC do que aqueles que obtiveram uma RMM (23,6% VS 2,6%) e (24,4% VS 0%), respectivamente. Esses autores também não encontraram diferenças na SG ou SLP em pacientes sem RMM aos 12 ou 18 meses.

Com todos esses dados podemos concluir que este estudo demonstra que o *real-time* PCR é um método eficiente e preciso para acompanhar os transcritos BCR/ABL, e que o método tem realmente uma boa correlação com a resposta clínica. Atingir uma RMM é um dos objetivos no tratamento da LMC. A padronização da técnica de PCR quantitativo, de acordo com os protocolos internacionalmente aceitos é fundamental para credibilidade e comparação dos resultados com outros centros.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

1. A técnica de RQ-PCR foi padronizada para quantificação dos transcritos *BCR/ABL*, usando-se como gene controle o gene *ABL*.
2. O valor basal do laboratório foi estabelecido através da quantificação de 30 amostras de pacientes com LMC ao diagnóstico
3. Foram quantificados os transcritos *BCR/ABL* de pacientes com LMC pré e durante o tratamento com mesilato de imatinibe. As taxas de resposta citogenética e molecular dos pacientes foram semelhante às observadas na literatura
4. Houve correlação entre diminuição no número de transcritos *BCR/ABL* com resposta citogenética.
5. Foi observada uma maior sobrevida livre de eventos nos pacientes que atingiram resposta molecular maior.



Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic Myeloid Leukemia. **Am. Soc. Hematol**, p.132-152, 2003.
- 02 - DEININGER, MW.; GOLDMAN, JM.; MELO, JV.; The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.96, p.3343-3356, 2000.
- 03 - GOLDMAN, JM. Chronic myeloid leukemia – still a few questions. **Exp. Hematol**, v.32, p.2-10,2004.
- 04 - VAN DER KUIP H, MOEHRING A, WOHLBOLD L, MIETHING C, DUYSER J, AULITZKY WE. Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of BCR/ABLin hematopoietic cell lines. **Leuk Res**. 2004 Apr;28(4):405-8.
- 05 - MELO JV. The diversity of BCR/ABLfusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**. 1996 Oct 1;88(7):2375-84.
- 06 - LEE SJ, ANASETTI C, HOROWITZ MM, ANTIN JH. Initial therapy for chronic myelogenous leukemia: playing the odds. **J Clin Oncol**. 1998 Sep;16(9):2897-903.
- 07 - ATHENS, JW. Leucemia mielóide crônica. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe Hematologia Clínica**, São Paulo, Editora Menoli, 1998, 9. ed, v.II, cap.75, p.2169-2201.
- 08 - JAFFE, ES.; HARRIS, NL.; STEIN, H.; VARDIMAN, JW. World Health Organization Classification of Tumours in: **Pathology and Genetics of Tumours of Haemathopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC Press, Lyon, 2001.
- 09 – BACCARANI, M, SAGLIO, G, GOLDMAN, J, HOCHHAUS, A, SIMONSSON, B, APPELBAUM, F, et al. European LeukemiaNet. **Blood**. 2006 Sep 15;108(6):1809-20.

Epub 2006 May 18.

10 - GOLDMAN, JM. e DRUKER, BJ. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. **Blood**, v.198, p.2039-2042, 2001.

11 - DRUKER, BJ. STI571 (GleevecTM) as paradigm for cancer therapy. **Tr. Molec. Med**, v.8, n.4,p.S14-S18, 2002.

12 - KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C; et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med**, v.346, p.645-652, 2002.

13 - ROSTI, G.; MARTINELLI, G.; BASSI, S.; AMABILE, M.; TRABACCHI, E.; GIANNINI, B.; et al. Molecular response to imatinib in late chronic-phase chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.103, n.6, p.2284-2290, 2004.

14 - O'BRIEN, SG.; GUILHOT, F.; LARSON, RA.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, JJ.; et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v.348,p.994-1004,2003.

15 - BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; PARKINSON, I.; GRIGG, A.; SZER, J.; et al. Detection of BCR/ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**, v.102, p.276-283, 2003.

16 - AGUILERA, DG. TSIMBERIDOU, AM. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review clin risk manag. 2009; 5: 281–289.

- 17 - BRANDFORD, S.; RUDZKI, Z.; HARPER, A.; GRIGG, A.; TAYLOR, K.; DURRANT, S.; et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Leuk**, v.17, p.2401-2409, 2004.
- 18 - JABBOUR E, CORTES J, KANTARJIAN H. Treatment selection after imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Target Oncol**. 2009 Jan;4(1):3-10. Epub 2009 Jan 30. Review. PubMed PMID: 19343297.
- 19 - BRANDFORD, S.; HUGHES, TP.; RUDZIKI, Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. **Brit. J. Haematol**, v.107, p.587-599, 1999.
- 20 - MORGAN, GJ.; WIEDEMANN, LM. Molecular biology of the Philadelphia positive leukaemias. **Recenti Prog Med**. 1989 Oct; 80(10)508-19.
- 21 - CROSS, NC.; HUGHES, TP.; FENG, L.; O'SHEA, P. BUNGEY, J.; GOLDMAN, JM. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br. J Hematol*. 1993 May; 84(1):67-74.
- 22 - HUGHES, TP.; KAEDA, J.; BRANDFORD, S.; RUDZKI, Z.; HOCHHAUS, A.; HENSLEY, ML.; et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v.349, p.1423-1432, 2003.
- 23 - NEUMANN, F.; HEROLD, C.; HILDEBRANDT, B.; KOBBE, G.; AIVADO, M.; RONG, A.; et al. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR/ABLpositive leukaemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. **Eur. J. Haematol**, v.70, p.1-10, 2003.

