



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDA DE CÁSSIA FRASSON CARVALHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES
TARP, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*
EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA
RESISTENTES AO IMATINIBE TRATADOS COM DASATINIBE

CAMPINAS

2017

FERNANDA DE CÁSSIA FRASSON CARVALHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES

TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1

EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

RESISTENTES AO IMATINIBE TRATADOS COM DASATINIBE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na Área de
Concentração em Clínica Médica

ORIENTADOR: DRA. KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA FERNANDA DE CÁSSIA FRASSON CARVALHO,
E ORIENTADO PELA PROF^a. DRA. KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01P-3370-2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

C253a Carvalho, Fernanda de Cássia Frasson, 1978-
Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com leucemia mieloide crônica resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe / Fernanda de Cássia Frasson Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Katia Borgia Barbosa Pagnano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Imatinibe. 3. Dasatinibe. I. Pagnano, Katia Borgia Barbosa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG and AKT1 genes expression in patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib

Palavras-chave em inglês:

Chronic myeloid leukemia

Imatinib

Dasatinib

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Katia Borgia Barbosa Pagnano [Orientador]

Israel Bendit

Fabíola Traina

Data de defesa: 17-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

FERNANDA DE CÁSSIA FRASSON CARVALHO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. KÁTIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. KÁTIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

2. PROF. DR. ISRAEL BENDIT

3. PROFA. DRA. FABÍOLA TRAINA

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 17/02/2017

AGRADECIMENTOS

À Dra. Katia Borgia Barbosa Pagnano, pela oportunidade, orientação, dedicação e capacidade de transmitir conhecimento de forma tão natural.

Ao Dr. Fernando F. Costa pelo uso do seu laboratório.

À Dulcinéia Martins de Albuquerque e à Regiane Aparecida Ferreira do laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da Unicamp, pelos auxílios sempre que necessários.

À Beatriz Felício Ribeiro, aluna de doutorado da Dra. Kátia, por ter me ensinado todas as técnicas, pela amizade e companheirismo durante todo este trabalho.

Aos funcionários do laboratório de diagnóstico de doenças oncohematológicas, em especial agradeço à Daiane, pela amizade.

Ao meu amado esposo Humberto, meu amor e gratidão em reconhecimento à compreensão e carinho que foram fundamentais para eu continuar tentando.

Aos meus queridos pais Elio e Maria José pelo amor incondicional, apoio constante e exemplo de vida que norteia minha existência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia (Ph), que resulta no gene de fusão BCR-ABL, cujo produto possui atividade tirosinoquinase aumentada. O tratamento da LMC é realizado com inibidores de tirosinoquinase (TKI). Apesar do aumento de sobrevida dos pacientes tratados com imatinibe, alguns pacientes apresentam resistência ou intolerância ao tratamento, sendo necessário a troca para um TKI de segunda geração. Os mecanismos de resistência são multifatoriais. Um trabalho anterior do nosso grupo identificou diversos genes e RNAs longos não codificantes diferencialmente expressos em pacientes responsivos e não responsivos ao dasatinibe, entre eles os genes TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1. O objetivo desse trabalho foi avaliar através de PCR em tempo real a expressão dos genes TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1 em pacientes com LMC ao diagnóstico, em pacientes tratados com dasatinibe ou imatinibe (resistentes e responsivos) e correlacionar com o escore de Sokal, sobrevida global, livre de progressão e livre de eventos. Dentre os achados mais significativos, o gene TARP foi hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação ao grupo controle e também em pacientes com LMC pós dasatinibe (responsivos). FASLG foi hiperexpresso no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico e nos pacientes com LMC pós dasatinibe (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes ao diagnóstico. TARP foi hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico e pós imatinibe em relação ao grupo controle e hiperexpresso nos pacientes com Sokal alto risco. FASLG apresentou hiperexpressão no grupo controle e nos pacientes com LMC pós imatinibe (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico. Não houve alterações significativas na SG, SLP e SLE dos pacientes tratados com imatinibe de acordo com a expressão dos genes TARP, AKT1, IFNG, ncTNFAIP8 e FASLG. Observou-se uma correlação positiva entre a expressão do BCR-ABL e o índice de Sokal. Esses achados sugerem que esses genes possam ter papel na fisiopatologia e em mecanismos de resistência na LMC, justificando futuros estudos.

Palavras-chaves: LMC, imatinibe, dasatinibe, TARP, AKT1, IFNG, ncTNFAIP8, FASLG

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by the presence of Philadelphia chromosome (Ph), which results in the BCR-ABL fusion gene, whose product has increased tyrosine kinase activity. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are used for CML treatment. Despite the increased survival of patients treated with imatinib, some patients develop resistance or treatment intolerance, requiring a switch to a second-generation TKI. Resistance mechanisms are multifactorial. A previous study from our group identified several coding and long non-coding RNAs differentially expressed in dasatinib-treated patients (responders and non-responders), including TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG and AKT1 genes. The aim of this study was to evaluate TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG and AKT1 gene expression by real-time PCR in patients with CML at diagnosis, after treatment with dasatinib or imatinib (resistant and responsive) and to correlate with Sokal score, BCR-ABL expression, overall, progression-free, and event-free survival. Among the most significant results, TARP showed overexpression in patients with CML at diagnosis in comparison with the control group and CML patients after dasatinib treatment (responsive). FASLG was overexpressed in the control group in comparison to CML patients at diagnosis and in patients after dasatinib treatment (responsive and resistant) in comparison to CML patients at diagnosis. TARP was overexpressed in CML patients at diagnosis and after imatinib treatment in comparison to the control group and in high Sokal risk score patients. FASLG was overexpressed in the control group and in CML patients treated with imatinib (responsive and resistant) in comparison to patients at diagnosis. There were no significant differences in OS, PFS and EFS in patients treated with imatinib according to the expression of TARP, AKT1, IFNG, ncTNFAIP8 and FASLG genes. There was a positive correlation between BCR-ABL expression and Sokal risk. These findings suggest a role of those genes in CML physiopathology and mechanisms of TKI resistance, justifying new studies in this field.

Keywords: CML, imatinib, dasatinib, TARP, AKT1, IFNG, ncTNFAIP8, FASLG

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da translocação que dá origem ao cromossomo Filadélfia. O gene ABL presente no cromossomo 9 e 22 sofrem uma translocação formando o gene híbrido BCR-ABL. Druker, B. J. CML. Blood, v. 112 (13), 2008 28

Figura 2. Esquemática simplificada das principais vias de sinalização desreguladas pela atividade da proteína BCR-ABL ¹⁷..... 30

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do inibidor da tirosinaquinase Imatinib (IM). Fonte: Figura adaptada de Druker, B.J. et.al,2008. 33

Figura 4. Diagrama de Venn mostrando transcritos diferencialmente expressos por 3 diferentes comparações de amostras de pacientes com LMC. Genes codificadores de proteínas foram identificados através do Whole Human Genome G4112F Microarray. Os grupos 1 a 3 correspondem às comparações feitas com as amostras dos pacientes indicadas abaixo dos números. O gene TARP foi identificado no grupo 1 e *AKT1*, *IFNG* e *FASLG* no grupo 3. Adaptado de Silveira et al, Hematology 2014..... 40

Figura 5. Diagrama de Venn mostrando transcritos diferencialmente expressos por 3 diferentes comparações de amostras de pacientes com LMC. RNAs longos não codificantes de proteínas foram identificados através de oligoarray customizado. Os grupos 1 a 3 correspondem às comparações feitas com as amostras dos pacientes. O gene *ncTNFAIP8* foi identificado no grupo 2. Adaptado de Silveira et al, Hematology 2014. 40

Figura 6. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com dasatinibe. O painel superior mostra 5 genes codificantes de proteínas e o painel inferior 2 RNAs longos não codificantes que estavam diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de respondedores e não respondedores. Cada linha representa um gene e cada coluna representa uma amostra de paciente. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da media do gene de todas

as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da media dos genes em todas as amostras. A seta indica o gene *TARP*, selecionado para o presente trabalho. Adaptado de Silveira et al, Hematology, 2014.

..... 41

Figura 7. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao dasatinibe. O painel representa 97 lncRNAs que foram diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e amostras pós-tratamento de não responsivos a terapia com dasatinibe após 1 ano. Cada linha representa um gene e cada coluna uma amostra de paciente, com sua identificação. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da media do gene de todas as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da media dos genes em todas as amostras. A seta indica o gene *TARP*, selecionado para o presente trabalho. Adaptado de Silveira et al, Hematology, 2014..... 42

Figura 8. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe. O painel mostra a expressão de 268 proteínas codificantes. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da media do gene de todas as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da media dos genes em todas as amostras. Os genes *AKT1*, *IFNG* e *FASLG* foram identificados dentre os hiperexpressos nas amostras pós-tratamento de pacientes não responsivos. Fonte: Silveira et al, Hematology, 2014..... 43

Figura 9. Análise da eficiência de amplificação dos iniciadores *TARP*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8*, *AKT1*, *FASLG* e *IFNG*. 55

Figura 10. Perfil de expressão do *TARP* em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico.

Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 62

Figura 11. Perfil de expressão do *TARP* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 63

Figura 12. Perfil de expressão do gene *TARP* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 64

Figura 13. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 65

Figura 14. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 66

Figura 15. Perfil de expressão do gene *AKT1* de acordo com Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 67

Figura 16. Perfil de expressão do *IFNG* em doadores saudáveis (controle) vs. pacientes com LMC ao diagnóstico vs. pacientes com LMC tratados com imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 68

Figura 17. Perfil de expressão do *IFNG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe.

Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 69

Figura 18. Perfil de expressão do gene *IFNG* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 70

Figura 19. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 71

Figura 20. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 72

Figura 21. Perfil de expressão do gene *ncTNFAIP8* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 73

Figura 22. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 74

Figura 23. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 75

Figura 24. Perfil de expressão do gene <i>TNFAIP8</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	76
Figura 25. Perfil de expressão do <i>FASLG</i> em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.....	77
Figura 26. Perfil de expressão do <i>FASLG</i> em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.....	78
Figura 27. Perfil de expressão do gene <i>FASLG</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	79
Figura 28. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TARP</i>	80
Figura 29. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TARP</i>	80
Figura 30. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TARP</i>	81
Figura 31. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>AKT1</i>	81
Figura 32. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>AKT1</i>	82

Figura 33. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>AKT1</i>	82
Figura 34. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>IFNG</i>	83
Figura 35. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>IFNG</i>	83
Figura 36. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>IFNG</i>	84
Figura 37. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>ncTNFAIP8</i>	84
Figura 38. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>ncTNFAIP8</i>	85
Figura 39. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>ncTNFAIP8</i>	85
Figura 40. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TNFAIP8</i>	86
Figura 41. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TNFAIP8</i>	86
Figura 42. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TNFAIP8</i>	87
Figura 43. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>FASLG</i>	87

Figura 44. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>FASLG</i>	88
Figura 45. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>FASLG</i>	88
Figura 46. Perfil de expressão do <i>TARP</i> em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	94
Figura 47. Perfil de expressão do <i>TARP</i> em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	95
Figura 48. Perfil de expressão do <i>AKT1</i> em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	96
Figura 49. Perfil de expressão do <i>AKT1</i> em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	97
Figura 50. Perfil de expressão do IFNG em doadores saudáveis (controle) vs. pacientes com LMC ao diagnóstico vs. pacientes com LMC pós dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.	98

Figura 51. Perfil de expressão do *IFNG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 99

Figura 52. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 100

Figura 53. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo..... 101

Figura 54. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 102

Figura 55. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo..... 103

Figura 56. Perfil de expressão do *FASLG* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo. 104

Figura 57. Perfil de expressão do *FASLG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao

dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de classificação da fase acelerada e crise blástica de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e European Leukemia Net (ELN) ^{5,6,7,8, 9}	26
Tabela 2. Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular ³³	35
Tabela 3. Definições de respostas ao TKI em primeira linha de acordo com os critérios da European Leukemia Net 2013 ³⁸	36
Tabela 4. Definições de respostas ao TKI de segunda linha após falha ao imatinibe de acordo com os critérios da European Leukemia Net ³⁸	37
Tabela 5. Substratos do <i>AKT</i> e Efeitos ⁸⁶	46
Tabela 6. Iniciadores utilizados para análise do perfil de expressão gênica em pacientes com LMC. A concentração definida para os iniciadores foi de 150 nM.	53
Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico (n=31)	58
Tabela 8. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC responsivos ao imatinibe (n=32)	59
Tabela 9. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC resistentes ao imatinibe (n=26)	60
Tabela 10. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico (n=09)	89
Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC responsivos ao dasatinibe (n=24)	91

Tabela 12. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC resistentes ao dasatinibe (n=14).....	92
Tabela 13. Mutações no domínio quinásico BCR-ABL	93
Tabela 14. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC ao diagnóstico	124
Tabela 15. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em leucócitos totais de pacientes responsivos ao imatinibe	125
Tabela 16. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em leucócitos totais de pacientes resistentes ao imatinibe	126
Tabela 17. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico.	127
Tabela 18. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em células mononucleares de pacientes responsivos ao dasatinibe	127
Tabela 19. Expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>TNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em células mononucleares de pacientes resistentes ao dasatinibe	128
Tabela 20. Correlações BCR-ABL com expressão genica ao diagnóstico–Pearson	128
Tabela 21. Correlações Escore de Sokal e expressão gênica – Pearson	128
Tabela 22. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC ao diagnóstico	129
Tabela 23. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC responsivos ao imatinibe	131

Tabela 24. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC resistentes ao imatinibe 133

Tabela 25. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico 135

Tabela 26. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC responsivos ao dasatinibe 136

Tabela 27. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC resistentes ao dasatinibe 138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – adenosina trifosfato

CB – crise blástica

cDNA – DNA complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

Ct – cycle threshold

DEPC – dicarbonato de dietila

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FA – fase acelerada

FC – Fase Crônica

HSC – células-tronco hematopoiéticas

IM – Imatinibe

LMC – leucemia mieloide crônica

OMS – Organização Mundial da Saúde

Ph – cromossomo Filadélfia

PI3K – do inglês, phosphatidylinositol-3 kinase

P-loop – alça do fosfato

RCC – resposta citogenética completa

RCE – rebordo costal esquerdo

RCM – resposta citogenética maior

RCP – resposta citogenética parcial

RHC – resposta hematológica completa

RM – resposta molecular

RMC – resposta molecular completa

RMM – resposta molecular maior

ROS – espécies reativas de oxigênio

RQ-PCR – PCR quantitativo em tempo real

SG – sobrevida global

SLE – sobrevida livre de eventos

SLP – sobrevida livre de progressão

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

TK – tirosina quinase

TKIs – inibidores de tirosina quinase

TMO – transplante de medula óssea

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Leucemia Mieloide Crônica (LMC).....	25
1.2 Patogênese da LMC	28
1.3 Diagnóstico Laboratorial da LMC.....	31
1.4 Tratamento e monitoramento da LMC	31
1.5 Mecanismos de resistência ao tratamento.....	38
2. OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos	48
3. PACIENTES E MÉTODOS	49
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	49
3.2 Pacientes e controles.....	49
3.3 Monitoramento do tratamento.....	50
3.4 PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) para avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i> em pacientes com LMC e controles	50
3.4.1 Coleta das amostras	50
3.4.2 Separação de células mononucleares e leucócitos totais do sangue periférico	50
3.4.3 Extração de RNA.....	51
3.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)	51
3.4.5 Desenho dos primers para avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i>	52
3.4.6 Padronização da concentração dos iniciadores	53
3.4.7 Eficiência da reação	53
3.4.8 PCR Quantitativo em tempo real (RQ-PCR) para avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i>	56
3.5 Análise Estatística	57
4. RESULTADOS	58
4.1 Pacientes com LMC tratados com imatinibe.....	58
4.1.1 Características dos pacientes	58

4.2 Avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i> em pacientes com LMC e doadores normais.....	62
4.2.1 Perfil de expressão do gene <i>TARP</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC tratados com imatinibe.....	62
4.2.2 Perfil de expressão do gene <i>TARP</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico.....	63
4.2.3 Perfil de expressão do gene <i>AKT1</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC dos pacientes	64
4.2.4 Perfil de expressão do gene <i>AKT1</i> de acordo com Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico	66
4.2.5 Perfil expressão do gene <i>IFNG</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC.....	67
4.2.6 Perfil de expressão do gene <i>IFNG</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico	69
4.2.7 Perfil de expressão do gene <i>ncTNFAIP8</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC	70
4.2.8 Perfil de expressão do gene <i>ncTNFAIP8</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico.....	72
4.2.9 Perfil de expressão do gene <i>TNFAIP8</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC.....	73
4.2.10 Perfil de expressão do gene <i>TNFAIP8</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico.....	75
4.2.11 Perfil de expressão do gene <i>FASLG</i> em leucócitos totais de pacientes com LMC.....	76
4.2.12 Perfil de expressão do gene <i>FASLG</i> de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico.....	78
4.3 Análises de sobrevividas em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i>	79
4.4 Pacientes com LMC tratados com dasatinibe.....	89
4.4.1 Características dos pacientes	89
4.4.2 Análise de mutações do domínio quinásico do BCR-ABL.....	93
4.5 Avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>ncTNFAIP8</i> , <i>IFNG</i> , <i>FASLG</i> e <i>AKT1</i> em pacientes com LMC ao diagnóstico, tratados com dasatinibe e em doadores normais	93

4.5.1 Perfil de expressão do gene <i>TARP</i> em células mononucleares de pacientes com LMC tratados com dasatinibe.....	93
4.5.2 Perfil de expressão do gene <i>AKT1</i> em células mononucleares de pacientes com LMC	95
4.5.3 Perfil de expressão do gene <i>IFNG</i> em células mononucleares de pacientes com LMC	97
4.5.4 Perfil de expressão do gene <i>ncTNFAIP8</i> em células mononucleares de pacientes com LMC	99
4.5.5 Perfil de expressão do gene <i>TNFAIP8</i> em células mononucleares de pacientes com LMC	101
4.5.6 Análise Perfil de expressão do gene <i>FASLG</i> em células mononucleares de pacientes com LMC.....	103
5. DISCUSSÃO	106
6. CONCLUSÕES	110
6.1. Avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em pacientes tratados com dasatinibe:.....	110
6.2. Avaliação da expressão dos genes <i>TARP</i> , <i>AKT1</i> , <i>IFNG</i> , <i>ncTNFAIP8</i> e <i>FASLG</i> em pacientes tratados com imatinibe:.....	110
6.3. Análise de sobrevivência:.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
8. APÊNDICES	124
9. ANEXOS	139

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Mieloide Crônica (LMC)

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma proliferação de células mieloides granulocíticas, que mantêm sua capacidade de diferenciação. A doença é de origem clonal e surge através de uma anomalia das células indiferenciadas precursoras (stem-cell) da medula óssea¹.

A LMC incide na sexta década de vida, predominando no sexo masculino e anualmente um a dois casos novos são diagnosticados em cada 100.000 habitantes no mundo¹.

Acredita-se que a causa primária da LMC seja o aumento de células indiferenciadas comprometidas com a granulocitopoese e esse aumento estaria associado à falha na resposta dessas células jovens aos fatores estimuladores e inibidores da granulocitogênese².

A doença evolui de forma lenta, mas progressiva. O diagnóstico é feito, em média, 12 meses após a doença já ter se instalado, referindo os pacientes fraqueza, esplenomegalia, raramente aumento dos gânglios, leucocitose com desvio à esquerda até mieloblastos. A maioria dos casos é diagnosticada na fase crônica da doença. Queixas de febre e hemorragias são infrequentes, mas a hepatomegalia já está presente de forma variável em muitos casos⁹⁷.

Outras vezes, o diagnóstico é um achado de laboratório, quando a leucocitose é discreta e os pacientes são assintomáticos. As características de evolução crônica da LMC costumam persistir por tempo médio de 3-5 anos. Quando não tratada, a doença evolui para uma fase de agravamento e termina por se transformar numa forma de leucemia aguda (crise blástica)^{3,4}.

São descritas três fases da LMC:

- Fase crônica (FC): apresenta leucocitose com desvio à esquerda até mieloblastos ou promieloblastos e esplenomegalia. Os sintomas mais frequentes são: fadiga, perda de peso e desconforto abdominal. Alguns pacientes podem ser assintomáticos quando a doença é detectada acidentalmente através de outros exames de rotina. Se não tratada evolui para a fase acelerada (FA) e/ou para a crise blástica (CB) no período de aproximadamente cinco anos.

- Fase acelerada (FA): corresponde à fase em que a doença se torna refratária à terapêutica e ocorre aumento de precursores granulocíticos no sangue e

na medula óssea, aumento de blastos e basófilos. A hepatomegalia e esplenomegalia, que haviam desaparecido com a terapêutica apropriada na fase crônica, voltam a se instalar, intensificando-se a trombocitopenia ou a trombocitose. Essa fase precede a fase de agudização, que surge após um período de tempo variável.

- Fase de agudização ou crise blástica (CB): a anemia se intensifica, havendo quadro hemorrágico variável em gravidade, febre e queda do estado geral. Os blastos aparecem em grande número no sangue e na medula óssea. A evolução costuma ser rapidamente fatal, com pouco sucesso terapêutico. A fase blástica pode ser mieloide ou linfoide.

As classificações mais utilizadas na definição das fases avançadas da LMC são as da European Leukemia Net (ELN) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), descritas na tabela abaixo:

Tabela 1. Critérios de classificação da fase acelerada e crise blástica de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e European Leukemia Net (ELN)^{5,6,7,8, 9}

Fase Acelerada	
Critérios ELN	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos no sangue periférico ou medula 15-29%, ou blastos mais promielócitos no sangue ou medula maior que 30%, com Blastos < 30% • Basófilos no sangue ≥ 20% • Trombocitopenia persistente (<100 a 10⁹ / L) sem relação com terapia • Anormalidades cromossômicas clonais em células Ph + (CCA / Ph +), da via principal, que surgem durante o tratamento

<p>Critérios da OMS (2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos no sangue periférico ou da medula 10-19% • Basófilos no sangue periférico $\geq 20\%$ • Trombocitopenia persistente ($<100 \times 10^9 / L$) sem relação com terapia • Trombocitose ($>1000 \times 10^9 / L$) que não responde à terapia • Aumento do tamanho do baço e aumento da contagem de glóbulos brancos que não responde à terapia • Qualquer nova anormalidade cromossômica clonal em células Ph + que ocorre durante a terapia
<p>Critérios da OMS (2016)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Além dos critérios da OMS 2008, foram acrescentados: <ul style="list-style-type: none"> ○ Anormalidades cromossômicas clonais adicionais nas células Ph + ao diagnóstico, que incluem anormalidades da "via principal ou <i>major route</i>" (segundo Ph, trissomia 8, isocromossoma 17q, trissomia 19), cariótipo complexo ou anormalidades de 3q26.2 ○ Critérios "provisórios" de resposta aos TKI: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Incapacidade de obter uma resposta hematológica completa ao primeiro TKI ▪ Qualquer indicação de resistência hematológicas, citogenéticas ou moleculares a dois TKIs ▪ Ocorrência de duas ou mais mutações no BCR-ABL1 durante a terapia com TKI
<p>Fase Blástica</p>	
<p>Critérios ELN</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos no sangue periférico ou medula $\geq 30\%$ • Proliferação blástica extramedular, além do baço
<p>Critérios da OMS (2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos no sangue periférico ou medula $\geq 20\%$ • Proliferação blástica extramedular, além do baço • Grandes focos ou <i>clusters</i> de blastos na biópsia de medula óssea

Critérios da OMS (2016)	<ul style="list-style-type: none"> Além dos critérios da OMS 2008, foi acrescentada a detecção de linfoblastos no sangue periférico ou na medula óssea
-------------------------	---

1.2 Patogênese da LMC

A anomalia cromossômica denominada translocação t(9;22) está presente em mais de 95% de casos de LMC. A translocação entre o braço longo do cromossomo 9 e 22 respectivamente, resulta na t(9;22) (q34.1;q11.21), dando origem a um cromossomo 9 atípico, denominado 9q+ e a um cromossomo 22 também atípico, 22q-, denominado cromossomo Filadélfia ou Ph ^{9,10} (Figura 1).

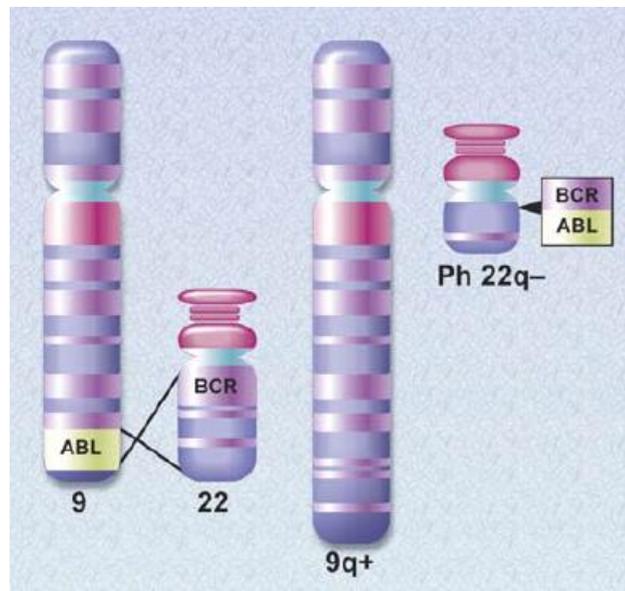


Figura 1. Esquema da translocação que dá origem ao cromossomo Filadélfia. O gene ABL presente no cromossomo 9 e 22 sofrem uma translocação formando o gene híbrido BCR-ABL. Druker, B. J. CML. Blood, v. 112 (13), 2008.

O local de quebra (breakpoint) do cromossomo 22 na LMC ocorre na região denominada *breakpoint cluster region* ou bcr. Essa translocação causa um rearranjo genético típico da LMC com Ph positivo. A translocação do gene *c-abl* para o cromossomo 22 alterado (22q- ou cromossomo Ph) determina o aparecimento da oncoproteína BCR-ABL com atividade tirosinoquinase com 210 KD, diferente do produto resultante de um gene normal ⁴. Mais raramente pode haver outros pontos de quebra do BCR-ABL originando proteínas de 190 e 230 KD ¹¹. Acredita-se que a LMC seja iniciada pela atividade dessa oncoproteína BCR-ABL em células-tronco

hematopoiéticas (HSCs) auto-renováveis e resulta em uma fase crônica (FC) da doença com uma grande quantidade de células da linhagem granulocítica.

O aparecimento de mutações com a presença do BCR-ABL leva à progressão da LMC da FC para crise blástica (CB) com predomínio de células blásticas mieloides e/ou linfoides ¹².

A proteína que expressa a atividade desse gene está envolvida com funções celulares importantes, como o ciclo celular e os sinais para apoptose.

O rearranjo ABL-BCR, que se forma com a quebra no cromossomo 9, não parece atuar na patogenia da doença, mas o rearranjo BCR-ABL, do cromossomo Ph está ligado ao aumento da proliferação granulocítica da LMC ^{13,14}.

O cromossomo Ph não é encontrado numa pequena porcentagem de casos, mas nesses casos o rearranjo BCR-ABL pode ser demonstrado por FISH ou pela técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

A atividade da proteína BCR-ABL altera, direta ou indiretamente, a regulação fisiológica de inúmeras proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização celular, promovendo alterações nas vias de transdução de sinal que influenciam o crescimento e a sobrevivência das células hematopoiéticas ¹⁵.

As vias de sinalização: RAS (“Rat Sarcoma”), a via PI3K/AKT (“Phosphatidylinositol-3 kinase”) e a via JAK/STAT (“Janus kinase-signal transducer and activator of transcription”) que regulam a proliferação celular e a apoptose, apresentam moléculas alvo da proteína BCR-ABL ¹⁶. Estas vias de sinalização são ativadas por sinais extracelulares (citocinas, fatores de crescimento e fatores de stress celular) que, através da integração de sinais regulam a sobrevivência, crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas normais (Figura 2).

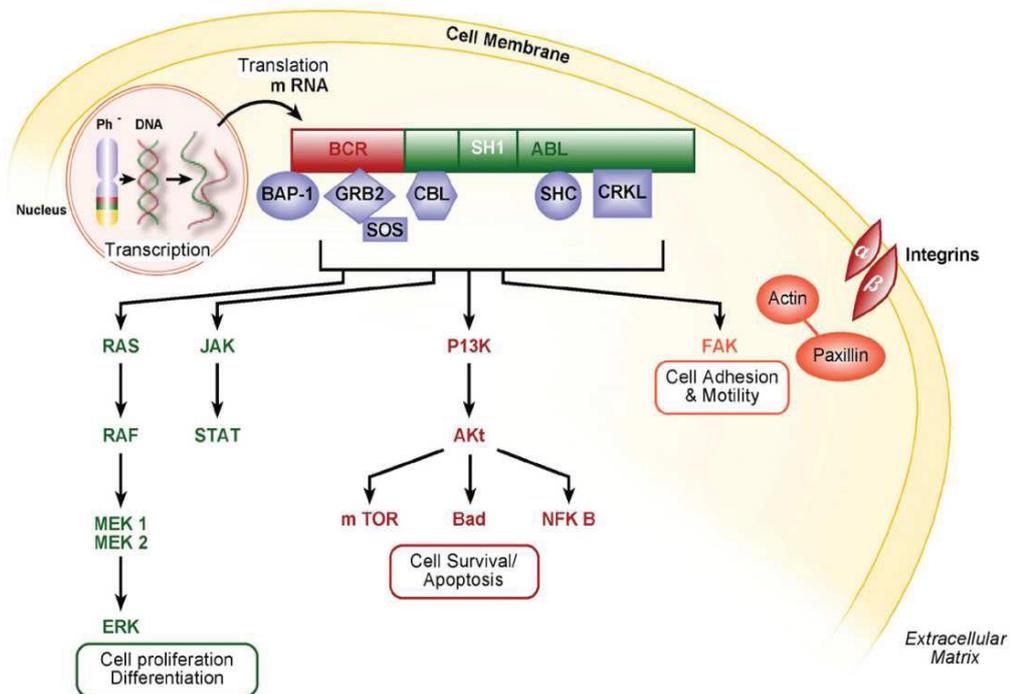


Figura 2. Esquemática simplificada das principais vias de sinalização desreguladas pela atividade da proteína BCR-ABL ¹⁷.

A falta de regulação nestas vias resultará em um aumento da proliferação indiferenciadas das células da linhagem mieloide, perda da capacidade de adesão destas células no parênquima medular, bem como em um defeito no mecanismo apoptótico ¹⁸.

A via de sinalização RAS está envolvida na proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. A ativação de RAS em células leucêmicas ativa a cascata das MAP quinases, o que resulta na desregulação de fatores de transcrição envolvidos na proliferação, crescimento e diferenciação celular ¹⁹.

A via de sinalização PI3K/AKT está envolvida no processo mitótico bem como na sobrevivência celular. A PI3K em células normais, é ativada pela formação de complexos mediados por proteínas adaptadoras ativadas (gab2), que são um substrato direto para a proteína BCR-ABL. Na LMC a ativação desta via de sinalização resulta na inibição de moléculas envolvidas na sinalização pró-apoptótica e no aumento da ativação de proteínas envolvidas na via de sinalização antiapoptótica ¹⁹.

Na via de sinalização PI3K/AKT, os fosfolípidos formados por ação da PI3K irão agir sobre AKT. A AKT regula os mecanismos antiapoptóticos fosforilando diretamente proteínas de morte celular ²⁰.

A via de sinalização JAK/STAT é regulada através da ativação de receptores de citocinas ou fatores de crescimento. As proteínas STATs, uma vez ativadas, migram para o núcleo, onde induzem alterações no padrão de expressão gênica. Esta via de sinalização está envolvida na regulação da proliferação, divisão e sobrevivência das células hematopoiéticas, tendo sido demonstrado em patologias mieloides, que as proteínas da família STAT estão envolvidas principalmente na inibição da apoptose e na suspensão da maturação celular ²¹.

1.3 Diagnóstico Laboratorial da LMC

A LMC apresenta as características laboratoriais descritas a seguir. O hemograma mostra leucocitose variável, com desvio à esquerda até mieloblastos, anemia discreta ou acentuada, dependendo do tempo de evolução da doença. Geralmente, as plaquetas estão em número normal ou aumentado. Dado importante é a presença de basofilia e eosinofilia. O mielograma revela hiper celularidade acentuada, com aumento dos precursores granulocíticos ²².

A biópsia de medula óssea revela hiper celularidade e em alguns casos fibrose medular. A hiper celularidade medular é devida à proliferação exagerada dos precursores granulocíticos. Há também aumento de megacariócitos ²².

A confirmação do diagnóstico se dá com a comprovação da translocação (9;22) no cariótipo e/ou rearranjo BCR-ABL por técnicas moleculares. Alterações citogenéticas adicionais podem ocorrer na fase inicial ou na transformação para fases avançadas ²³.

As alterações da “*major route*” ou via principal (trissomia do 8, 9, 19 ou 21, isocromossomo 17, duplo Ph) estão associadas com pior evolução clínica ²³. Na nova classificação da OMS 2016 foram incluídas como um dos critérios de fase acelerada da doença ⁹.

O rearranjo BCR-ABL é detectado pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR). A RT-PCR qualitativa é importante na determinação do ponto de quebra do rearranjo para o posterior acompanhamento do tratamento pela técnica de RT-PCR quantitativo (RQ-PCR).

1.4 Tratamento e monitoramento da LMC

Desde a descoberta da LMC, têm sido desenvolvidas várias estratégias terapêuticas de eficácia crescente ²⁴. O primeiro tratamento utilizado na LMC foi a

solução de Fowler, muito utilizada no século XIX cujo princípio ativo era o arsênico. O primeiro composto sintético com atividade na LMC foi o Bussulfan (BU), um agente alquilante, tendo sido depois introduzida a Hidroxiuréia (HU), com a vantagem de originar menos efeitos secundários que o Bussulfan e a Citarabina, outro fármaco com atividade significativa na LMC. As terapêuticas disponíveis inicialmente para o tratamento da LMC tinham apenas um papel paliativo: induziam RHC, aliviavam alguns sintomas, mas não se observava RCC. Portanto, estes fármacos não alteravam o curso natural da progressão da doença e proporcionavam apenas benefícios clínicos aos pacientes ^{16,25}.

O transplante alogênico de medula óssea (TMO) continua a ser o tratamento mais efetivo na cura da LMC, embora vários esforços continuem a ser feitos para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Porém, o transplante precedido de quimioterapia ou radioterapia é uma intervenção invasiva com muitos riscos associados, e está disponível somente para uma pequena percentagem de pacientes ^{26,27}.

Nos anos 80, o Interferon alpha (IFN α), uma glicoproteína de origem biológica, com propriedades antiproliferativas e antivirais, foi introduzido no tratamento da LMC. O IFN α , foi o primeiro agente terapêutico a induzir resposta citogenética em grande parte dos doentes com LMC submetidos a este tratamento. Portanto, foi possível aumentar a sobrevida dos pacientes. No entanto, uma elevada percentagem de pacientes demonstrou intolerância ao tratamento com IFN α devido aos seus elevados níveis de toxicidade ^{28,29}.

A introdução na prática clínica do primeiro inibidor da atividade da tirosinoquinase (TKI) da oncoproteína BCR/ABL, mesilato de imatinibe (Glivec®), desenvolvido por Druker et al. ³⁰ em colaboração com Cibageigy (Novartis) permitiu o controle dos casos de LMC nos quais o tratamento com interferon alfa (IFN- α), hidroxiureia e transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (TCTH) havia falhado.

O mesilato de imatinibe (IM), originalmente designado por “signal transduction inhibitor 571” (STI571), uma 2-fenil-amino-pirimidina, surgiu como o composto mais potente para inibir a oncoproteína BCR-ABL.

O IM impede a ligação do ATP no domínio tirosinoquinase da proteína BCR-ABL. Ao impedir que a molécula de ATP se ligue, estabiliza a proteína na sua conformação inativa (Figura 3). Assim, a tirosinoquinase perde a capacidade de se

autofosforilar, bem como de fosforilar os seus substratos, o que determina um bloqueio na ativação das vias de transdução de sinal alvo da oncoproteína BCR-ABL. Ou seja, o IM inibe a proliferação e induz as células BCR-ABL positivas à apoptose ^{31,32}.

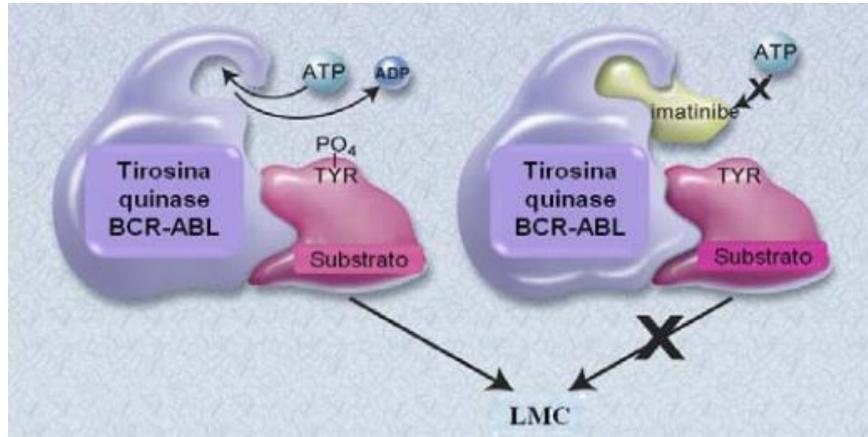


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do inibidor da tirosinaquinase Imatinibe (IM). Fonte: Figura adaptada de Druker, B.J. et.al,2008.

Em 2002, o IM foi aprovado para o tratamento da LMC para pacientes que não respondiam ou eram intolerantes ao Interferon- α (IFN α) ³⁰.

O estudo IRIS (“International Randomized Study of Interferon Versus STI571”), foi um estudo randomizado que comparou o tratamento em primeira linha com IFN α associado à citarabina versus IM. Como resultado, 76,2% dos pacientes no grupo do IM atingiram resposta citogenética maior, contra os 14,5% do grupo tratado com IFN α e Citarabina ³³. Os resultados obtidos demonstraram elevada eficácia do IM, sendo o fármaco introduzido na prática clínica e estabelecido como primeira linha de tratamento na LMC ^{33,34}.

O advento do imatinibe revolucionou o tratamento da LMC, aumentando a sobrevida dos pacientes ³⁵. No entanto, cerca de 1/3 dos pacientes tratados com imatinibe descontinua o tratamento a longo prazo por resistência, intolerância ou outros motivos ³⁶. No caso de resistência ou intolerância é necessário a mudança terapêutica para um inibidor de segunda geração (nilotinibe ou dasatinibe) ou transplante de medula óssea se não houver resposta ao inibidor de segunda geração ^{33,37}.

Embora os resultados obtidos com o IM tenham sido bastante promissores, a existência de pacientes resistentes a este fármaco tornou-se evidente logo depois

da introdução do mesmo na prática clínica e com isto surgiu a necessidade da mudança de terapia para estes pacientes com outros TKIs (dasatinibe ou nilotinibe) ou TMO após falha ao segundo TKI ³⁸.

Os TKIs de segunda geração, aprovados para o tratamento da LMC no Brasil, são o nilotinibe (AMN107, desenvolvido pela Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland - Tassigna®) e o dasatinibe (BMS-354825, desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb, Princeton, USA - Sprycel®).

O nilotinibe é semelhante ao imatinibe e foi desenvolvido para melhorar as características de ligação à BCR-ABL. Este fármaco é entre 10 a 30 vezes mais potente quando comparado com o IM em relação à redução da autofosforilação da proteína e proliferação celular. A sua eficácia foi comprovada contra a maioria das mutações resistentes ao IM, com exceção da mutação T315I ^{36,39}. As mutações do domínio quinase do *BCR-ABL* menos sensíveis ao nilotinibe são: Y253H, E255K/V, e F359V/C ³⁹.

O dasatinibe é um potente inibidor da tirosina quinase BCR-ABL e mostrou ser eficaz em pacientes com LMC resistentes ou intolerantes ao imatinibe em todas as fases da LMC, principalmente na fase crônica. Ele não possui relações estruturais com o imatinibe e é 325 vezes mais potente do que o IM ^{36,39}.

O dasatinibe apresentou efeito na maior parte das mutações do BCR-ABL, com exceção da mutação T315I ^{40,41} que também é resistente a outros inibidores (imatinibe, nilotinibe, bosutinibe). As mutações menos sensíveis ao dasatinibe são: F317L e V299L ^{37,1}. Outros inibidores de tirosinoquinase, como o ponatinibe vêm sendo desenvolvidos e estes apresentam atividade contra a mutação T315I ⁴².

O TMO alogênico é indicado aos pacientes que apresentam a mutação T315I, após falha ao imatinibe ou após a falha com os TKIs de segunda geração, mas nem todos os pacientes podem ser transplantados, pela dificuldade de doadores ou por apresentarem outras comorbidades ³⁸.

O dasatinibe ou nilotinibe em terceira linha de tratamento são opções terapêuticas para pacientes que não podem ser transplantados ^{43,44}.

A eficácia do tratamento da LMC é monitorada pela obtenção de respostas ao longo do tratamento: resposta hematológica completa (RHC), resposta citogenética completa (RCC) e resposta molecular maior (RMM). A RHC é definida pela normalização de valores de leucócitos no sangue periférico, sem células imaturas e ausência de esplenomegalia; a RCC é definida pela ausência de metáfases Ph-

positivas. A RMM é definida pela queda de 3 log na quantificação dos transcritos BCR-ABL através da técnica de PCR quantitativo, atualmente reportada de acordo com a escala internacional (EI). Na tabela 2 encontram-se as definições de resposta conforme os Critérios da European LeukemiaNet 2013 (ELN) ³³.