- 24 - GABERT, J.; BEILLARD, E.; VAN DER VELDEN, VHJ.; BI, W.; GRIMWADE, D.; PALLISGAARD, N.; et al. Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe against cancer program. **Leuk**, v.17, p.2318-2357, 2003.
- 25 - HUGHES T. ABL kinase inhibitor therapy for CML: baseline assessments and response monitoring. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2006:211-8.
- 26 - WANG, L.; PEARSON, K.; FERGUSON, JE.; CLARK, RE. The early molecular response to imatinib predicts cytogenetic and clinical outcome in chronic myeloid leukaemia. **Brit. J. Haematol**, v.120, p.990-999, 2003.
- 27 - HUGHES, T. e BRANDFORD, S.; Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. **Sem. Hematol**, v.40, n.2, p.62-68, 2003.
- 28 - PETERS, IR.; HELPS, CR.; HALL, EJ.; DAY, MJ. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. **J. Immunol. Method**, v.286, p.203-217, 2004.
- 29 - VAN DER VELDEN, VHJ.; HOCHHAUS, A.; CAZZANIGA, G.; SZCZEPANSKI, T.; GABERT, J.; VAN DONGEN, JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leuk**, v.17, p.1013-1034, 2003.
- 30 - MÜLLER MC, SAGLIO G, LIN F, PFEIFER H, PRESS R.D, TUBBS R.R, PASCHKA P, GOTTARDI E, et al. An international study to standardize the detection and quantitation of BCR/ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. **Haematologica** . 2007 Jul;92(7):970-3.

- 31 - HOLLAND, PM.; ABRAMSON, RD.; WATSON, R.; GELFAND, DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 88, p.7276-7280, 1991.
- 32 - KREUZER, KA.; BOHN, A.; LUPBERGER, J.; SOLASSOL, J.; LE COUTRE, P.; SCHIMIDT, CA. Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye. **Clin. Chem**, v.47, p.486-490, 2001.
- 33 - MENSINK, E.; LOCHT VAN DE, A.; SCHATTENBERG, A.; LINDERS, E.; SCHAAP, N.; GEURTS VAN KESSEL, A.; et al. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. **Brit. J. Hematol**, v.102, p.768-774, 1998.
- 34 - WANG, L.; PEARSON, K.; PILLITTERI, L.; FERGUSON, JE.; CLARK, RE. Serial monitoring of BCR/ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Brit. J. Haematol**, v.118, p.771-777, 2002.
- 35 - WITTOR, H.; EMIG, M.; BETZL, G.; HEHLMANN, R.; LEYING, H.; HOCHHAUS, A. Detection and quantification of BCR/ABL transcripts using a novel real-time approach with specific fluorescent hybridization probes. **Roche Molec. Biochem**, 1998.
- 36 - KIM, YJ.; KIM, DW.; LEE, S. KIM, HJ.; KIM, YL.; HWANG, JY et al. Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. **Eu.J. Hematol**, v.68, p 272-280, 2002.
- 37 - ALIZADEH, M.; BERNARD, M. DANIC, B.; DAURIC, C.; BIREBENT, B.; LAPART, C.; et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow

transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Blood**, v.99, n. 12, p.4618-4625, 2002.

38 - BRANFORD S, FLETCHER L, CROSS NC, MÜLLER MC, HOCHHAUS A, KIM DW, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. **Blood**. 2008 Oct 15;112(8):3330-8. Epub 2008 Aug 6.

39 - IACOBUCCI I, SAGLIO G, ROSTI G, TESTONI N, PANE F, AMABILE M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. **Clin Cancer Res**. 2006 May 15;12(10):3037-42.

40 - KAEDA J, CHASE A, GOLDMAN JM. Cytogenetic and Molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. **Acta Haematol** 2002;107:64-75

41 - BRANFORD S, CROSS NC, HOCHHAUS A, RADICH J, SAGLIO G, KAEDA J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**. 2006 Nov;20(11):1925-30. Epub 2006 Sep 14.

42 - SOKAL JE.; BACCARANI, M.; RUSSO, D.; TURA, S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. **Semin Hematol**, 1988 Jan: 25(1):49-61.