Se o paciente apresentar uma resposta ótima, apresentará uma sobrevida bem próxima à da população normal, indicando que a terapia deve ser mantida. Por outro lado, a resposta de alerta, indica que há uma pequena chance de alcançar a resposta ótima. A falha ao tratamento indica que o paciente não irá adquirir a resposta ótima e deve ser reavaliado quanto à sua terapia ^{33,38}.

Os critérios de resposta para o tratamento de primeira e segunda linha estão descritos nas tabelas 3 e 4 ³⁸.

Tabela 2. Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular ³³

Tipo de resposta	Definições
Hematológica	
Completa	Contagem de Leucócitos < 10 x 10 ⁹ /L Plaquetas < 450 x 10 ⁹ /L Basófilos < 5% Ausência de células imaturas Ausência de esplenomegalia
Parcial	Persistência de células imaturas Plaquetas abaixo de 50% dos níveis do pré-tratamento, mas acima de 450 x 10 ⁹ /L
Citogenética	
Completa	Ausência completa de células Ph+
Parcial	1% a 35% de células Ph+
Menor	36% a 65% de células Ph+
Mínima	66% a 95% de células Ph+
Molecular	
Completa	Transcritos BCR-ABL indetectáveis pelo PCR em tempo real quantitativo e/ou Nested PCR em duas amostras consecutivas de sangue de qualidade adequada

Maior (RM ^{3.0*})	Relação BCR-ABL/ABL (ou outro gene controle) \leq 0,1% na escala internacional (IS)
RM ^{4.0*}	Relação BCR-ABL/ABL (ou outro gene controle) \leq 0,01% (IS)
RM ^{4.5*}	Relação BCR-ABL/ABL (ou outro gene controle) \leq 0,0032% IS

Tabela 3. Definições de respostas ao TKI em primeira linha de acordo com os critérios da European Leukemia Net 2013 ³⁸

	Ótima	Alerta	Falha
Baseline	Não aplicável	- Sokal alto risco, e/ou - Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+, (<i>major route</i>)	Não aplicável
3 meses	- BCR-ABL1 \leq 10% e/ou - Ph+ \leq 35%	- BCR-ABL1 >10%, e/ou - Ph+ 36%-95%	- Falha em alcançar RHC, e/ou - Ph+ > 95%
6 meses	- BCR-ABL1 <1% e/ou - Ph+ 0	- BCR-ABL1 1-10% e/ou - Ph+ 1-35%	- BCR-ABL1 >10% e/ou Ph+ > 35%
12 meses	- BCR-ABL1 \leq 0,1%	- BCR-ABL1 0,1-1%	- BCR-ABL1 >1% e/ou Ph+ > 0
Após 12 meses, a qualquer momento	- BCR-ABL1 \leq 0,1%	- Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph- (-7, ou 7q-)	- Perda de RHC - Perda de RCC - Perda confirmada de RMM - Mutações do BCR-ABL - Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+

Tabela 4. Definições de respostas ao TKI de segunda linha após falha ao imatinibe de acordo com os critérios da European Leukemia Net ³⁸

	Ótima	Alerta	Falha
Baseline	Não aplicável	- Não ter obtido RHC ou ter perdido RHC com o imatinibe, ou - Falha de resposta citogenética com o 1º TKI, ou - Alto risco	Não aplicável
3 meses	- BCR-ABL1 ≤10%, e/ou - Ph+ < 65%	- BCR-ABL1 >10%, e/ou - Ph+ 65-95%	- Não alcançar RHC, ou - Ph+ > 95%, ou - Novas mutações
6 meses	- BCR-ABL1 ≤10%, e/ou - Ph+ <35%	- Ph+ 35-65%	- BCR-ABL1 >10%, e/ou - Ph+ > 65%, e/ou - Novas mutações
12 meses	- BCR-ABL1 <1%, e/ou - Ph+ 0	- BCR-ABL1 1-10% e/ou - Ph+ 1-35%	- BCR-ABL1 >10%, e/ou - Ph+ >35%, e/ou - Novas mutações
Depois dos 12 meses a qualquer momento	- BCR-ABL1 ≤0,1%	- Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph- (-7 ou 7q-), ou - BCR-ABL1 > 0,1%	- Perda de RHC - Perda de RCC ou RCP - Novas mutações - Perda confirmada de RMM - Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+

1.5 Mecanismos de resistência ao tratamento

Embora os resultados obtidos com o IM tenham sido bastante promissores, a existência de pacientes resistentes a este fármaco tornou-se evidente logo depois da introdução do mesmo na prática clínica. Em doentes na fase avançada da doença que receberam IM, as respostas hematológicas e citogenética foram de curta duração⁴⁵.

A resistência ao IM pode ser dividida em dois tipos: primária, também designada por refratária, na qual uma pequena percentagem de pacientes é resistente ao fármaco desde o início do tratamento e secundária, também conhecida por resistência adquirida, na qual após uma resposta inicial ao tratamento o paciente adquire resistência ao fármaco depois de exposto ao mesmo durante um período de tempo⁴⁵.

Acredita-se que a resistência ao IM, bem como a outros TKIs pode ser consequência da interação de múltiplos fatores como a adesão ao tratamento, biodisponibilidade do fármaco, farmacodinâmica, amplificação gênica, ativação de vias de sinalização oncogênica alternativas, presença de mutações do BCR-ABL ou combinações dos mesmos^{46, 45, 47, 48}.

O aparecimento de anormalidades cromossômicas nas adicionais na nas células Ph+, denominada de evolução clonal (EV), está relacionado com perda das respostas hematológicas e citogenéticas, uma sobrevida global (SG) prejudicada e evolução para a crise blástica^{49, 50}.

Nem todas as células leucêmicas são erradicadas com o uso de TKIs, motivo pelo qual o tratamento deve ser mantido continuamente na maior parte dos pacientes^{51, 52}.

O desenvolvimento de mutações no domínio da tirosina quinase da proteína BCR-ABL tem papel fundamental na aquisição de resistência aos TKIs na LMC. Existem mais de 100 mutações descritas em mais de 50 aminoácidos, dependendo da definição de resistência, da metodologia de detecção, da fase da doença, entre outros fatores^{53, 54, 55, 56}, com vários graus de relevância clínica.

A primeira mutação descrita em pacientes e que impede efetivamente a ligação do IM à proteína BCR-ABL, foi a mutação T315I, que resulta na substituição de uma treonina por uma isoleucina no aminoácido 315. Essa mutação é resistente ao imatinibe, dasatinibe e bosutinibe, sendo sensível ao ponatinib^{57, 58}.

As mutações resultam, portanto, da substituição de aminoácidos que impedem a ligação normal do IM ao local de ligação do ATP. Várias mutações têm sido caracterizadas no gene ABL, no local de ligação do ATP, na alça de ativação da quinase (A-loop), na alça P (P-loop), domínio SH2, hélice C e na região terminal C ⁵⁹.

As mutações T315I, M244V, G250E, E255K, Y253H, F359V são mais frequentemente encontradas na resistência ao IM ^{60,61}. As mutações Y253H, E255K/V, e F359V/C ao nilotinibe e as mutações F317L e V299L ao dasatinibe ^{62,63}. Na população latino-americana as mutações mais frequentemente observadas na resistência ao imatinibe foram T315I, F359V, M244V, G250E, E255K, M351T, Y253H, E255V, E355G, Q252H, F317L, F359C ⁶⁴.

Outros TKIs como o ponatinibe estão sendo desenvolvidos para o uso em LMC na resistência pela mutação T315I ⁶⁵.

Além da presença de mutações do BCR-ABL, outros mecanismos de resistência têm sido investigados, como mutações em outros genes além do BCR-ABL: *ASXL1*, *TET2*, *RUNX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, e *TP53* na FC e *RUNX1*, *ASXL1*, *IKZF1*, *WT1*, *TET2*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *TP53*, *CDKN2A*, *RB1*, e *GATA-2* em pacientes em fases avançadas ⁶⁶.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs estudar alguns genes detectados em um estudo anterior do nosso grupo, candidatos a genes envolvidos na resistência ao dasatinibe. O estudo de SILVEIRA et al., avaliou o perfil de expressão gênica de pacientes com LMC pré e pós tratamento com dasatinibe através da análise de microarranjos ⁶⁷. Os pacientes foram caracterizados como responsivos (R) e não responsivos (NR) ao dasatinibe. Foram usadas duas plataformas de microarranjos: uma exônica comercial e uma intrônica customizada. Na plataforma exônica foram comparados três subgrupos de amostras: pré-R, pré-NR e pós-NR, com a finalidade de identificar transcritos potencialmente ligados à resistência ao dasatinibe (Figura 4). A partir dos dados obtidos pela plataforma customizada intrônica, o número total de RNAs não codificadores intrônicos diferencialmente expressos e exclusivos entre as amostras, foram de 2 para o primeiro grupo comparativo (entre amostras pré-tratamento), de 97 genes entre amostras pré-R e pós-NR e de 83 genes para as amostras dos pacientes não responsivos (Figura 5).

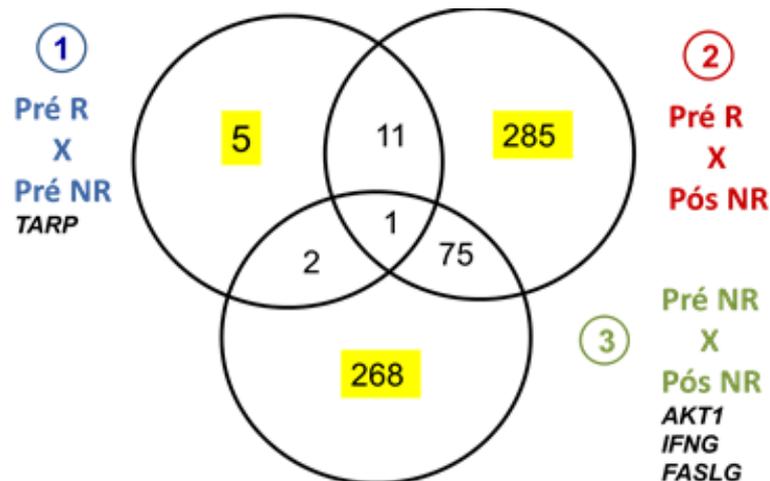


Figura 4. Diagrama de Venn mostrando transcritos diferencialmente expressos por 3 diferentes comparações de amostras de pacientes com LMC. Genes codificadores de proteínas foram identificados através do *Whole Human Genome G4112F Microarray*. Os grupos 1 a 3 correspondem às comparações feitas com as amostras dos pacientes indicadas abaixo dos números. O gene *TARP* foi identificado no grupo 1 e *AKT1*, *IFNG* e *FASLG* no grupo 3. Adaptado de Silveira et al, Hematology 2014.

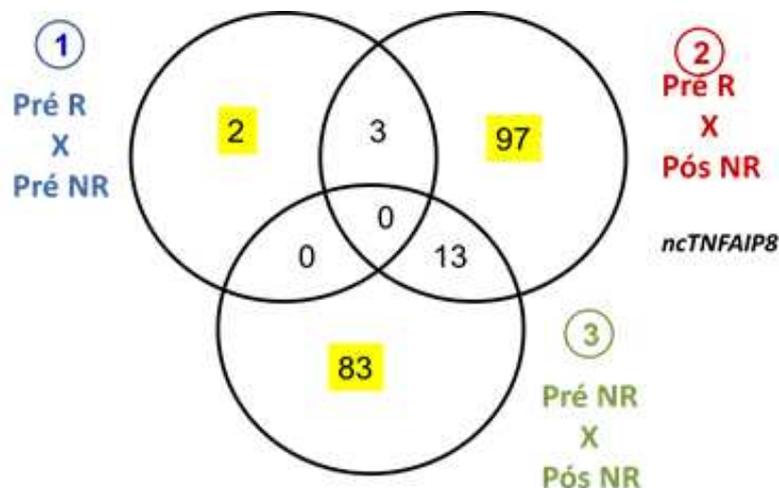


Figura 5. Diagrama de Venn mostrando transcritos diferencialmente expressos por 3 diferentes comparações de amostras de pacientes com LMC. RNAs longos não codificantes de proteínas foram identificados através de *oligoarray* customizado. Os grupos 1 a 3 correspondem às comparações feitas com as amostras dos pacientes. O gene *ncTNFAIP8* foi identificado no grupo 2. Adaptado de Silveira et al, Hematology 2014.

O gene *TARP* foi selecionado do grupo descrito na Figura 4, pois apresentou hiperexpressão nos casos responsivos ao dasatinibe e foi hipoexpresso nos casos resistentes, conforme demonstrado no *heat map* (Figura 6). O gene *ncTNFAIP8* foi selecionado do grupo pré-responsivo e pós-não responsivo, figura 5. Esse gene foi hiperexpresso nos responsivos (amostras pré tratamento) e hipoexpresso no grupo não responsivo (amostras pós tratamento) (Figura 7).

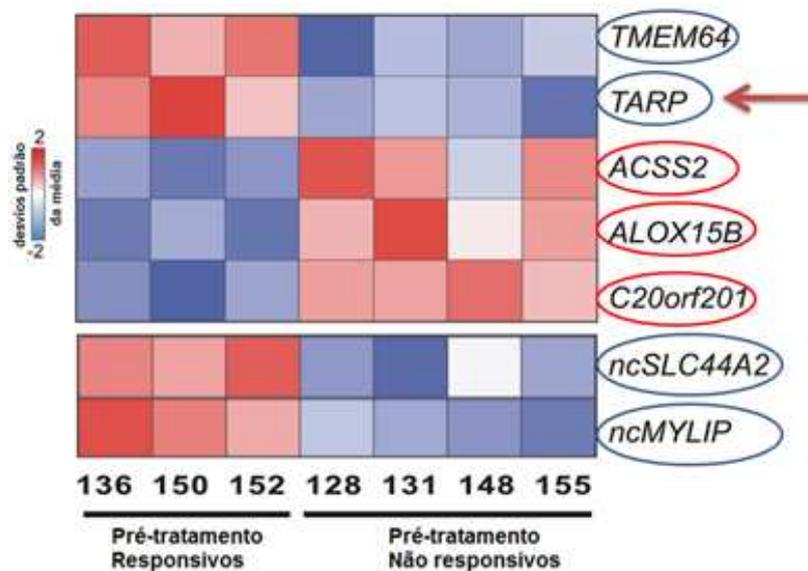


Figura 6. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC em pré-tratamento com dasatinibe. O painel superior mostra 5 genes codificantes de proteínas e o painel inferior 2 RNAs longos não codificantes que estavam diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de respondedores e não respondedores. Cada linha representa um gene e cada coluna representa uma amostra de paciente. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da média do gene de todas as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da média dos genes em todas as amostras. A seta indica o gene *TARP*, selecionado para o presente trabalho. Adaptado de Silveira et al, Hematology, 2014.

O heat map (Figura 7) mostra o padrão de expressão dos 285 genes codificadores de proteína, sendo 58 com expressão aumentada e 227 com expressão diminuída nos NR. Já o heat map do lado esquerdo mostra os 97 RNAs não codificadores diferencialmente expressos, sendo 61 com expressão aumentada e 36 com expressão diminuída nos NR.

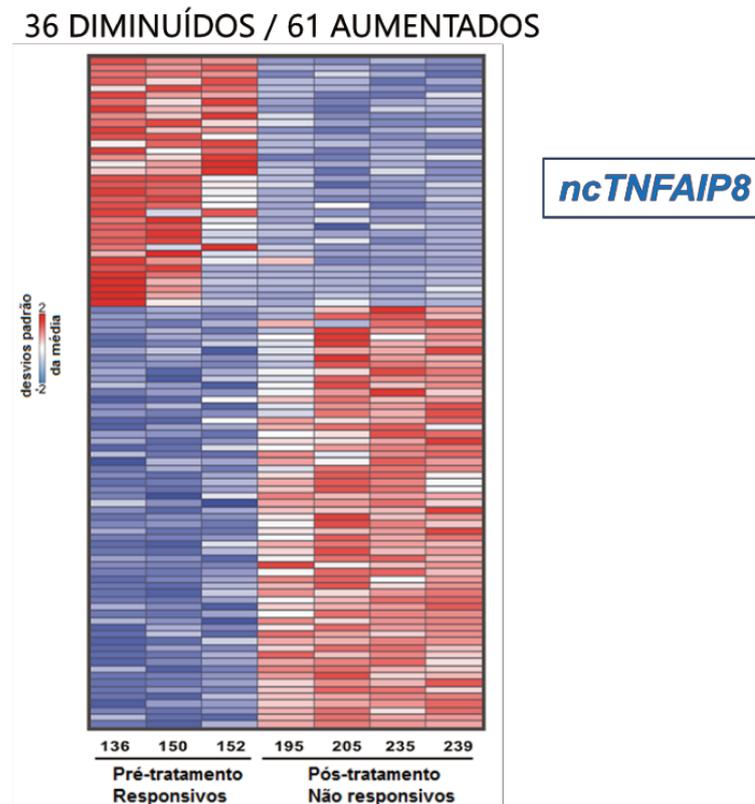


Figura 7. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC responsivos (pré-tratamento) e não responsivos (pós-tratamento) ao dasatinibe. O painel representa 97 lncRNAs que foram diferencialmente expressos entre amostras pré-tratamento de pacientes responsivos e amostras pós-tratamento de não responsivos a terapia com dasatinibe após 1 ano. Cada linha representa um gene e cada coluna uma amostra de paciente, com sua identificação. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da média do gene de todas as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da média dos genes em todas as amostras. A seta indica o gene *TARP*, selecionado para o presente trabalho. Adaptado de Silveira et al, Hematology, 2014

Os genes *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* foram identificados como hipoexpressos nos casos não responsivos (pré-tratamento) e hiperexpresso nos casos não responsivos pós-tratamento.

O heat map (Figura 8) mostra os dados de intensidade dos 268 genes codificadores de proteína diferencialmente expressos, sendo a grande maioria com expressão diminuída nos NR. Podemos observar que o mesmo padrão de intensidade

foi observado para os RNAs não codificadores; 60 dos 83 transcritos apresentaram expressão diminuída. Isto sugere uma possível ocorrência de supressão de vários processos biológicos pelo dasatinibe.

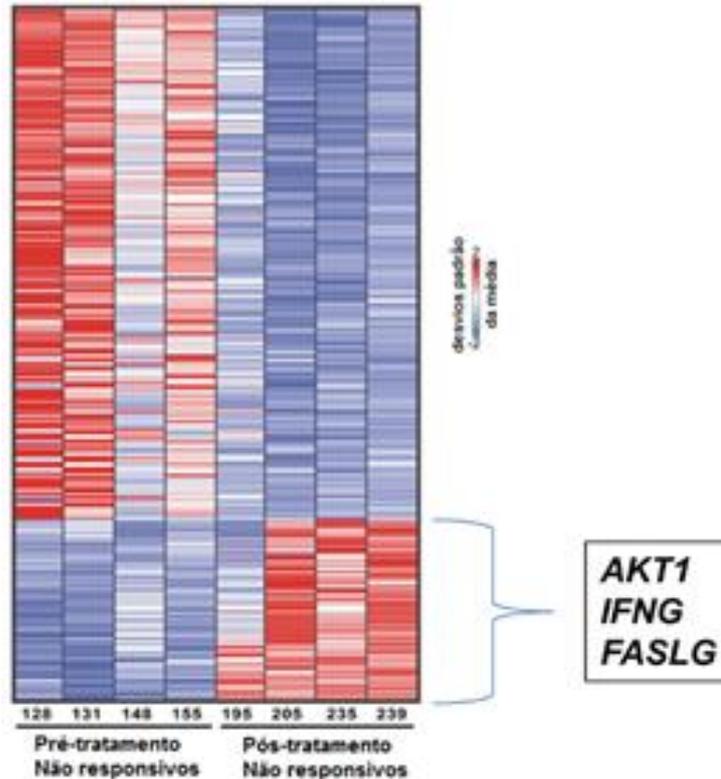


Figura 8. Análise de expressão gênica supervisionada de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LMC pré e pós-tratamento de pacientes não responsivos ao dasatinibe. O painel mostra a expressão de 268 proteínas codificantes. As cores vermelha e azul indicam os níveis de expressão, respectivamente, acima e abaixo da média do gene de todas as amostras; a intensidade da cor é proporcional ao número de desvios padrão acima ou abaixo da média dos genes em todas as amostras. Os genes *AKT1*, *IFNG* e *FASLG* foram identificados dentre os hiperexpressos nas amostras pós-tratamento de pacientes não responsivos. Fonte: Silveira et al, Hematology, 2014.

Pela diferença de expressão entre casos resistentes e responsivos ao dasatinibe, selecionamos para o presente estudo os genes *TARP*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* e o gene não codificante *ncTNFAIP8*, descritos a seguir.

TARP

O gene *TARP* está localizado no cromossomo 7 é um gene codificante de proteínas. Está expresso em células epiteliais da próstata, na hiperplasia prostática benigna e no câncer de próstata e também nos cânceres de mama. Os andrógenos são responsáveis pela sua regulação ⁶⁸. Uma das funções do *TARP* pode ser o controle de ROS (reactive oxygen species), que incluem peróxido de hidrogênio, superóxido, radicais hidroxila e óxido nítrico. Um desequilíbrio intracelular de ROS pode causar várias doenças, incluindo câncer e inflamação ⁶⁹. Outros estudos apontam uma expressão alterada da *TARP* em células de câncer de próstata além de algumas linhagens de câncer de mama, sendo observado um aumento na sua expressão na transformação oncogênica ⁷⁰. Alguns estudos mostram que *TARP* é hiperexpresso em câncer de próstata na perda de sua dependência a andrógenos, indicando comportamento tumoral mais agressivo ^{71,72}.

ncTNFAIP8 e TNFAIP8

Os RNAs longos não codificantes (lncRNA) são moléculas de RNA que tem função como transcrito primário e não se encaixam em classes conhecidas de pequenos RNAs ou em classes de RNAs estruturais ⁷³. Os lncRNAs são transcritos de regiões intrônicas, mas não são traduzidos em proteínas. Os lncRNAs podem estar envolvidos em carcinogênese e progressão de tumores através de uma variedade de mecanismos, já que estas moléculas podem exercer funções reguladoras essenciais sobre a proliferação celular, apoptose, ou metástase ^{74,75}.

O gene *ncTNFAIP8* (fator de necrose tumoral induzida por proteína alfa 8), localizado no cromossomo 5, é um regulador da apoptose e tem importante função na proliferação, invasão, metástase e progressão de tumores malignos em câncer endometrial e câncer gástrico e está relacionado com a patogênese dessas neoplasias ^{76,77}.

A hiperexpressão do *TNFAIP8* é observada em vários cânceres, como no câncer de mama que apresentou proliferação, migração celular e crescimento tumoral. Pouco se conhece sobre o papel do *TNFAIP8* na carcinogênese, sabe-se que apresenta uma função inibidora da apoptose mediada por caspases. Por ser um membro da família de inibidores da caspase-8 e caspase-3, a hiperexpressão em células cancerígenas é capaz de inibir a apoptose induzida pelo TNF enquanto que sua hipoexpressão aumenta a morte celular ⁷⁸. Segundo o estudo de LING CHEN, et

al ⁷⁹, demonstrou que a expressão de *TNFAIP8* estava relacionada à ocorrência, desenvolvimento e metástase de adenocarcinoma gástrico, e indicou pior prognóstico destes pacientes. *TNFAIP8* pode, portanto, ser um fator prognóstico para o adenocarcinoma gástrico.

IFNG, FASLG e AKT1

Ainda na categoria de genes identificados na categoria de morte celular, na avaliação dos grupos pré-R e pós-NR do estudo de Silveira et al. foram identificados os genes *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*.

IFNG (Interferon gamma), está localizado no cromossomo 12, possui funções antiproliferativas e antitumorais. Estudos demonstraram que polimorfismos no *IFNG* estão relacionados ao risco de muitos tipos de cânceres, embora a associação entre o polimorfismo IFN-g p874T/A e o risco de leucemia permaneça controversa ⁸⁰.

Os genes *IFNG* e *FASLG* foram avaliados em um estudo que buscou investigar vários polimorfismos e sua associação com o resultado do tratamento da LMC com imatinibe. Um dos resultados interessantes foi que a resposta ao imatinibe foi associada com um único polimorfismo do gene *IFNG*, envolvido na via de sinalização de IFN. Dependendo da variabilidade genética do indivíduo para expressar o *IFNG*, a expansão e a proliferação de células tronco hematopoéticas pode variar, afetando o tratamento com imatinibe ⁸¹.

FASLG é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral, localizado no cromossomo 1. *FASLG* induz apoptose quando ligado ao *FAS* e está envolvido na regulação das respostas imunes das células T, sendo expresso em vários tipos de cânceres humanos.

Embora na LMC o mecanismo de proliferação celular e vias apoptóticas sejam complexos, o *FASLG* pode ter uma influência sobre a progressão da doença e merece uma investigação mais aprofundada ^{82,83}.

AKT1 (Serine/threonine kinase 1), está localizado no cromossomo 14. Essas proteínas estão envolvidas na sinalização intracelular, na regulação de várias funções celulares, como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e transformação maligna ⁸⁴.

AKT foi caracterizada após o isolamento de dois genes denominados *AKT1* e *AKT2*, homólogos do oncogene viral *v-akt*, que é responsável por um tipo de leucemia no camundongo. Posteriormente, dois estudos revelaram que *v-akt* e seus

homólogos humanos codificam uma proteína quinase com semelhança a proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA), e então foi chamada PKB. Três membros da família PKB foram identificados, chamados PKB α (Akt1), PKB β (Akt2), e PKB γ (Akt3) ⁸⁵.

A proteína AKT modula a função de vários substratos envolvidos na regulação da sobrevivência, progressão e crescimento celular, como descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Substratos do AKT e Efeitos ⁸⁶

Substratos do Akt	Efeito
Sobrevida	
Bad	Supressão da atividade pró-apoptótica de Bab
CREB	Aumento da transcrição dos genes de sobrevivência regulados por CREB
Família Forkhead (Fkhr, Fkhr1, Afx)	Exclusão nuclear e inibição da transcrição dos genes pró-apoptóticos
IKK	Indução da atividade transcricional de NF- κ B - ativação de genes de sobrevivência
Procaspase-9	Supressão da apoptose induzida por Caspase-9
Mdm2	Entrada nuclear de Mdm2 - inibição do processo regulado por p53
Crescimento celular e proliferação	
GSK3	Inibição da atividade catalítica GSK3
p21, p27	Exclusão nuclear, prevenção da atividade antiproliferativa
mTOR/FRAP	Modulação da translação do RNAm
TSC2	Modulação da atividade mTOR

A via fosfatidilinositol 3-quinase/AKT é um fator de sinalização envolvido no desenvolvimento de muitos cânceres como as leucemias mieloides. Na leucemia mieloide aguda (LMA), AKT apresenta uma atividade aumentada favorecendo o aparecimento, crescimento e progressão das células leucêmicas ⁸⁷.

Um estudo mostrou cinco linhagens de células positivas ao cromossomo Filadélfia como modelo de resistência ao imatinibe e a inibição do AKT1 levou à apoptose nas linhagens celulares resistentes ao imatinibe ⁸⁸.

A desregulação da via fosfatidilinositol 3-quinase/AKT está associada com o desenvolvimento e a progressão do câncer de mama, assim o PI3K/AKT é um marcador neste tipo de câncer ⁸⁹.

No estudo de Silveira et al, na qual os genes de interesse do nosso estudo foram identificados por análise de microarranjos, a avaliação da expressão foi feita em um grupo pequeno de pacientes com LMC em amostras pré e pós tratamento tratados com dasatinibe. No presente estudo optamos por avaliar a expressão dos genes descritos em um grupo maior de pacientes e relacionar a expressão ao prognóstico, contribuindo desta forma na identificação de outros mecanismos de resistência e na fisiopatogenia da LMC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar a expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com LMC ao diagnóstico, após tratamento com imatinibe ou dasatinibe e em um grupo controle constituído por doadores saudáveis.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes responsivos e resistentes ao imatinibe, em pacientes com LMC recém diagnosticados e em doadores saudáveis.

- Avaliar e comparar a expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe, em pacientes com LMC recém diagnosticados e em doadores saudáveis

- Correlacionar a expressão dos genes estudados com índice de Sokal, expressão do BCR-ABL, sobrevida global, livre de eventos e livre de progressão.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP, segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97). Todos os pacientes envolvidos leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo os procedimentos da pesquisa; os desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade quanto aos dados confidenciais, e a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida, o nome e telefone dos pesquisadores para esclarecer eventuais dúvidas, bem como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa. Foi solicitada dispensa do TCLE somente para os pacientes participantes do projeto (CAAE: 09668112.9.0000.5404, parecer 236.752, de 21/03/2013), que autorizaram por escrito o armazenamento de material biológico para futuras pesquisas e autorizaram a realização de outros estudos com as amostras armazenadas no biorepositório aprovado (Anexo 1).

3.2 Pacientes e controles

O presente estudo é transversal, foram analisados pacientes com LMC, maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, em qualquer fase da fase da doença, tratados no Hemocentro da UNICAMP com inibidores de tirosinoquinase. O diagnóstico de LMC foi realizado através da detecção do cromossomo Ph em cariótipo de medula óssea e/ou da presença de transcritos BCR-ABL através da técnica de RT-PCR qualitativo para BCR-ABL. Os pacientes foram classificados em fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e crise blástica (CB) de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde 2008 (OMS) ¹. Foram avaliados pacientes ao diagnóstico e após tratamento com TKI.

O grupo controle foi constituído por doadores saudáveis, com idade maior de 18 anos e de ambos os sexos. Os doadores do grupo controle foram recrutados no Hemocentro da Unicamp e na Faculdade Max Planck de Indaiatuba-SP.

Foram considerados responsivos pacientes que obtiveram resposta hematológica, citogenética completa e molecular maior com TKI. Foram considerados resistentes os pacientes que tiveram critério de falha de acordo com os critérios da ELN 2013 ³⁸ para TKI em primeira ou segunda linha.

3.3 Monitoramento do tratamento

O monitoramento do tratamento com TKIs foi realizado na rotina do Ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da Unicamp, segundo as recomendações do European LeukemiaNet ³³, através de hemograma, avaliação citogenética (pré-tratamento e aos 3, 6, 12 e 18 meses até obtenção de resposta citogenética completa confirmada) e avaliação molecular (pré-tratamento e a cada 3 meses) realizada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR). Foi realizada a pesquisa de mutações do BCR-ABL nos pacientes que apresentavam critérios de falha de tratamento. Todos os exames foram realizados nos laboratórios do Hemocentro da Unicamp.

3.4 PCR quantitativo em tempo real (RQ-PCR) para avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com LMC e controles

3.4.1 Coleta das amostras

Foram coletados 16 mL de sangue periférico em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para obtenção de células mononucleares e leucócitos totais. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e processadas em até 24 horas.

3.4.2 Separação de células mononucleares e leucócitos totais do sangue periférico

Foram separadas células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico e após tratamento com dasatinibe e foram separados leucócitos totais de doadores saudáveis e pacientes com LMC ao diagnóstico e após tratamento com imatinibe.

Em tubos do tipo Falcon foram adicionados 3mL de *Ficoll-PaqueTM Plus* (*GE Healthcare Bio-Science*), uma solução que auxilia na separação das células tendo como princípio a diferença de densidade celular entre granulócitos, eritrócitos e células mononucleares. Em seguida adicionou-se cuidadosamente 4 mL de sangue total e prosseguiu-se com centrifugação a 1800 rpm por 30 minutos a 18°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a camada de células transferida para novos tubos.

3.4.3 Extração de RNA

As amostras de sangue periférico em tubos contendo EDTA foram homogeneizadas, vertidas para tubo do tipo Falcon e centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do plasma, foi adicionada solução de lise (8 volumes de NH₄Cl 0,144M para cada volume de NH₄HCO₃ 0,01M) e os tubos foram agitados vigorosamente e incubados em gelo por 15 minutos. Após, foram centrifugados a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Após retirada do sobrenadante e nova adição de solução de lise, os tubos foram centrifugados novamente a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de um botão de leucócitos livre de hemoglobina. O botão de leucócitos obtido foi ressuspensionado em 1mL de Trizol (*Invitrogen, Life Technologies*) e armazenado a -80°C até ser realizada a extração de RNA.

As amostras congeladas em Trizol foram mantidas por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir uma dissociação completa do complexo nucleoprotéico. Após adição de 200 µL de clorofórmio (CHCl₃), as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas a 13.500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase orgânica, sobrenadante transparente onde se encontra o RNA, foi retirada cuidadosamente e transferida para um novo tubo onde procedeu-se o isolamento do RNA com adição de 500 µL de isopropanol 100%, agitação dos tubos por inversão e centrifugação a 13500 rpm por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. Após a precipitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 75%. Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 11600 rpm por 5 minutos a 4°C. Procedeu-se com a ressuspensão do RNA em 20 a 50µL de H₂O tratada com diotilpirocarbonato (DEPC) e incubação a 55°C por 10 minutos.

Após o processo de extração o grau de pureza e a quantificação do RNA foram avaliados por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop (*NanoDrop Technologies*). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1,2%. As amostras íntegras apresentam duas subunidades ribossomais: 18S e 28S.

3.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA obtido foi tratado com o kit *DNase I Amplification Grade* (*Invitrogen, Life Technologies*) para remover qualquer DNA contaminante. Foi adicionado 1µL 10X *DNase I Reaction Buffer*, 1µL da enzima *DNase I, Amp Grade*, 1U/µL, um volume de

H₂O tratada com DEPC suficiente para perfazer 1 µg de RNA total em um volume final de 10 µL. Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg/µL de RNA total e o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription para 200 a 1000 reações (Applied Biosystems) para leucócitos totais e o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Life Technologies) para mononucleares conforme as instruções dos manuais. A reação foi mantida a 37° por 15 minutos e em seguida a DNase I foi inativada pela adição de 1 µL de EDTA 25mM em aquecimento a 65°C por 15 minutos.

Procedeu-se com a síntese de cDNA realizada com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Life Technologies). Às amostras tratadas com DNase I foram adicionados: 1 µL de primer iniciador do tipo oligo (dT)₂₀ 50 µM; 1 µL de *Anneling Buffer* e aquecidas a 65°C por 5 minutos. Em seguida foram colocadas em gelo por pelo menos 1 minuto. Foi adicionado 10 µL de 2X *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL da *SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme Mix* e as amostras foram novamente aquecidas a 55°C por 50 minutos e a 85°C por 5 minutos. O produto da reação foi quantificado por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA*).

3.4.5 Desenho dos primers para avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*

Os iniciadores para cada gene foram desenhados através do programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*) e do programa *Gene Runner* tendo como base as sequências depositadas no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os genes *ACTB* e *GAPDH* foram escolhidos como controles endógenos. Os iniciadores para regiões codificantes do gene foram desenhados, sempre que possível, em éxons diferentes. Os iniciadores para regiões não codificantes do gene (RNAs longos não codificantes) foram desenhados a partir da sequência da sonda utilizada no microarranjo que os identificou⁵⁸. Ambos foram desenhados de forma a apresentar um produto de amplificação entre 60 e 150pb, temperatura de anelamento em torno de 60°C, e um mínimo de formação de estruturas secundárias como hairpins e dímeros de primers. Além disso, as sequências escolhidas foram submetidas ao programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar homologia com o gene de interesse. Os iniciadores utilizados estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Iniciadores utilizados para análise do perfil de expressão gênica em pacientes com LMC. A concentração definida para os iniciadores foi de 150 nM.

Gene	Sequência dos iniciadores
<i>ACTB</i>	Foward: 5' - AGGCCAACCGCGAGAAG - 3' Reverse: 5' - ACAGCCTGGATAGCAACGTACA - 3'
<i>GAPDH</i>	Foward: 5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC - 3' Reverse: 5' - CCACTTGATTTTGGAGGGATCT- 3'
<i>AKT1</i>	Foward: 5' - CCGAGGTGCTGGAGGACAA - 3' Reverse: 5' - GCTTCTCATGGTCCTGGTTGTAG - 3'
<i>TARP</i>	Foward: 5' - CTCCAATAAAGACAGATGTCATCACA - 3' Reverse: 5' - CAGTAGTGTATCATTTCATCTTTTGA - 3'
<i>IFNG</i>	Foward: 5' - CTGACTAATTATTCGGTAACTGACTT - 3' Reverse: 5' - ACTGGGATGCTCTTCGACCTC - 3'
<i>FASLG</i>	Foward: 5' - GAGAGTCTACCAGCCAGATGCAC - 3' Reverse: 5' - TTGAGTTGGACTTGCCTGTAAAT - 3'
<i>ncTNFAIP8</i>	Foward: 5' - TCACACCAGGGAGAGCTTGC - 3' Reverse: 5' - CACAGCAGAGAAGAGCCCAAC - 3'
<i>TNFAIP8</i>	Foward: 5' - CAAGGAAGTGGCCACAGATGT - 3' Reverse: 5' - TGTGTCGTCTATTAAGGTGGTGG - 3'

3.4.6 Padronização da concentração dos iniciadores

A concentração dos iniciadores foi otimizada de maneira a utilizar a mínima concentração que permitisse a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. Para isso, utilizando uma amostra na concentração final de 10 ng, foram realizadas reações contendo cada um dos pares de iniciadores (sense e anti-sense) nas concentrações finais de 70nM, 150nM e 300nM. A concentração de 150nM foi definida como ideal para os iniciadores avaliados, ou seja, nessa concentração o gene de interesse foi amplificado precocemente (menor valor de Ct – *Cycle Threshold*).

3.4.7 Eficiência da reação

A reação de PCR em tempo real deve ser confiável e reprodutiva. Sendo assim, são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. A eficiência de

amplificação foi avaliada utilizando a concentração de iniciador selecionada (150nM) e diluições seriadas de uma amostra. O valor obtido no *slope*, que é derivado da inclinação da curva, foi aplicado à fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, resultando em um valor próximo de 2, ou seja, a cada ciclo de amplificação o material genômico será duplicado e isso equivale a 100% de eficiência da reação. Na figura 9 estão as curvas de eficiência dos iniciadores utilizados neste estudo.

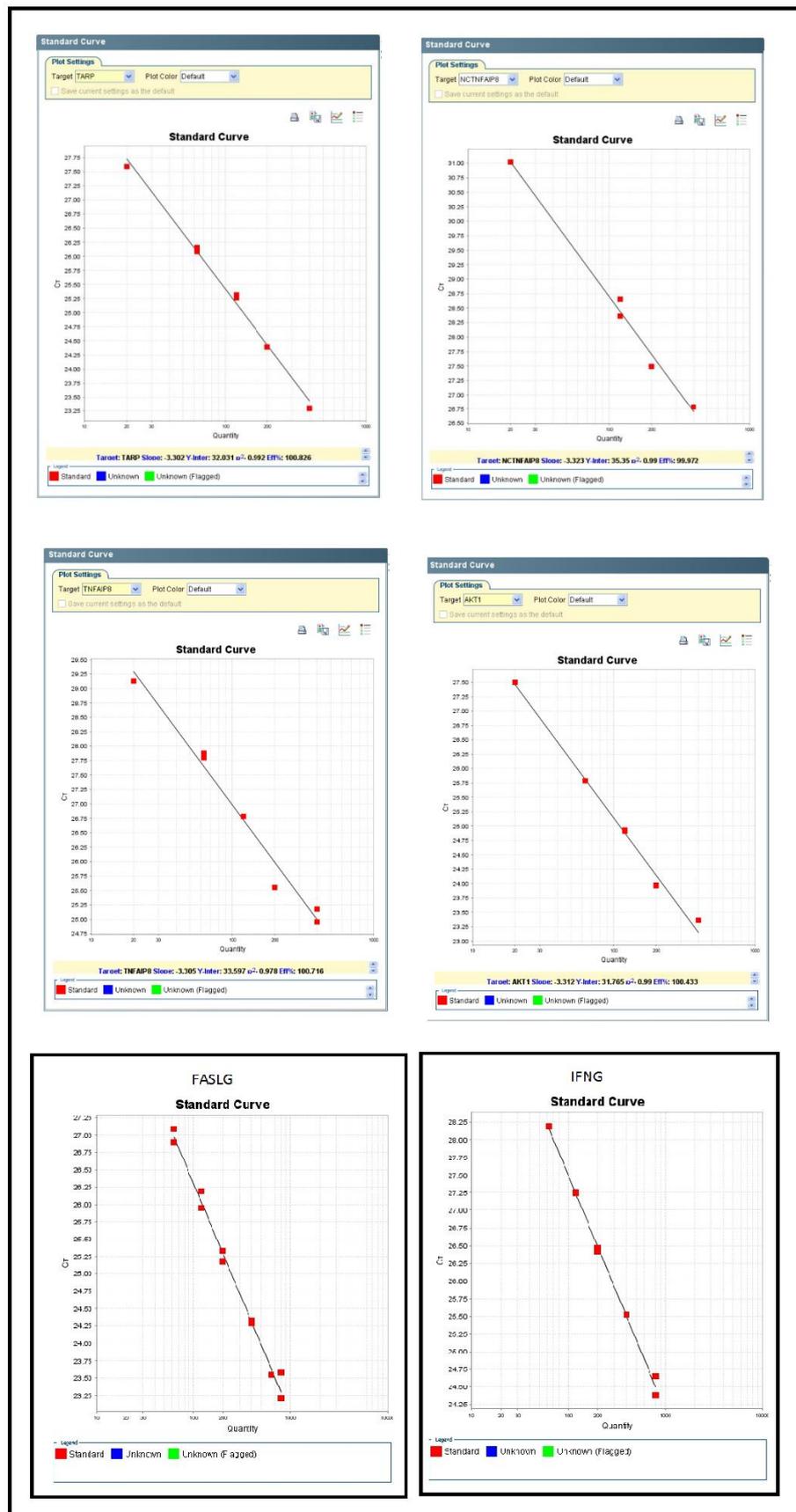


Figura 9. Análise da eficiência de amplificação dos iniciadores *TARP*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8*, *AKT1*, *FASLG* e *IFNG*.