43 - MARIN D, MILOJKOVIC D, OLAVARRIA E, KHORASHAD JS, DE LAVALLADE H, REID AG, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. **Blood**. 2008 Dec 1;112(12):4437-44



Anexo 1

**BCR-ABL levels monitoring in CML patients in chronic phase treated with imatinib -
importance of a major molecular response**

Melissa Pereira Machado¹, Juarez P. Tomaz¹, Eliana Cristina Martins Miranda¹, Carmino Antonio de Souza¹, Irene Lorand-Metze¹, Afonso C. Vigorito¹, Marcia Torresan Delamain¹, Israel Bendit², Noemi Farah³, Katia B. Barbosa Pagnano¹

¹ Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro, University of Campinas - UNICAMP, SP, Brazil

² Medical School-University of São Paulo (USP), SP, Brazil

³ University of Paraná-Curitiba, SP, Brazil

Authors contributions:

Melissa Pereira Machado performed PCR standardization and analysis, assembled the molecular data and wrote the manuscript

Juarez P. Tomaz was responsible for PCR standardization and analysis and laboratory supervision

Eliana Cristina Miranda performed the statistical analysis

Carmino Antonio de Souza reviewed and commented on the manuscript

Irene Lorand-Metze provided patient care, reviewed and commented on the manuscript

Afonso C. Vigorito provided patient care, commented on the manuscript

Marcia Torresan Delamain provided patient care, commented on the manuscript

Israel Bendit provided technical support for PCR standardization, commented and reviewed the manuscript

Noemi Farah provided technical support for PCR standardization

Katia B. Barbosa Pagnano designed the study, provided patient care and wrote the manuscript

Corresponding Author

Katia B. Barbosa Pagnano

Rua Carlos Chagas, 480 - P.O. Box: 6198

13083-878 – Campinas, SP, Brazil

Phone: 55 19 3521 8740

Fax: 55 19 3521 8600

E-mail: kborgia@unicamp.br

Abstract

Real time PCR has become the most common technique for monitoring BCR-ABL levels transcripts of patients treated with kinase inhibitors. In this study, BCR-ABL levels of 60 CML patients in chronic phase treated with imatinib were measured at diagnosis and then every three months, from peripheral blood samples. The results were reported as a BCR-ABL/ABL ratio (%). Major molecular response (MMR) was considered a three log reduction from the baseline value. MMR values were adjusted to international scale, using a conversion factor of 1.19. Hematological, major cytogenetic and complete cytogenetic response were achieved by 57 (95%), 45 (75%) and 38 (63%) patients. Twenty-four out of 60 patients achieved a MMR (40%), in a median time of 8.5 months. Overall survival and event free survival (EFS) was superior for patients with CCR (100%) *versus* patients with no CCR (77%) ($p= 0.01$) in 48 months. Patients with CCR and with MMR had a superior EFS in comparison with patients with CCR and no MMR ($p= 0.007$). In conclusion, we could demonstrate the prognostic impact of achieving CCR and a major molecular response and also the importance of molecular monitoring in the follow-up of CML patients.

Running title:

Key words: chronic myeloid leukemia, real-time PCR, molecular monitoring, bcr-abl, imatinib

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic disorder characterized by the malignant expansion of bone marrow stem cells, with the presence of a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, resulting in a fusion gene, BCR-ABL, whose product is a 210kd protein with tyrosine kinase activity [1].

The level of leukemic inhibition after treatment can be measured by real-time quantitative PCR (RQ-PCR), which has become the predominant molecular technique for monitoring the levels of BCR-ABL transcripts in CML after kinase inhibitors treatment [2-4]. Rising levels of BCR-ABL are strongly predictive of cytogenetic and hematologic relapse after allogeneic transplant [5]. Monitoring Imatinib-treated CML patients by quantitative RT-PCR has proved to be effective to define patient response, as reported in IRIS trial[6]. Achievement of a major molecular response, defined as a three-log reduction of BCR-ABL levels from a standardized baseline, is associated with a favorable progression-free survival [6-8] and a longer duration of CCR [9]. Early reduction of BCR-ABL can predict a subsequent cytogenetic response [3].

The standardization of all procedures involved in BCR-ABL quantification is important for reproducibility and credibility of the results.

The aim of this study was to standardize PCR-Q for monitoring BCR-ABL levels in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors and correlate BCR-ABL levels with cytogenetic response, event free and overall survival.

Patients and methods

Peripheral blood samples were collected from patients with diagnosis of CML chronic phase from June 2005 until September 2008. Diagnosis of CML was determined by the

presence of Ph chromosome in cytogenetic evaluation and/or BCR-ABL transcripts by RT-PCR. Eligibility criteria included patients with age more than 18 years or more. Patients provided written informed consent approved by the local Ethics Committee. Median follow-up time was 22 months (0.9–44.6 months).