3.4.8 PCR Quantitativo em tempo real (RQ-PCR) para avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*

As reações foram realizadas em duplicatas utilizando como sistema de detecção o reagente *SYBR™ Green PCR Master Mix®* (*Applied Biosystems*), que além de conter dNTP's, MgCl₂, tampão e Taq Ampli-Gold que são reagentes necessários para a PCR, contém o corante SYBR Green: uma molécula que emite maior quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla fita. Para cada gene analisado foram utilizados iniciadores específicos. Os genes *ACTB* e o *GAPDH* foram utilizados como controles endógenos e uma amostra de cDNA, doador saudável, foi utilizada como amostra calibradora. Em todas as placas foram utilizados os dois genes endógenos e a mesma amostra calibradora.

A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento *StepOnePlus* (*Invitrogen, life Technologies*) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. Quanto maior a expressão de um determinado gene, mais precocemente ocorrerá a amplificação e conseqüentemente menor será o Ct.

Todas as amostras foram ensaiadas em um volume final de reação de 12 µL, sendo: 6 µL do reagente *SYBR™ Green PCR Master Mix*, 3 µL de mix de primer (150nM) e 3 µL de mix de amostra de cDNA (10ng/ µL de concentração final). Em todas as placas foram pipetados controles negativos (NTC), ou seja, para cada iniciador avaliado foram analisados poços contendo água estéril em substituição à amostra.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem da luz. O programa utilizado foi: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a curva de *Melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Em toda reação foi realizada a análise da T_m (temperatura de *melting*) que permite verificar se há um ou mais produtos da PCR (produtos inespecíficos ou formações como dímeros de primer) presentes em cada reação, devido a diferenças de T_m entre os produtos de PCR causadas pelo número e composição de bases de cada produto.

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão foram normalizados em relação aos genes endógenos (*ACTB* e *GAPDH*). Os valores de Ct de cada gene foram obtidos em duplicata, dessa forma, foram calculadas as médias aritméticas destas. Em seguida foi obtido o valor

de delta Ct (ΔCt), que consistiu na subtração do menor Ct de uma determinada amostra de um gene com os Cts das demais amostras desse mesmo gene. O próximo cálculo foi o valor de “Q”, que corresponde a $2^{\Delta Ct}$. Os valores de Q dos genes endógenos de cada amostra analisada foram submetidos ao programa geNorm⁶⁶, que calculou a média geométrica entre eles, valor este denominado de Fator de Normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra pelo fator de normalização da amostra. O valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

3.5 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva de todas as variáveis, por conseguinte, os testes bivariados inerentes a natureza de cada variável, ou seja, para as categóricas aplicou-se o χ^2 e o teste t para variáveis contínuas, quando dois grupos e ANOVA para três ou mais grupos.

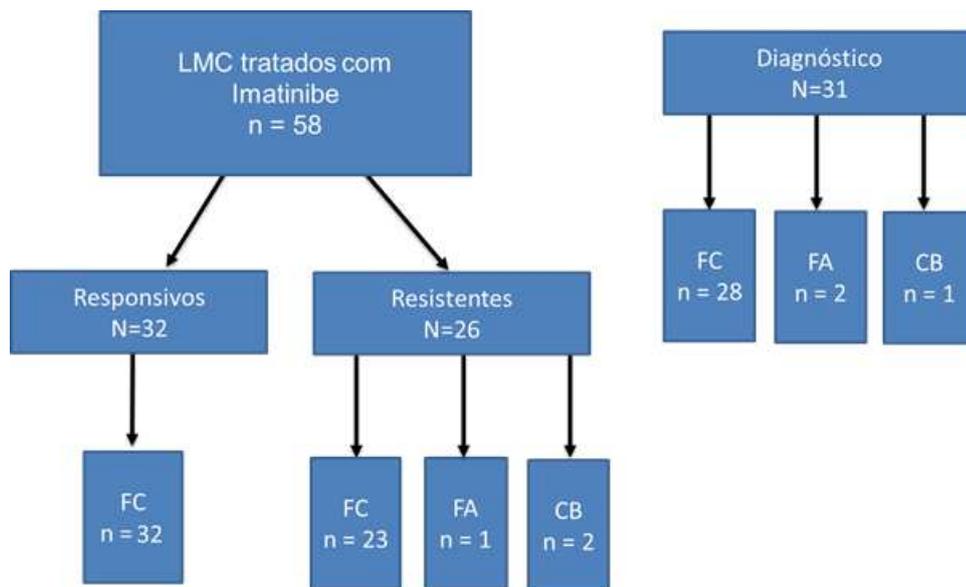
Para as análises de expressão gênica os dados de cada grupo foram comparados utilizando o teste ANOVA de *Kruskal-Wallis* comparando todos os pares de colunas quando três grupos foram analisados. As análises foram aplicadas usando o software estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0. O valor considerado significativo nos testes foi $p < 0,05$.

Análises de sobrevida: A SG foi calculada a partir da data do início do imatinibe até a última consulta ou data do óbito, sendo considerado como evento morte por qualquer razão. A SLP e a SLE foram calculadas também a partir da data do início do imatinibe até a data do evento ou última consulta. Os eventos considerados na SLP foram: progressão para FA, CB ou óbito. Os eventos considerados para SLE foram: perda de RHC, perda de RCC, progressão para fases avançadas, descontinuação do TKI por qualquer razão (toxicidade, resistência ou perda de seguimento), morte por qualquer razão ou última consulta. O método aplicado foi o *Kaplan-Meier* e o teste de *log-rank* para comparação das curvas, usando o software estatístico *SPSS (Statistical Package Social Sciences)*, version 21.0. Foi realizada a média da expressão de cada gene *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*. Valores inferiores à média foram considerados como expressão baixa e valores acima da média como expressão alta.

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes com LMC tratados com imatinibe

Foi extraído RNA de leucócitos totais de amostras de sangue periférico de 89 pacientes com LMC: 31 casos ao diagnóstico e 58 após tratamento com imatinibe (32 responsivos e 26 resistentes). Oitenta e três estavam em FC, três em FA e três em crise blástica na data da coleta das amostras.



4.1.1 Características dos pacientes

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico, responsivos e resistentes com LMC estão descritas nas tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico (n=31)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	50 (19-92)	
Gênero: masculino	20	64,5
Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+*	02/31	7

Esplenomegalia	5	16,1
Baço >10cm abaixo do RCE	5	16,1
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	149,9 (32,5 – 447,5)	
Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	466,7(100,0 – 1100,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	11,1 (6,5 – 14,4)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	4,25 (0 - 31,5)	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	3,17 (0 - 13,5)	
Tempo tratamento imatinibe (intervalo), meses	39 (3 – 78)	
Escore de Sokal		
Baixo	9	29
Intermediário	10	32
Alto	7	23
Não avaliado	5	16

*46XX,-3,+DEL(3)(P14),+DEL(3)(Q21); 46,XY,inv(3)(q21q26.1),t(9;22)(q34;q11)

RCE: rebordo costal esquerdo

Tabela 8. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC responsivos ao imatinibe (n=32)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	53(20 - 93)	
Gênero: masculino	16	50
Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+	0	
Esplenomegalia	0	
Baço >10cm abaixo do RCE	0	
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	5,3 (2,2 – 10,6)	

Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	210,7 (66,0 – 348,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	12,6 (9,4 – 16,0)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	0	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	0,77 (0 - 2,3)	
Tempo tratamento imatinibe (intervalo), meses	41 (8 – 68)	
Escore de Sokal		
Baixo	11	35
Intermediário	10	31
Alto	10	31
Não Avaliado	13	3

RCE: rebordo costal esquerdo

Tabela 9. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC resistentes ao imatinibe (n=26)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	48(21 - 75)	
Gênero: masculino	20	77
Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+*	5/26	19
Esplenomegalia	10	38
Baço >10cm abaixo do RCE	10	38
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	13,9 (1,9 – 122,7)	
Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	233,8	

	(13,0 – 938,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	12,5 (6,5 – 15,8)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	6,2 (0 - 69)	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	2,03 (0 - 14,0)	
Tempo tratamento imatinibe (intervalo), meses	33 (9 - 94)	
Escore de Sokal		
Baixo	6	23
Intermediário	7	27
Alto	8	31
Não Avaliado	5	19
Mutações do BCR-ABL		
Presença	1(T315I)	
Ausência	13	
Não avaliado	12	

*49,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),+17,+del(22)(q11)[03]/48,XY,t(9;22)(q34;q11),+17,+del(22)(q11)[17]. 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[05]/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+del(22)(q11) [04]/46,XY[11]. 48,XY,+8,+9[09]/46,XY[11]. 46,XY,-8,t(9;13;22)(q34;q11),-13,+2mar[20]. 51,XX,+5,+6,+8,t(9;22)(q34;q11),add(11)(q25),+21,+Ph+[20].

No grupo dos responsivos (n=32), 100% dos pacientes alcançaram RHC, 28 pacientes (88%) foram avaliados quanto a resposta citogenética e destes 100% alcançaram RCC. Todos os casos alcançaram RMM numa mediana de seis meses.

No grupo resistente, 100% alcançaram RHC e 50% perderam. Os pacientes que possuíam análise citogenética 48% alcançaram RCC e 32% perderam. Nenhum paciente alcançou RMM. Oito dos 26 (31%) evoluíram para FA ou CB. Após a resistência ao imatinibe, 18 foram tratados com dasatinibe e seis com nilotinibe.

4.2 Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com LMC e doadores normais

4.2.1 Perfil de expressão do gene *TARP* em leucócitos totais de pacientes com LMC tratados com imatinibe

TARP estava hiperexpresso nos pacientes ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis (controle), (0,57 [0,11 - 2,06] versus (vs) 0,33 [0,03 - 2,38], respectivamente, $P=0,0003$) e hiperexpresso em pacientes com LMC pós imatinibe em relação aos doadores saudáveis, (0,61 [0,12 - 2,63] versus (vs) 0,33 [0,03 - 2,38], respectivamente, $P=0,0003$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 10).

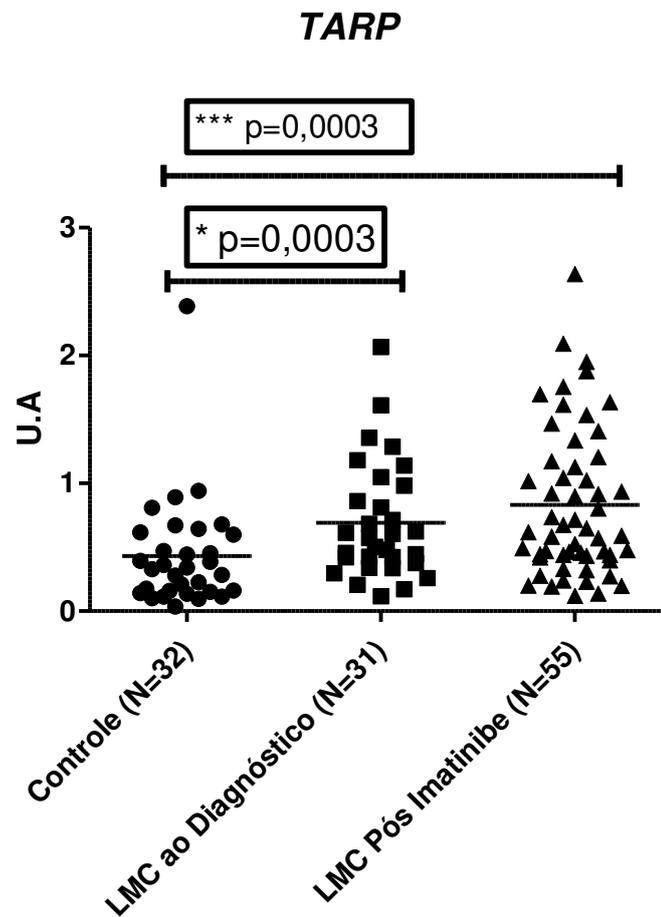


Figura 10. Perfil de expressão do *TARP* em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P<0,05$ como significativo.

Não houve diferença de expressão do gene *TARP* entre pacientes com LMC ao diagnóstico, responsivos e resistentes ao imatinibe ($P=NS$) (figura 11).

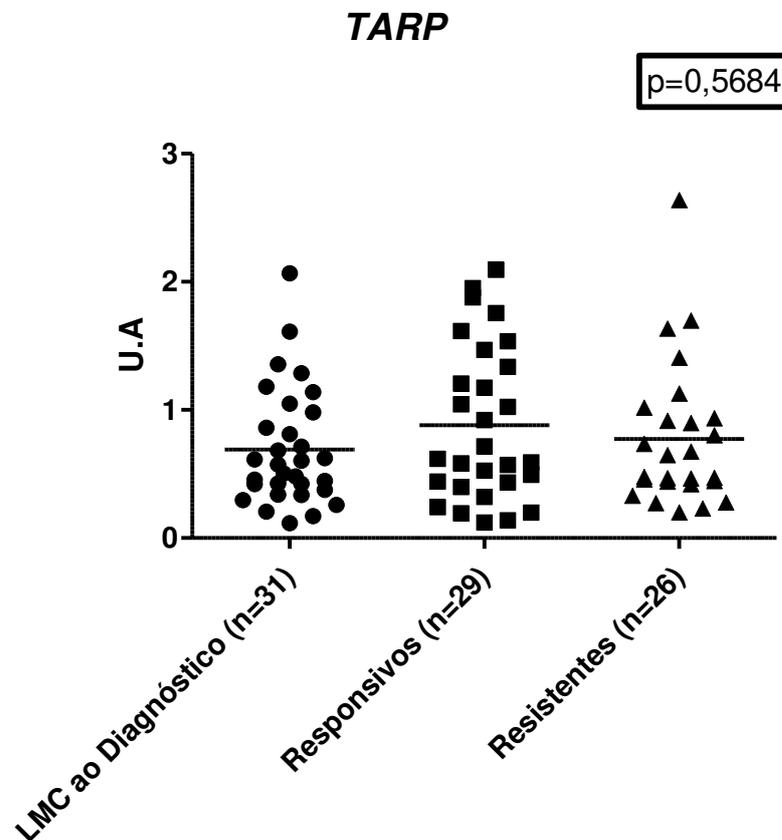


Figura 11. Perfil de expressão do *TARP* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.2 Perfil de expressão do gene *TARP* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

O *TARP* estava hiperexpresso nos pacientes com Escore de Sokal alto em relação aos pacientes com Escore de Sokal baixo, (1,04 [0,42 - 2,06] versus (vs) 0,50 [0,33 - 0,71], respectivamente, $P=0,030$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 12).

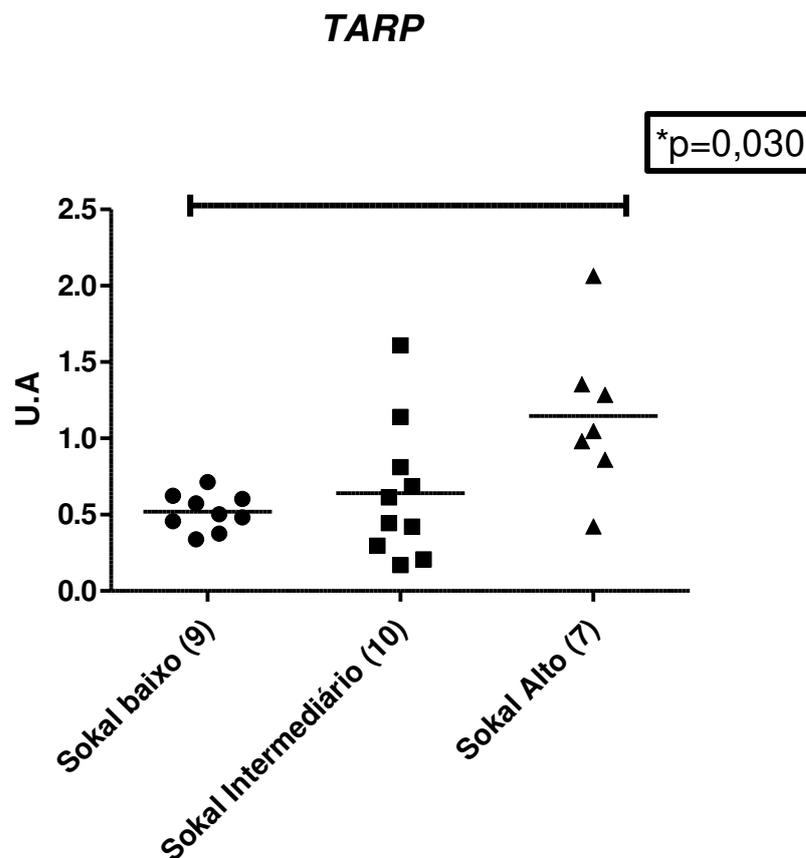


Figura 12. Perfil de expressão do gene *TARP* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.3 Perfil de expressão do gene *AKT1* em leucócitos totais de pacientes com LMC dos pacientes

AKT1 estava hipoexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis, (0,48 [0,25 - 1,84] versus (vs) 1,02 [0,16 - 3,32], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso em pacientes com LMC pós imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (1,39 [0,23 - 2,49] versus (vs) 0.48 [0,25 - 1,84], respectivamente $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 13).

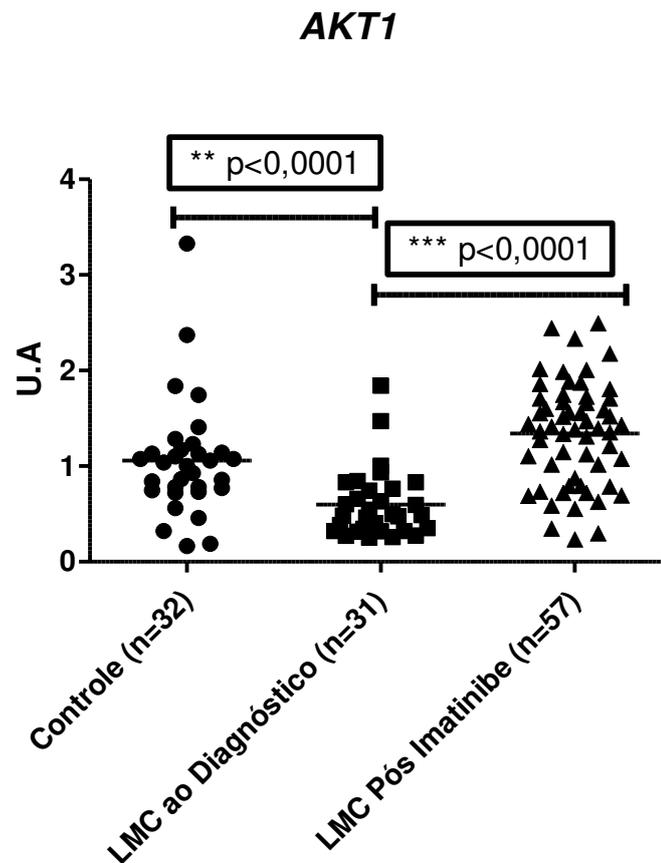


Figura 13. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

AKT1 estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (1,52 [0,55 - 2,49] versus (vs) 0,48 [0,25 - 1,84], respectivamente, $P < 0,0001$), hiperexpresso nos pacientes resistentes ao imatinibe em relação aos pacientes ao diagnóstico, (0,83 [0,23 - 2,44] versus (vs) 0,48 [0,25 - 1,84], respectivamente, $P < 0,0001$) e hipoexpresso nos pacientes resistentes em relação aos pacientes responsivos ao imatinibe, (0,83 [0,23 - 2,44] versus (vs) 1,52 [0,55 - 2,49], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 14).

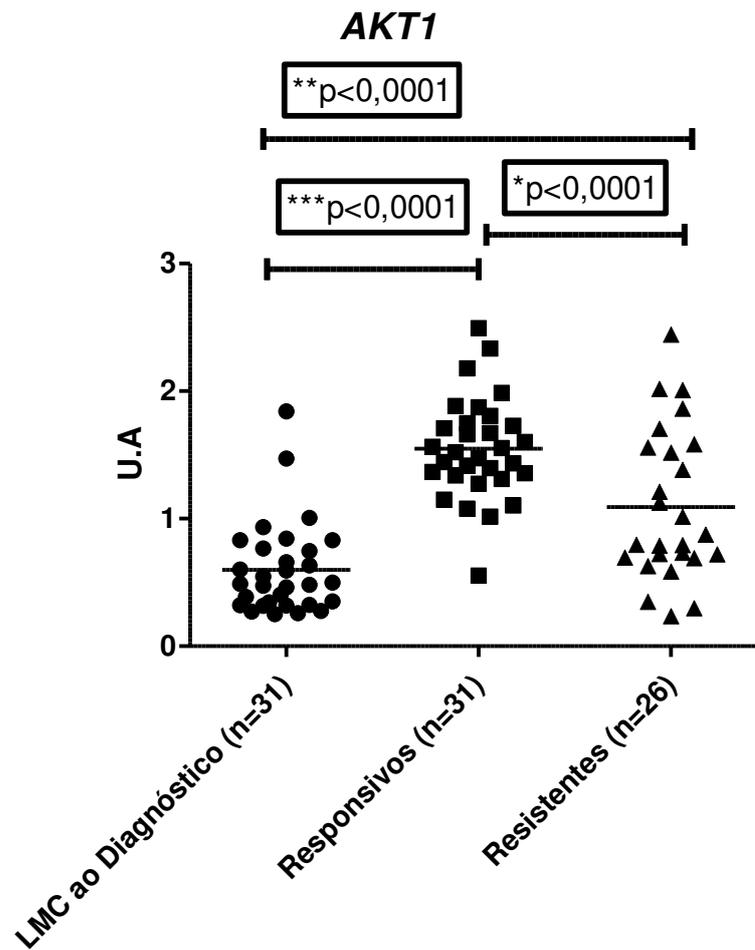


Figura 14. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.4 Perfil de expressão do gene *AKT1* de acordo com Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

Não houve diferença de expressão do gene *AKT1* por Escore de Sokal ($P = NS$) (igura15).