Treatment procedures and definitions: patients received 400mg imatinib as first or second line therapy (53 and 7 patients, respectively) for chronic phase CML. Filgrastin 300ug/day was given if neutrophil count were below $1.000 \times 10^9/L$, until recovery. Imatinib dose was escalated to 600 mg when a patient had sub-optimal response (less than major cytogenetic response at 6 months, less than complete cytogenetic response at 12 months, less than major molecular response at 18 months) or failure (no minimal cytogenetic response at 6 months, no major cytogenetic response at 12 months, loss of hematological response, progression to accelerated or blast crisis at any moment) and was able to tolerate dose increase. Second generation tyrosine kinase inhibitors (TKI) (nilotinib or dasatinib) were used for intolerance or resistance to imatinib. The second generation TKI were available in our center only in clinical trials until 2008, when dasatinib was approved in Brazil. Blood cell counts were performed every two weeks until complete hematological response was achieved, then every one to three months. Cytogenetic evaluation was performed at diagnosis and then every 3-6 months until confirmed complete cytogenetic response, then every 6-12 months. Peripheral blood samples were collected for evaluation of BCR-ABL levels at diagnosis and then every three months after start of imatinib treatment. Response criteria used were those defined by the European Leukemia Net group: complete hematologic response: normalization of blood cell counts with no immature cells, <5% of basophils, no palpable spleen; cytogenetic response: partial cytogenetic response-1-35% of Ph+ metaphases, complete cytogenetic response-0% of Ph+ metaphases; major

molecular response- 3 or more log reduction of BCR-ABL transcripts levels of a standardized baseline (≤ 0.1 in the international scale)[10]. We followed the standardization procedures described by Brandford et al 2006 and Hughes 2006 [11, 12].

RNA extraction and cDNA synthesis

Total leukocyte RNA was extracted from 16 mL of PB in EDTA tubes. Samples were kept in room temperature and processed in 24 h after collection to avoid RNA degradation. Red cells were lysed and residual cells were homogenized in 1mL Trizol RNA stabilization solution (Invitrogen®) and stored at -80°C . RNA was extracted according to manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed by electrophoresis in agarose gel and quantified on Nanodrop spectrophotometer (ND 1000-NanoDrop® 3.2.1). SuperScript II (Invitrogen®) reverse transcriptase was used for cDNA synthesis, using 1 μg of total RNA and random hexamers.

Quantitative real-time PCR

CDNA was amplified by 50 cycles of RQ-PCR using the ABI 7300 sequence detection system (Applied biosystems) and TAQMAN Universal Master Mix in accordance with the manufacturer's instructions in a final reaction volume of 15 μL . ABL was used as the control gene. Primers used were as followed:

- Forward (ABL-146F): 5'-GATACGAAGGGAGGGTGTACCA-3';
- Reverse (ABL-240R): 5'-CTCGGCCAGGGTGTGAA-3'

The bcr-abl and abl probes were dual labeled with a reporter fluorochrome (FAM) and a quencher fluorochrome (TAMRA). Probe and primer concentration were 5 μM .

A standard curve was generated using serial dilutions of a linearized plasmid containing a BCR-ABL insert (4-6 dilutions). Triplicates were performed for standard curve and patients. Samples should not have a variation more than one CT between them. Threshold was adjusted for 0.05. The coefficient of determination of the standard curve (R^2) accepted was close to 1.0 (more than 99%). Slopes were considered acceptable if the values were between 3.3 and 3.6. Quality controls of high and low level were used in each assay (K562 lineage and a 3 log reduction sample). Negative controls: no template and HL60 lineage.

The results were reported as a BCR-ABL/ABL ratio (%). A baseline value for the laboratory was calculated using the median quantification of 30 pre-treatment samples. The standardized baseline value determined for our laboratory was 83.67%. Major molecular response (MMR) was considered a three log reduction from the baseline value. MMR values were adjusted to international scale, using a conversion factor of 1.19.

Statistical Analysis

The cutoff date for this analysis was April 2009. We performed analyses of overall survival (OS) and progression free survival (PFS), using the Kaplan-Meier method according to “intention to treat” basis. Differences between subgroups receiving imatinib were calculated by the log-rank test and it was considered $P < 0.05$ as significant. Overall Survival was measured from beginning of imatinib to the date of death or last follow-up. Event-free Survival included all patients and was calculated from beginning of imatinib until any event (death, progression to accelerated-phase or blast crisis CML, loss of CHR or CCyR). The prognostic scores were calculated according to the method of Sokal et al. (13). The analysis were performed using the software SPSS, version 14.0.

Results

Sixty CML patients in CP at diagnosis were analyzed. Patients' characteristics are described in the Table 1. Imatinib was initiated in a median time of two months from diagnosis (0.5-18.5 months). Hydrea was used as cytoreduction therapy before imatinib until CML diagnosis confirmation or imatinib availability. Patients were treated with imatinib in a median time of 22 months (0.9-44.6 months). Imatinib was used as first line treatment in 53 patients (88.6%). Initial dose was 400 mg, with exception of four patients participating from TOPS trial [13], who were treated with 800 mg up front.