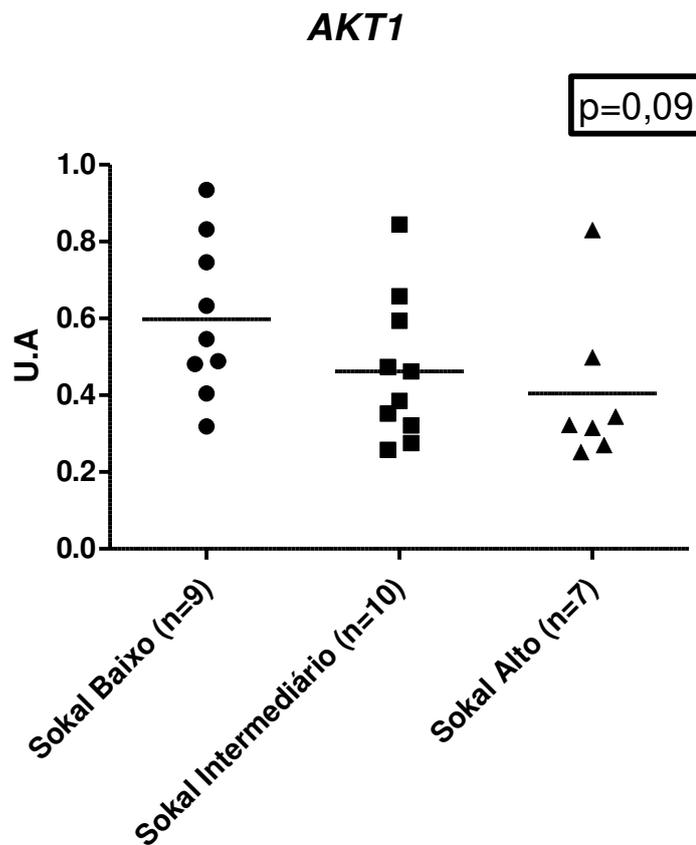


Figura 15. Perfil de expressão do gene *AKT1* de acordo com Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.5 Perfil expressão do gene *IFNG* em leucócitos totais de pacientes com LMC

IFNG estava hiperexpresso nos doadores saudáveis (controle) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,44 [0,06 - 7,79] versus (vs) 0,03 [0,00 - 0,35], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso em pacientes com LMC pós imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,52 [0,00 - 2,78] versus (vs) 0,03 [0,00 - 0,35], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 16).

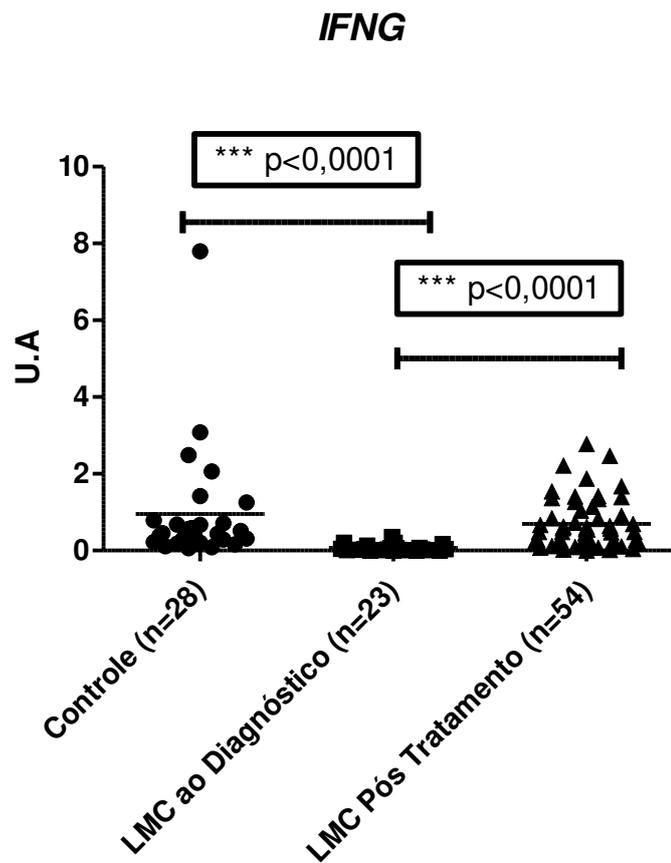


Figura 16. Perfil de expressão do *IFNG* em doadores saudáveis (controle) vs. pacientes com LMC ao diagnóstico vs. pacientes com LMC tratados com imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

IFNG estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,56 [0,08 - 2,78] versus (vs) 0,03 [0,00 - 0,35], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao imatinibe em relação aos pacientes ao diagnóstico, (0,28 [0,00 - 2,46] versus (vs) 0,03 [0,00 - 0,35], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 17).

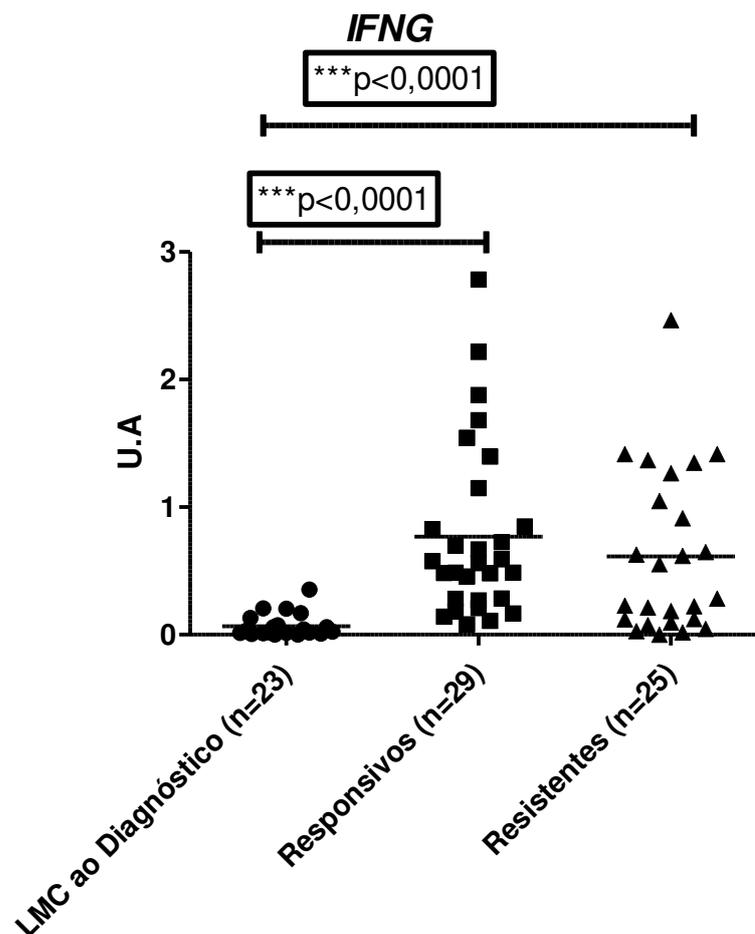


Figura 17. Perfil de expressão do *IFNG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.6 Perfil de expressão do gene *IFNG* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

Não houve diferença de expressão do gene *IFNG* de acordo com o escore de Sokal ($P = NS$) (figura 18).

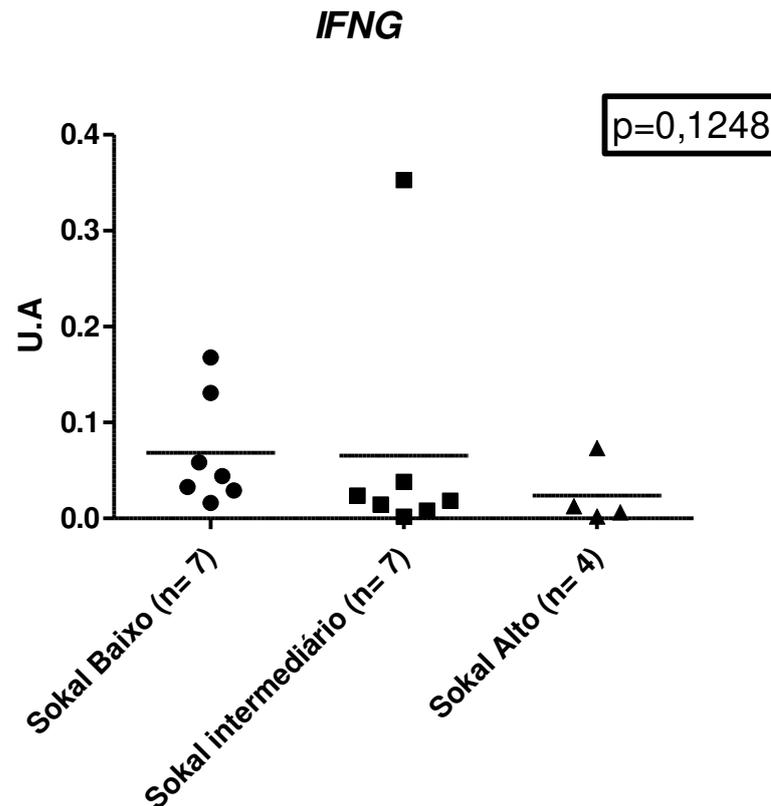


Figura 18. Perfil de expressão do gene *IFNG* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.7 Perfil de expressão do gene *ncTNFAIP8* em leucócitos totais de pacientes com LMC

ncTNFAIP8 estava hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis (controle), (0,90 [0,13 - 2,10] versus (vs) 0,27 [0,01 - 2,24], respectivamente, $P=0,0222$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 19).

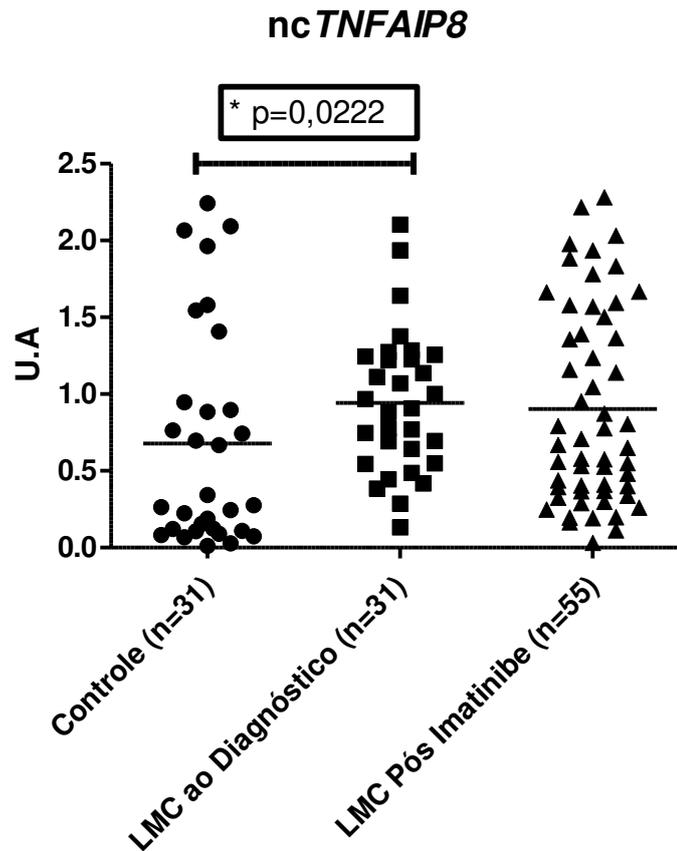


Figura 19. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

Não houve diferença de expressão do gene *ncTNFAIP8* entre os pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes respondivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe ($P=NS$) (figura 20).

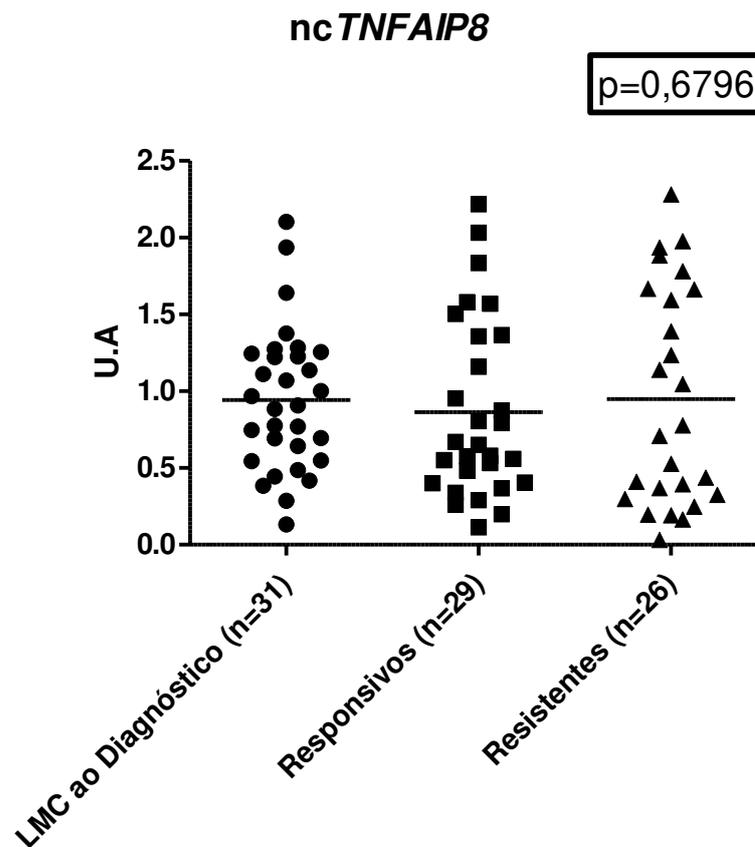


Figura 20. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.8 Perfil de expressão do gene *ncTNFAIP8* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

Não houve diferença de expressão do gene *ncTNFAIP8* de acordo com o escore de Sokal ($P=NS$) (figura 21).

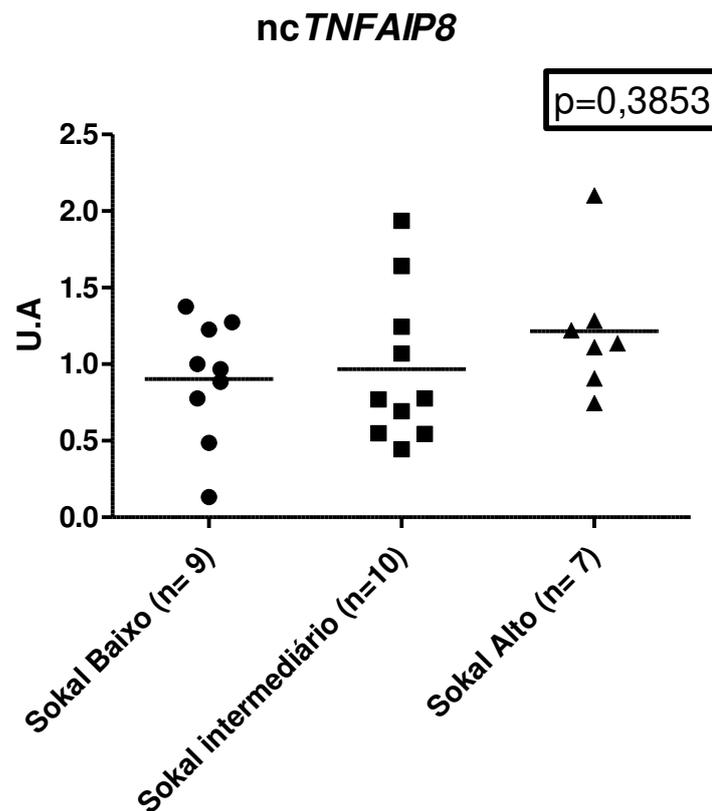


Figura 21. Perfil de expressão do gene *ncTNFAIP8* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.9 Perfil de expressão do gene *TNFAIP8* em leucócitos totais de pacientes com LMC

TNFAIP8 estava hiperexpresso nos pacientes com LMC pós imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (1,19 [0,03 - 5,68] versus (vs) 0,48 [0,13 - 2,47], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 22).

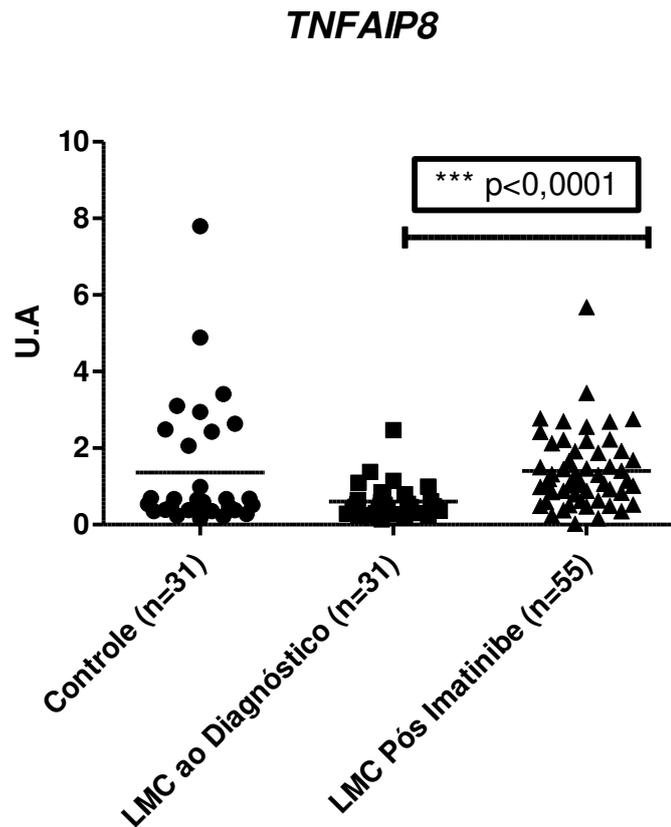


Figura 22. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

TNFAIP8 estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (1,46 [0,51 - 5,68] versus (vs) 0,48 [0,13 - 2,47], respectivamente, $P < 0,0001$); hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes resistentes, (1,46 [0,51 - 5,68] versus (vs) 0,93 [0,03 - 2,76], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, 0,93 [0,03 - 2,76] versus (vs) 1,46 [0,51 - 5,68], respectivamente, ($p < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 23).

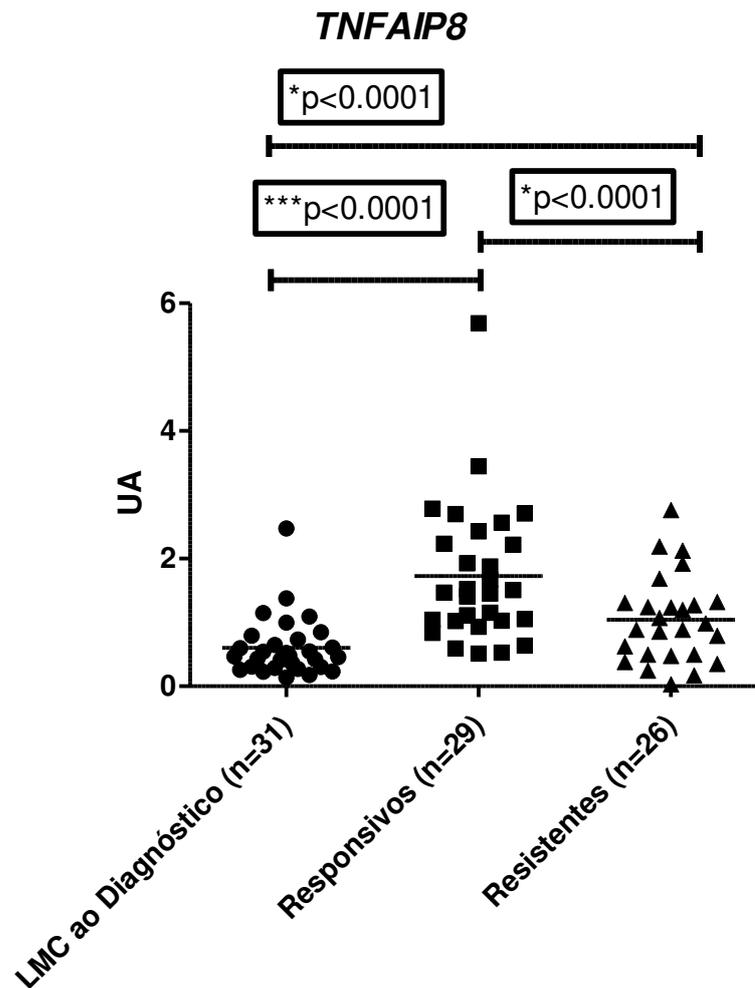


Figura 23. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.10 Perfil de expressão do gene *TNFAIP8* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

Não houve diferença de expressão do gene *TNFAIP8* de acordo com o escore de Sokal ($P = NS$) (figura 24).