Responses

Cumulative response rates: 57 (95%) patients achieved complete hematologic response (CHR), in a median time of 21 days (0-147 days). One patient was primarily resistant and two were intolerant, with grade 3 hepatic toxicity and imatinib was then discontinued. Forty-five (75%) patients achieved a major cytogenetic response (MCyR) and 38 (63%) a complete cytogenetic response (CCR) in a median time of 8 months (3.4-29 months). In three patients cytogenetic response could not be evaluated: one due to insufficient number of metaphases for analysis and two were Ph negative at diagnosis. In the group that achieved CCR, four patients lost response: one is currently on Hydrea, one on dasatinib and two are on imatinib 600mg. None of them have achieved MMR, so far.

Twenty-four out of 60 patients achieved a MMR (40%) in a median time of 8.5 months (0.4-31 months). There was a good correlation between CCR and MMR ($p=0.04$). Overall and event free survival for all patients was 96% and 77%, respectively, in 48 months

(figure 1). Overall survival and EFS was superior for patients with CCR (100%) *versus* patients with no CCR (77%) ($p= 0.01$). Patients with CCR and MMR had a superior EFS in comparison with patients with CCR and no MMR ($p= 0.007$) (figure 2). There was no significant difference in survival according to Sokal groups (figure 3). Although, intermediate and high scores had more events.

Three patients progressed: one to blast crisis, one to accelerated phase and one to lost hematological response in chronic phase. Median time to progression was 13.5 months.

Imatinib was discontinued in 10 of 60 patients (15%): 6 (10%) due to intolerance (hepatic toxicity grade 3 in 3 patients; hematological toxicity grade 4 in 3 patients) and 4 (6.5%) due to resistance. The three patients with hepatic toxicity are currently on nilotinib. All achieved major cytogenetic response and two of them major molecular response. Patients who discontinued imatinib due to hematological toxicity were treated with dasatinib. One of them progressed to blast crisis and died of disease progression. Four patients discontinued imatinib due to resistance: one lost cytogenetic response and had T315I mutation, two had cytogenetic resistance and one progressed to accelerated phase. This last patient had the mutation M244V identified and died due to disease progression. The two patients with cytogenetic resistance are alive: one received hematopoietic stem cell transplantation and is in complete molecular response and the other one is in major cytogenetic response with dasatinib. So, during imatinib treatment only two patients died, one due to progression and another one non-related cause of CML.

Discussion

In this study we monitored the treatment of CML patients in CP with imatinib by real-time RT-PCR. Samples were collected at diagnosis and then every three months after imatinib initiation.

Initially we performed the standardization of real time BCR-ABL quantification. The standardization involved a series of procedures, as appropriate sample collection, RNA extraction, cDNA synthesis, choice of control gene (ABL), equipment, standard curves of control gene and BCR-ABL and RT-PCR analysis. The recommendations for harmonizing BCR-ABL measurement were reviewed by Hughes et al in 2006[11]. Many of the procedures discussed in that study were used for standardization of the procedures in our laboratory. Recently Branford et al validated the use of an International Scale for reporting PCR results, allowing comparison of molecular response rates between different laboratories[14]. The standardization is an important step for treatment comparisons in different populations. We generated the laboratory baseline based on the median value of quantification of 30 CML samples at diagnosis. We found a good correlation between cytogenetic and molecular response as previously described [4]. The validation of the conversion factor should be the next step for standardization, with the collaboration of other laboratories.

A significant proportion of patients achieved a CCR and MMR (63% and 40% respectively). In general, after 12 months of imatinib therapy, 69% of patients with CML in CP achieve CCR, as described in IRIS study[15]. Among patients with CCR after 12 months of imatinib treatment, those with MMR have a significant improved progression-free survival compared to those without MMR [6]. In our study, overall survival and EFS

was superior for patients with CCR (100%) *versus* patients with no CCR (77%). We also observed that patients presenting CCR and MMR had a superior event free survival compared to patients with CCR but no MMR (100% vs 60%). The rate of progression was higher in patients who did not achieve MMR. In fact, patients that achieved MMR did not progress during the follow-up. Iacobucci et al showed that achievement of MMR at the time of first CCR is associated with longer cytogenetic remission duration than those without MMR [9]. Moreover, patients with BCR-ABL ratio >1-10% after 3 months on imatinib had a 92% of probability of CCR, but the risk of progression was almost 3-fold that of patients with ratio $\leq 1\%$, suggesting that patients not in CCR in the first year have a higher risk of progression. Similar results were found by Marin et al, that showed that patients with CCR but no MMR at 12 or 18 months were more likely to lose CCR than patients that achieved MMR (23.6% vs 2.6%) and (24.4% vs 0%) respectively. However, they did not find significant difference in OS or PFS in patients without MMR at 12 or 18 months[16].

In summary, this study demonstrates that real-time PCR is an accurate and practical method for BCR-ABL transcripts monitoring, with a good correlation to clinical response. Achievement of MMR is an important goal in CML treatment and is related to an improved EFS.