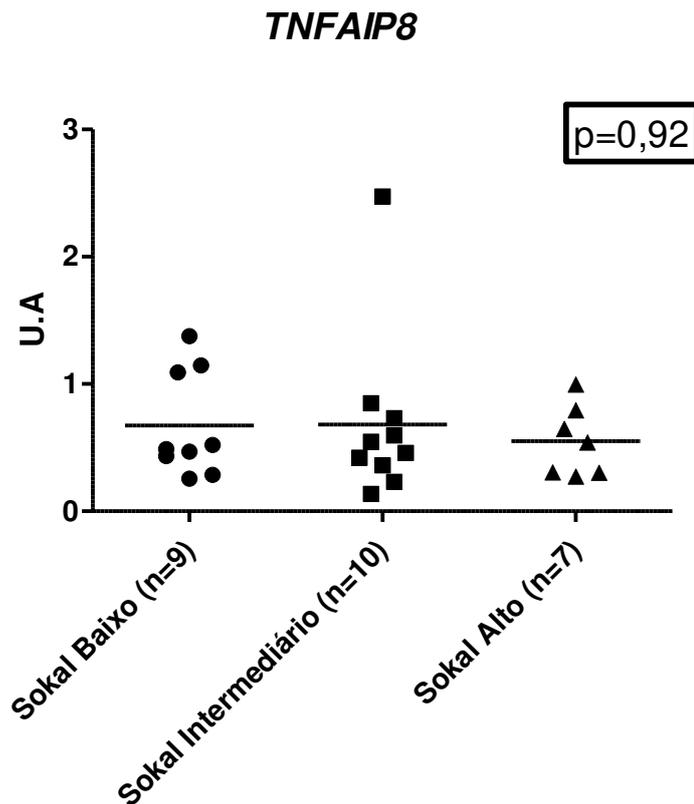


Figura 24. Perfil de expressão do gene *TNFAIP8* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.11 Perfil de expressão do gene *FASLG* em leucócitos totais de pacientes com LMC

FASLG estava hiperexpresso nos pacientes com LMC pós imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,94 [0,00 - 5,27] versus (vs) 0,06 [0,00 - 0,68], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes saudáveis (controle) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,51 [0,03 - 3,13] versus (vs) 0,06 [0,00 - 0,68], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 25).

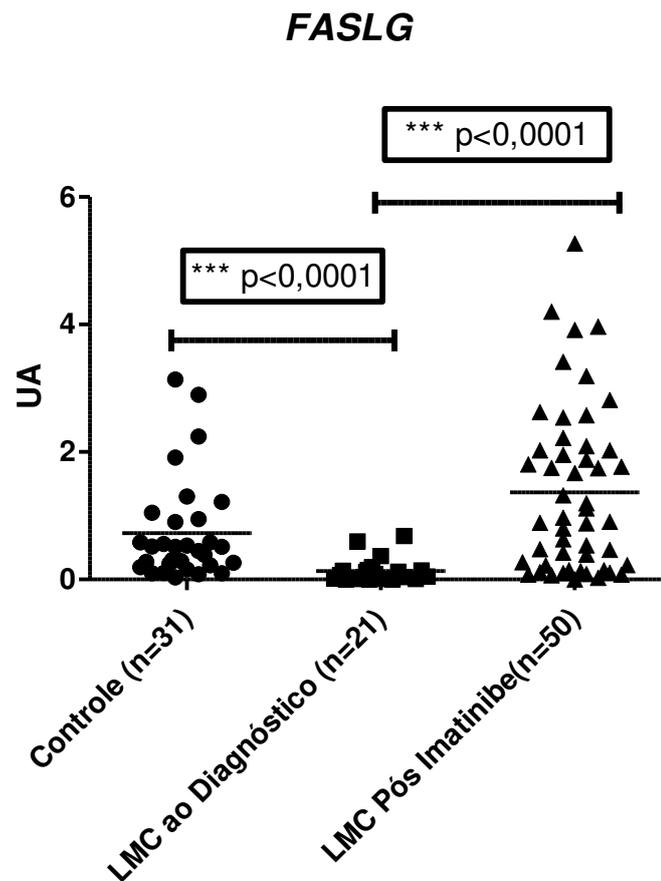


Figura 25. Perfil de expressão do *FASLG* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC tratados com imatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

FASLG estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (1,79 [0,22 - 5,27] versus (vs) 0,06 [0,00 - 0,68], respectivamente, $P < 0,0001$); hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes resistentes, (1,79 [0,22 - 5,27] versus (vs) 0,18 [0,00 - 3,97], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,18 [0,00 - 3,97] versus (vs) 0,06 [0,00 - 0,68], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 26).

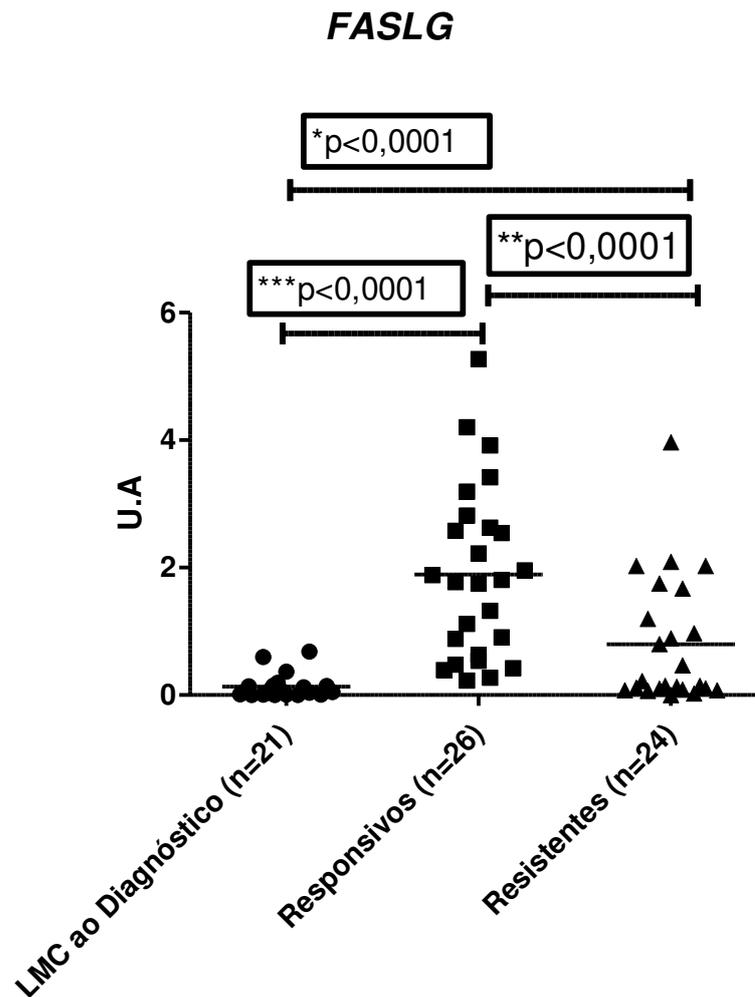


Figura 26. Perfil de expressão do *FASLG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao imatinibe (vs.) pacientes resistentes ao imatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.2.12 Perfil de expressão do gene *FASLG* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico

Não houve diferença de expressão do gene *FASLG* de acordo com o escore de Sokal ($P = \text{NS}$) (figura 27).

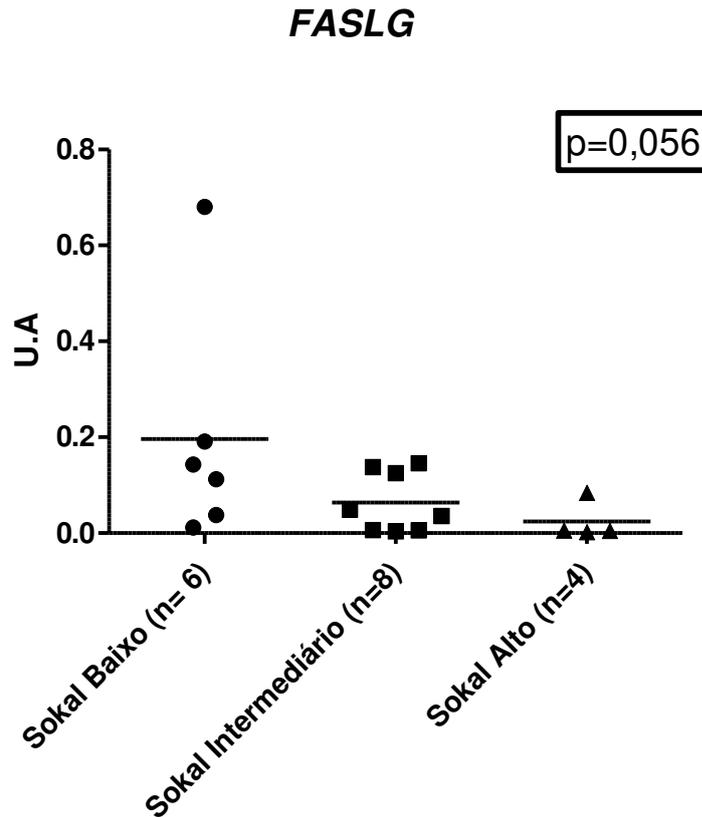


Figura 27. Perfil de expressão do gene *FASLG* de acordo com o Escore de Sokal nos pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.3 Análises de sobrevidas em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1*

A SG, SLP e SLE dos pacientes tratados com imatinibe de acordo com a expressão gênica não houve diferenças significativas ($P=NS$) (Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

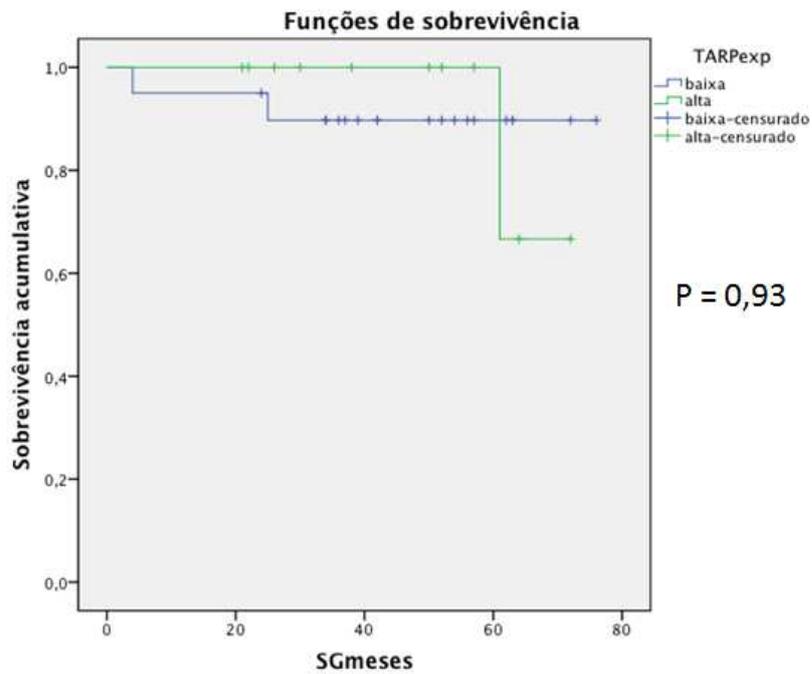


Figura 28. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TARP*.

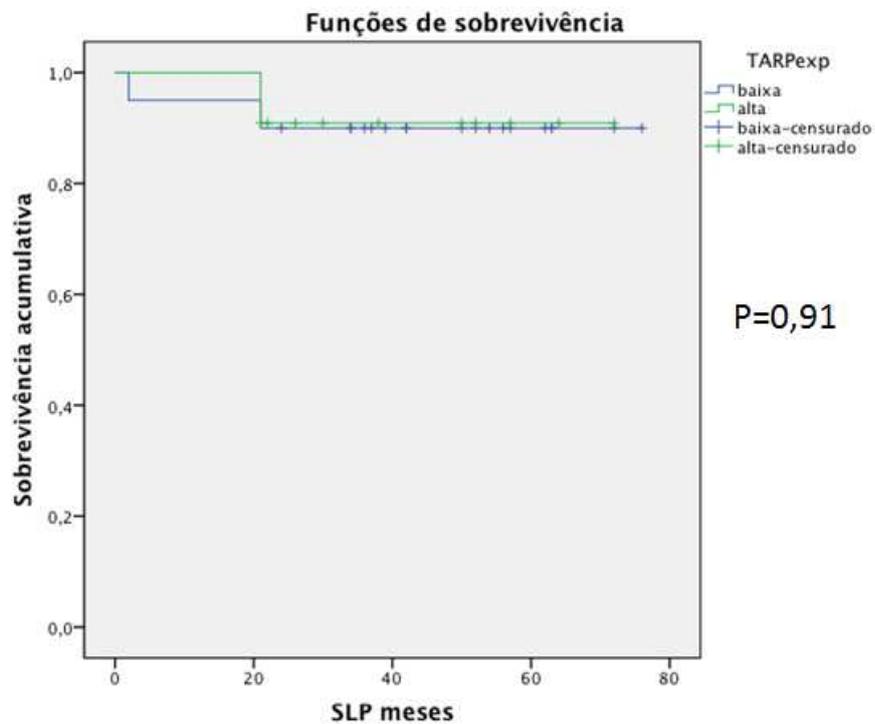


Figura 29. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TARP*.

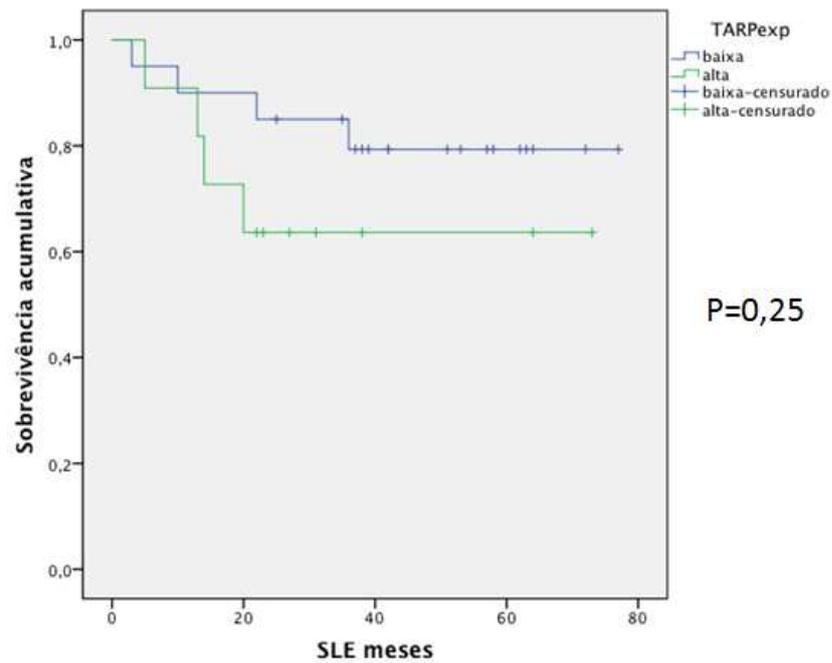


Figura 30. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TARP*.

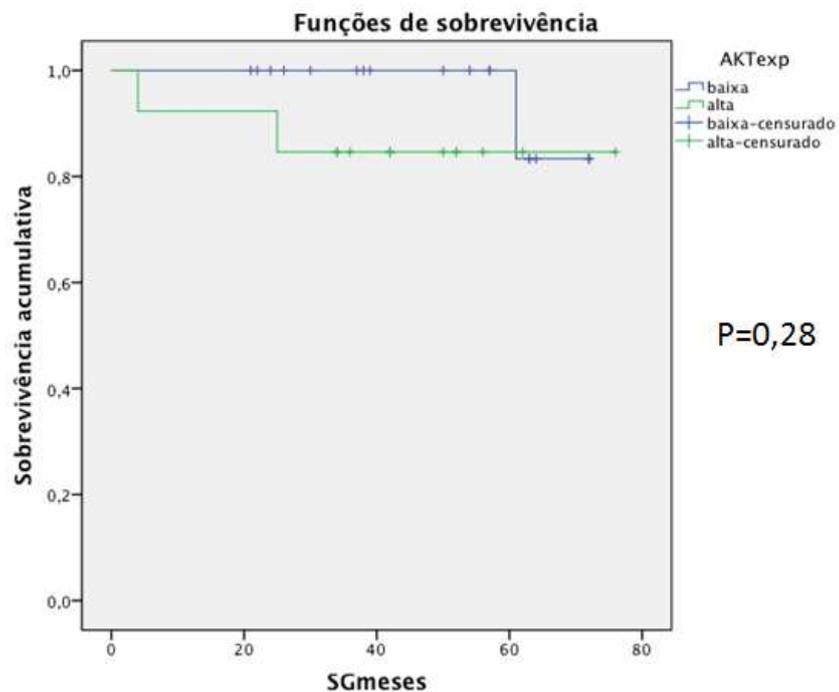


Figura 31. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *AKT1*.

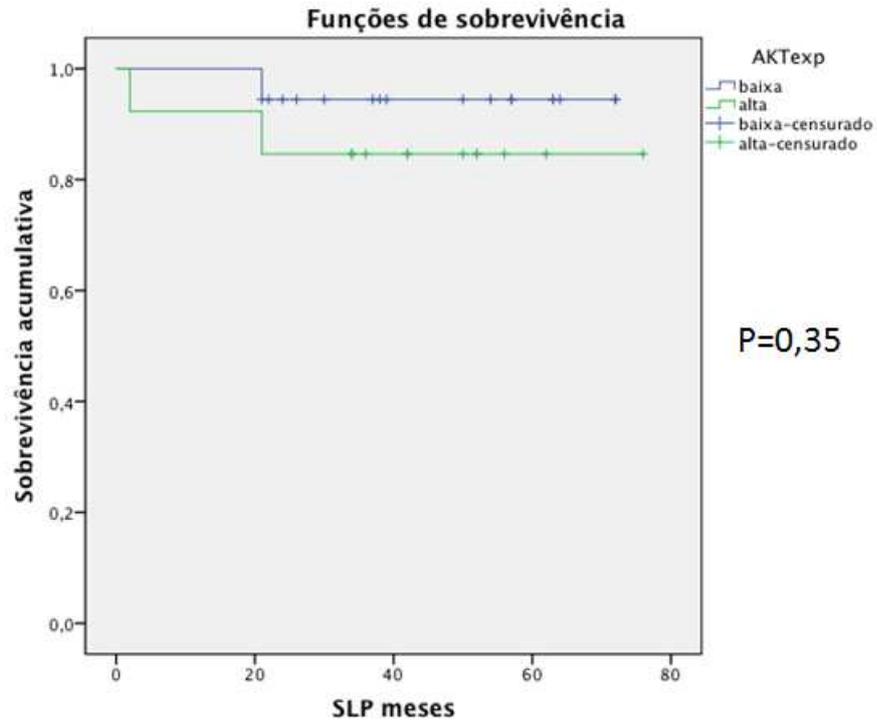


Figura 32. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *AKT1*.

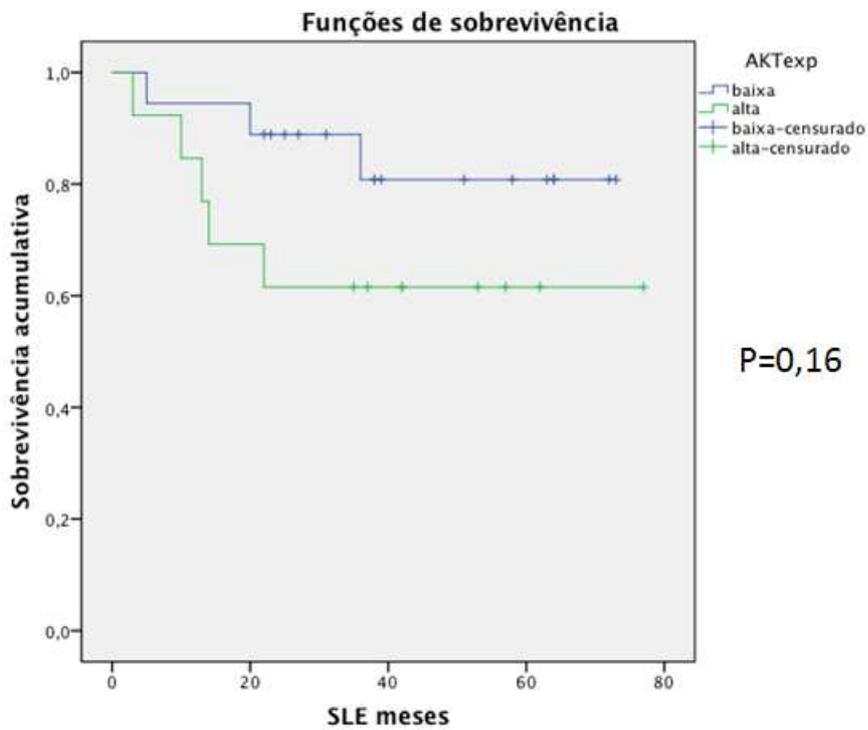


Figura 33. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *AKT1*.