Figure 1. Overall and Event Free Survival of CML patients in chronic phase

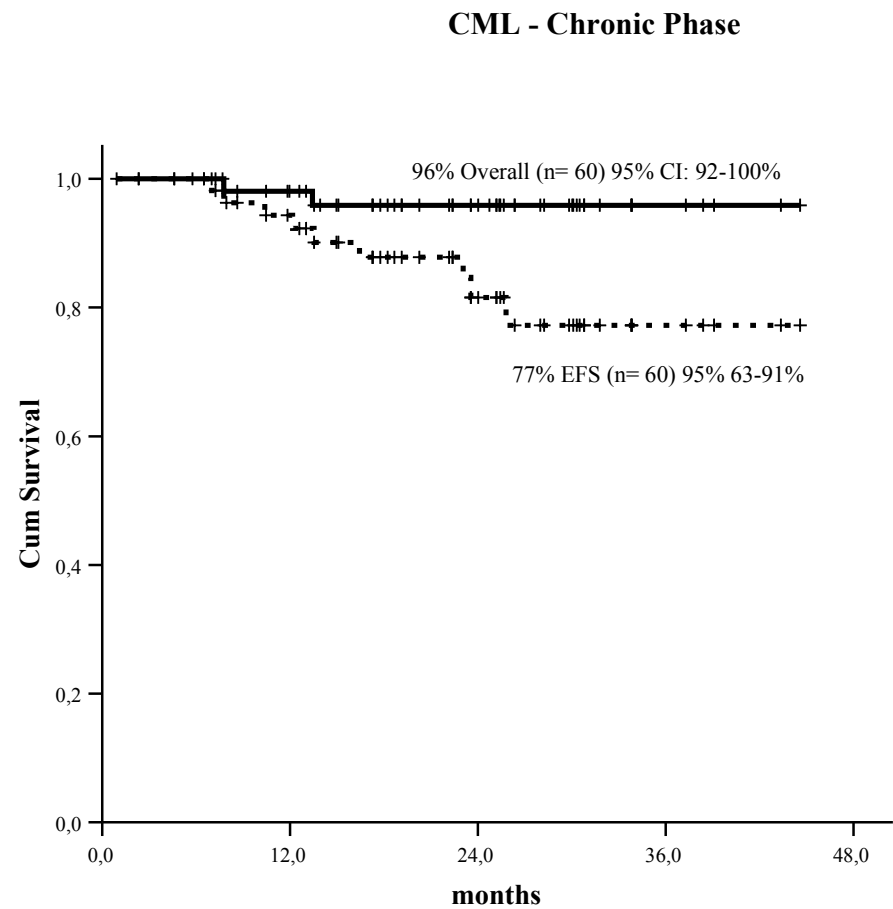
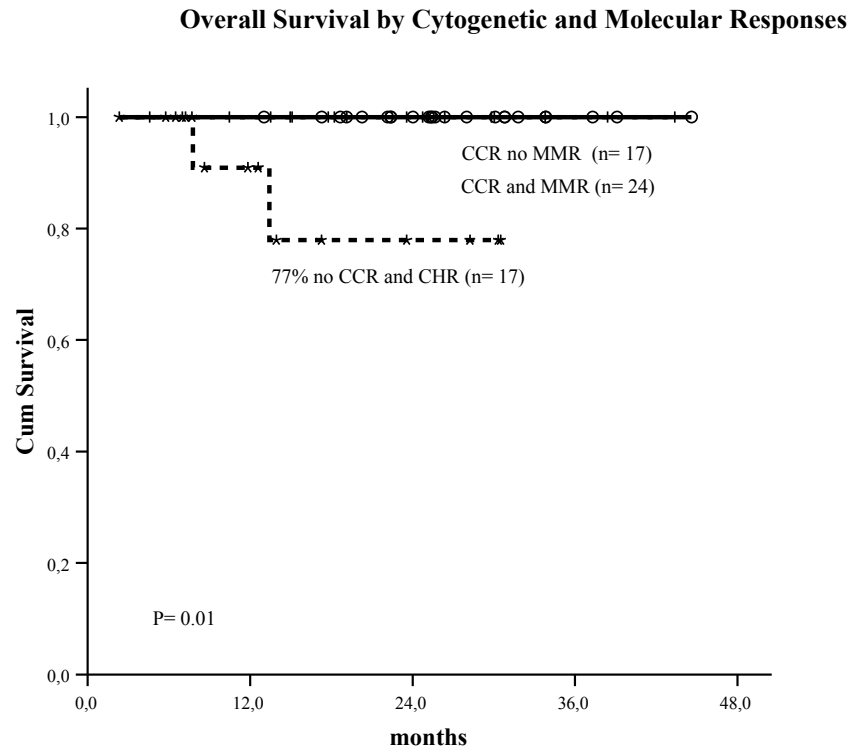
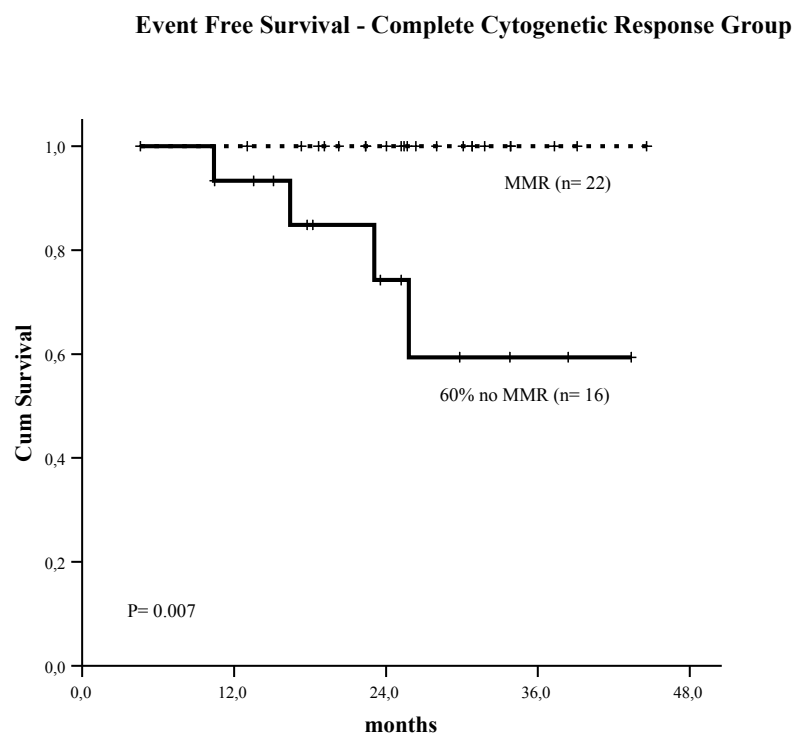


Figure 2. Overall survival according to molecular responses



CCR= Complete Cytogenetic Response
MMR= Mayor Molecular Response
CHR= Complete Hematologic Response

Figure 3. Event Free Survival according to molecular responses in the CCR Group



MMR= Mayor Molecular Response

Figure 4– Event Free Survival according to Sokal group

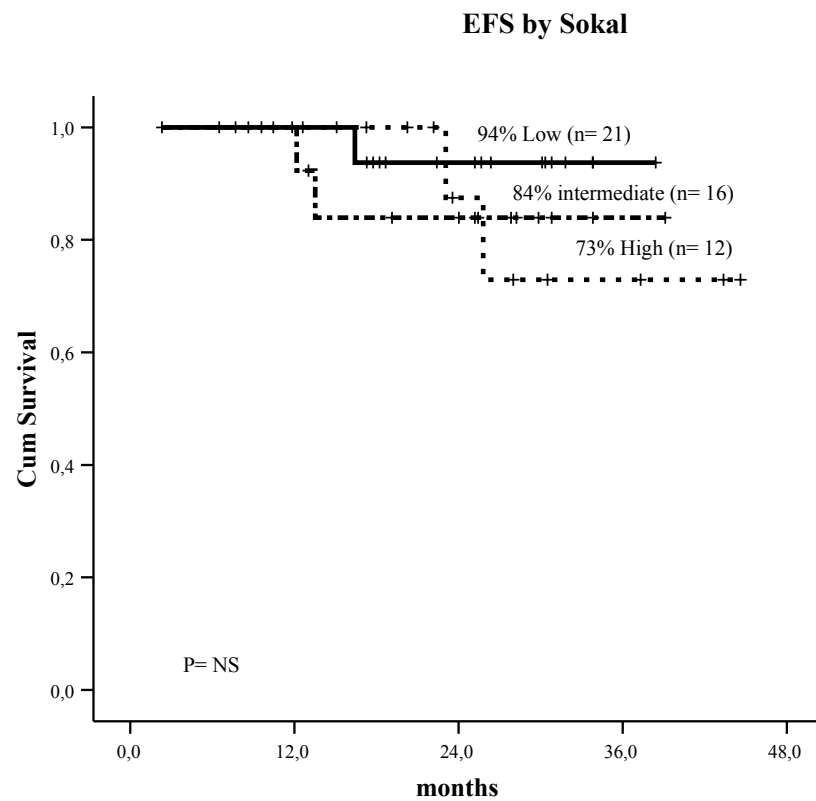


Table 1: Patients' characteristics

Characteristics	N= 60	
Age at diagnosis (median-range)	47.6	17.9-79.4
Age at imatinib start (median-range)	48	18-79.5
Gender (male/female)	28/32	47/53%
Hb (g/dL) (median-range)	12.8	6.8-17.1
WBC x10 ⁹ /l (median-range)	18	2.9-234
Platelets x10 ⁹ /l (median-range)	322.5	30.2-1,736
Sokal score		
Low	21	43 %
Intermediate	16	33 %
High	12	24 %
Missing	11	
Cytogenetics		
Ph positive	58	97%
Ph negative	02	3%
Previous treatment		
Hydrea	53	88%
Hydrea, IFN	7	12%
Last evaluation		
CCR+MMR	24	40
CCR, no MMR	17	28
No CCR	19	32
Present status (alive)%	58	97%

Acknowledgments

Melissa Pereira Machado was supported by scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Novartis contributed with real time equipment acquisition and reagents for real-time standardization.

References

- [1] Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1996 May;10(5):751-6.
- [2] Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(3):771-7.
- [3] Muller MC, Gattermann N, Lahaye T, Deininger MW, Berndt A, Fruehauf S, et al. Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2392-400.
- [4] Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British journal of haematology*. 1999 Dec;107(3):587-99.
- [5] Radich JP, Gooley T, Bryant E, Chauncey T, Clift R, Beppu L, et al. The significance of bcr-abl molecular detection in chronic myeloid leukemia patients "late," 18 months or more after transplantation. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1701-7.
- [6] Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003 Oct 9;349(15):1423-32.
- [7] Press RD, Love Z, Tronnes AA, Yang R, Tran T, Mongoue-Tchokote S, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4250-6.
- [8] Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Jones D, Luthra R, Shan J, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3425-32.
- [9] Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3037-42.
- [10] Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809-20.
- [11] Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review

and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):28-37.

[12] Branford S, Cross NC, Hochhaus A, Radich J, Saglio G, Kaeda J, et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):1925-30.

[13] Cortes J, Baccarani M, Guilhot Fea. A phase III, randomized, open-label study of 400 mg versus 800 mg of imatinib mesylate (IM) in patients with newly diagnosed , priviously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP), using molecular endpoints: one year results of TOPS (Tyrosine kinase inhibitor optimization and Selectivity) Study. *Blood (Annual Meeting Abstracts)* Abstract 335. 2008.

[14] Branford S, Fletcher L, Cross NC, Muller MC, Hochhaus A, Kim DW, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3330-8.

[15] O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2003 Mar 13;348(11):994-1004.

[16] Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, Khorashad JS, de Lavallade H, Reid AG, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4437-44.



Anexo 2

CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DA UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A finalidade deste é trazer informações para o paciente sobre o estudo “Monitoramento molecular de pacientes com leucemia mielóide crônica em uso do imatinib e após o transplante de medula óssea através da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real (real-time)”, sob a coordenação da Dr. Katia Borgia Barbosa Pagnano.

A droga mesilato de Imatinib (Glivec®) tem sido utilizada com sucesso no tratamento da LMC e no Brasil tem sido indicada na fase crônica da doença em pacientes resistentes ou intolerantes ao Interferon e nas fases acelerada (FA) e crise blástica (CB). Na LMC há a produção de uma proteína anormal pelas células tumorais (BCR-ABL), responsável pelas alterações encontradas na doença. O Glivec atua inativando essa proteína, conseqüentemente há melhora clínica e laboratorial. A resposta ao tratamento com Glivec é avaliada rotineiramente através de 3 exames: hemograma, cariótipo e análise molecular. A análise molecular pode ser realizada de modo qualitativo ou quantitativo. No método qualitativo não se quantifica a quantidade de BCR-ABL, somente é determina se a proteína está presente ou não. O método quantitativo diz a quantidade de BCR-ABL presente e portanto dá mais informações que o método anterior e é importante em decisões terapêuticas. Sabe-se atualmente que quanto melhor a resposta citogenética e molecular maior o tempo livre de progressão da doença.

Portanto, o objetivo do estudo acima é monitorar os níveis de transcritos nos pacientes com LMC que estiverem em tratamento com Glivec® e também nos que forem submetidos ao transplante de medula óssea. Esses dados poderão ser úteis na avaliação de resposta ao tratamento e na sobrevida livre de progressão e global. A pesquisa será feita em amostras de sangue periférico. Serão coletados 20 ml de sangue periférico em diversas etapas do tratamento:

- Pacientes em uso de imatinib: ao diagnóstico (pré uso de imatinib), a cada três meses durante o primeiro ano; pacientes com resposta citogenética completa

serão monitorados a cada três meses ou a cada mês se houver aumento no número de transcritos.

- Pacientes submetidos ao TMO: pré transplante, d+55, d+100, 6 meses e 1 ano. Se houver aumento dos níveis dos transcritos a avaliação será mensal.

Enfatizamos os seguintes pontos:

- 1- Você tem ampla liberdade de recusar a participação no estudo ou retirar o consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do tratamento.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a privacidade dos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Garantia de acesso ao médico responsável pelo estudo e ao respectivo comitê de ética institucional, quando necessário.

Eu, _____,
declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “Monitoramento molecular de pacientes com leucemia mielóide crônica em uso do imatinib e após o transplante de medula óssea através da técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real (real-time)” sob a coordenação da Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano . Autorizo a coleta de amostras de sangue periférico que serão utilizadas nesse estudo.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe médica responsável, à manipulação dos dados e se necessário o armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros após submetidos ao CEP e ao CONEP.

_____ Paciente	_____ Médico
_____ Testemunha	_____ Data

Comitê de Ética : (019) 3788-8936

Endereço: Rua Tessália Vieira de camargo, 126 - UNICAMP

Endereço: Rua Carlos Chagas, 480 – Hemocentro / Unicamp. Telefone: (019)3788-8740