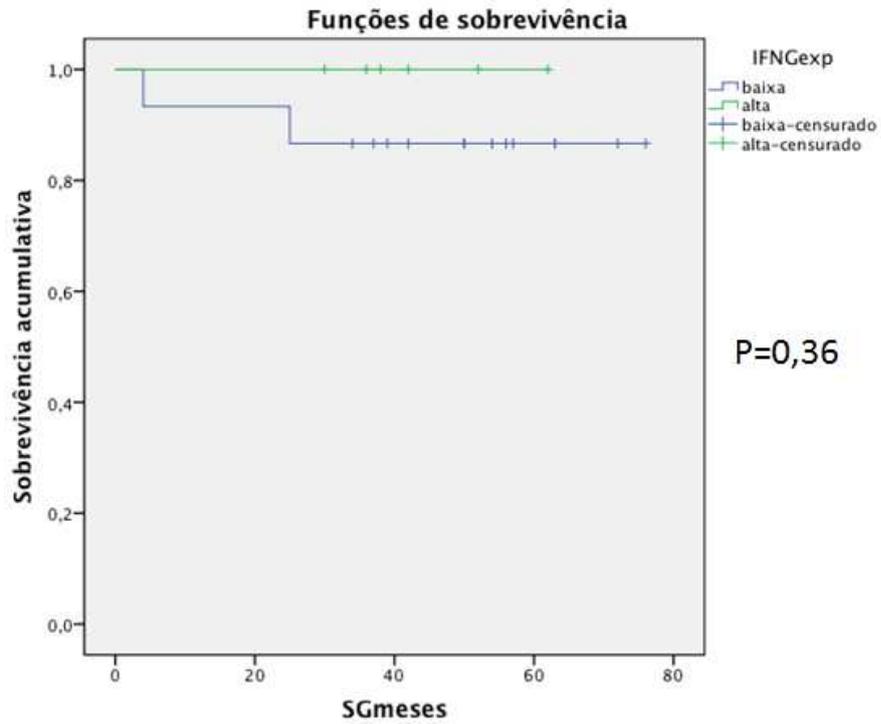


Figura 34. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *IFNG*.

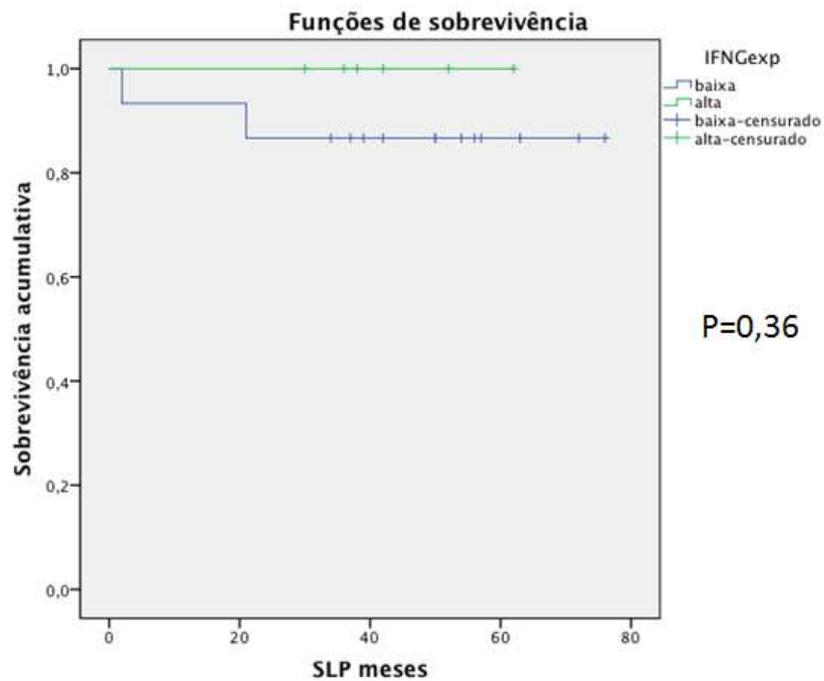


Figura 35. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *IFNG*.

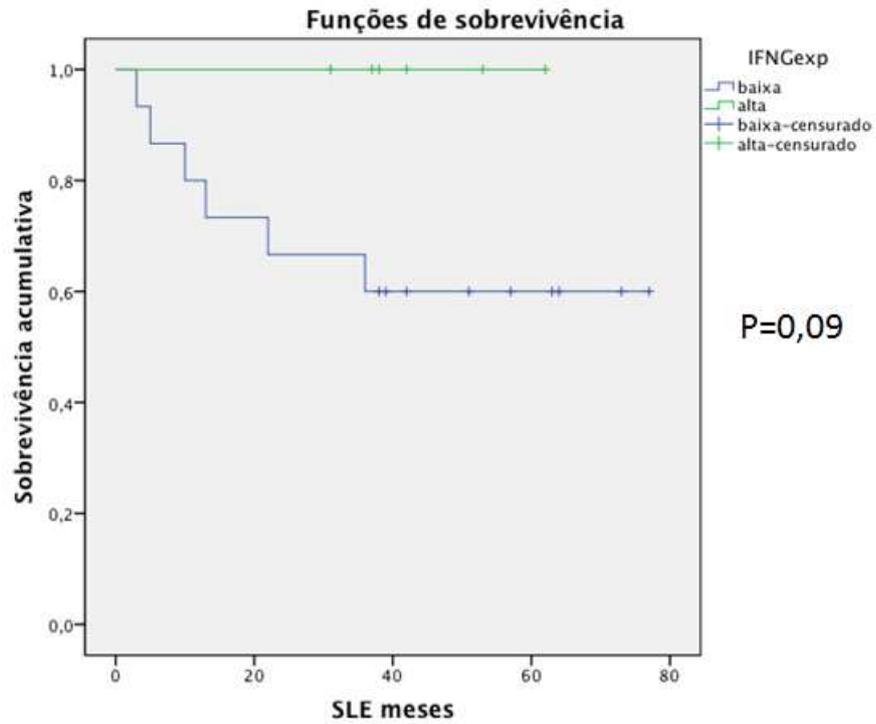


Figura 36. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *IFNG*.

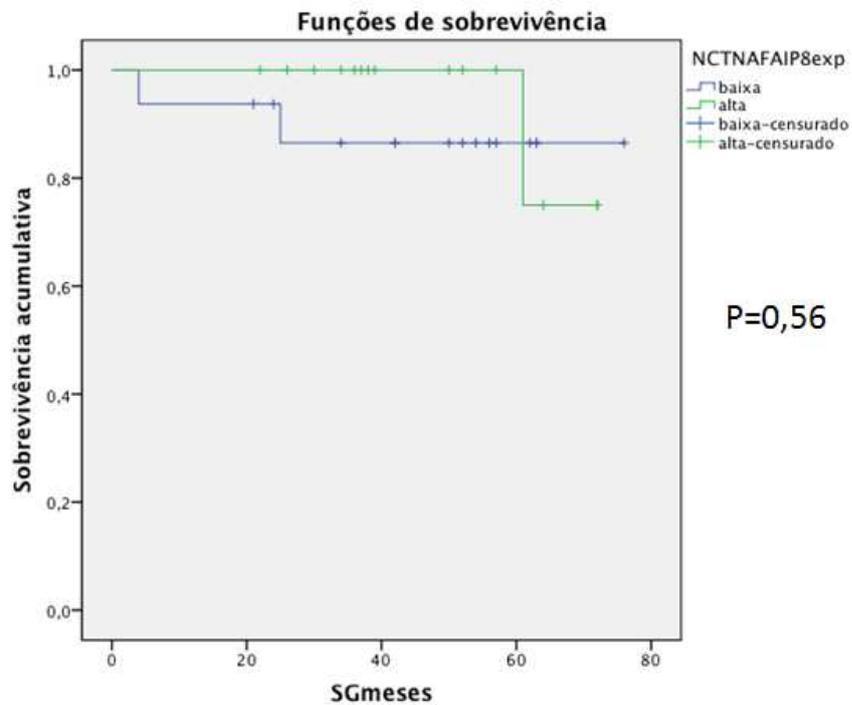


Figura 37. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *ncTNFAIP8*.

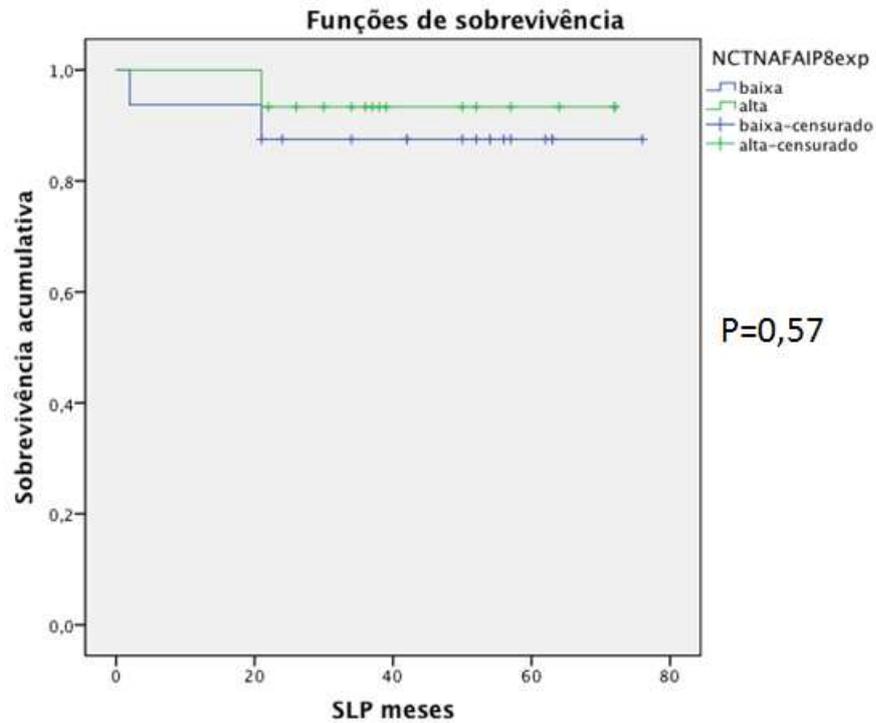


Figura 38. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *ncTNFAIP8*.

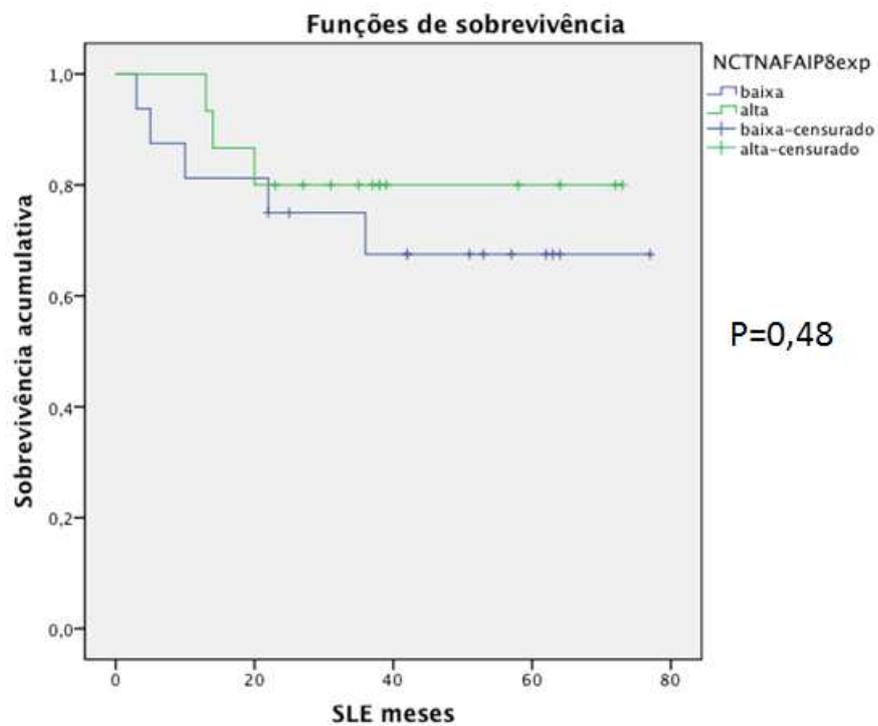


Figura 39. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *ncTNFAIP8*.

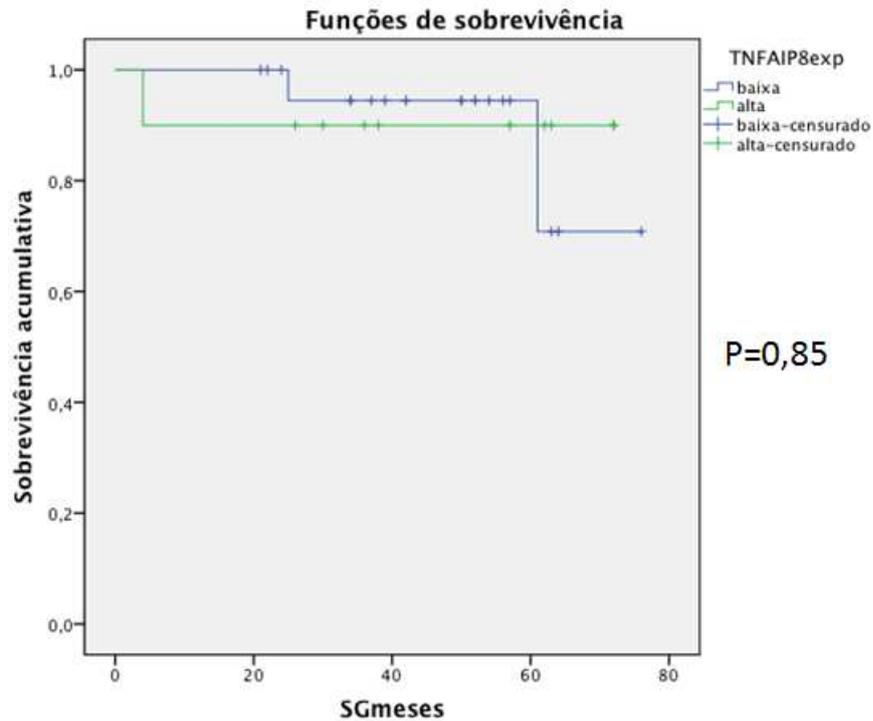


Figura 40. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TNFAIP8*.

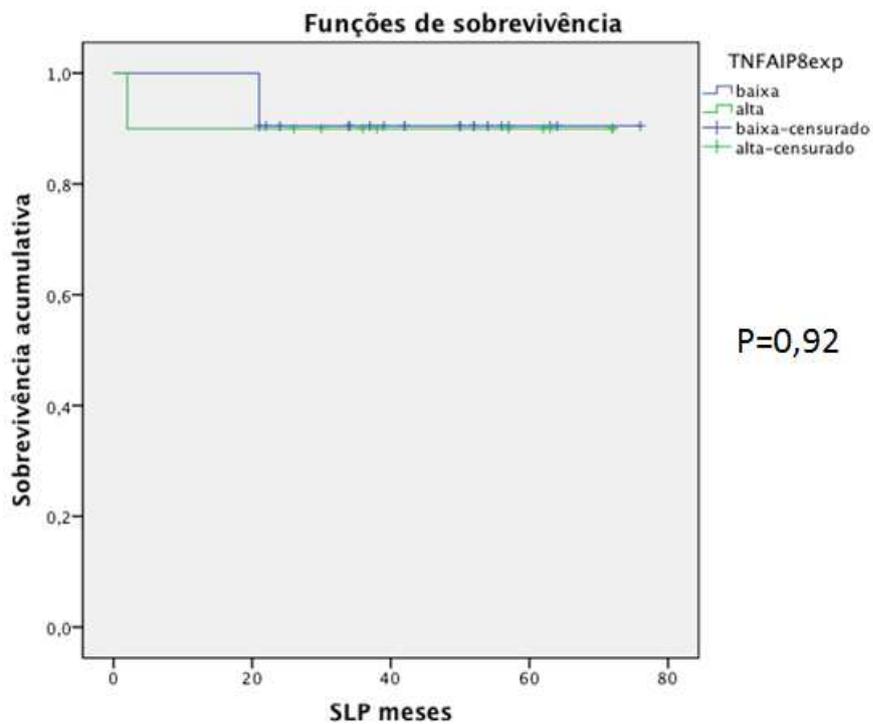


Figura 41. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TNFAIP8*.

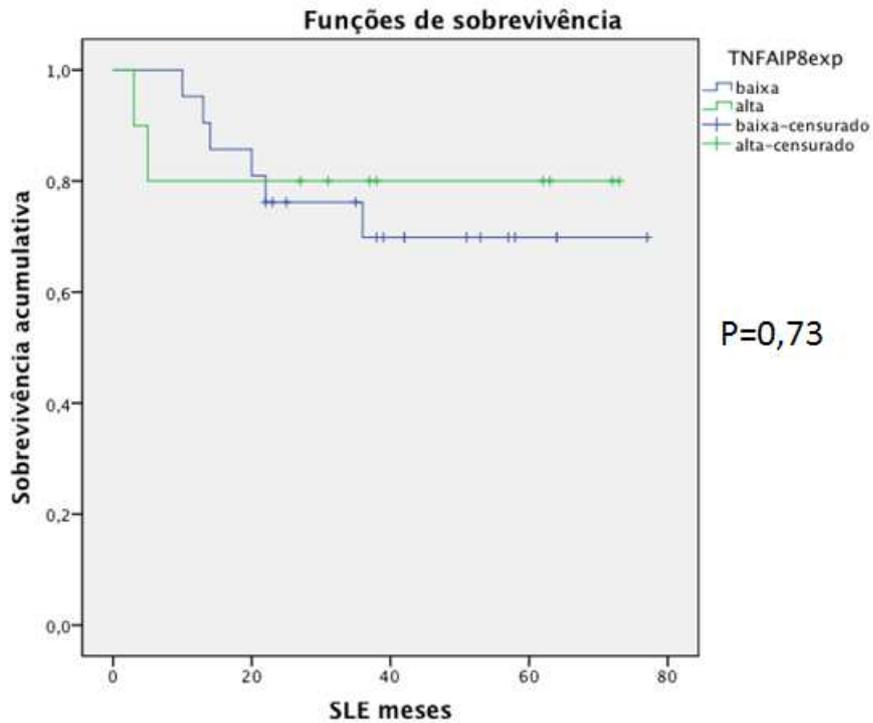


Figura 42. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *TNFAIP8*.

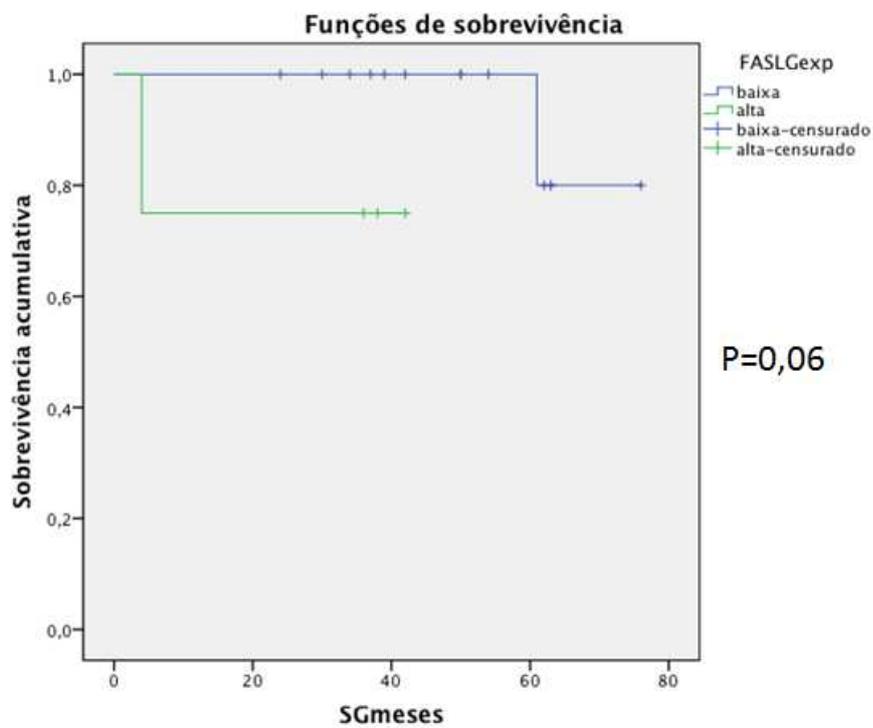


Figura 43. Sobrevida Global em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *FASLG*.

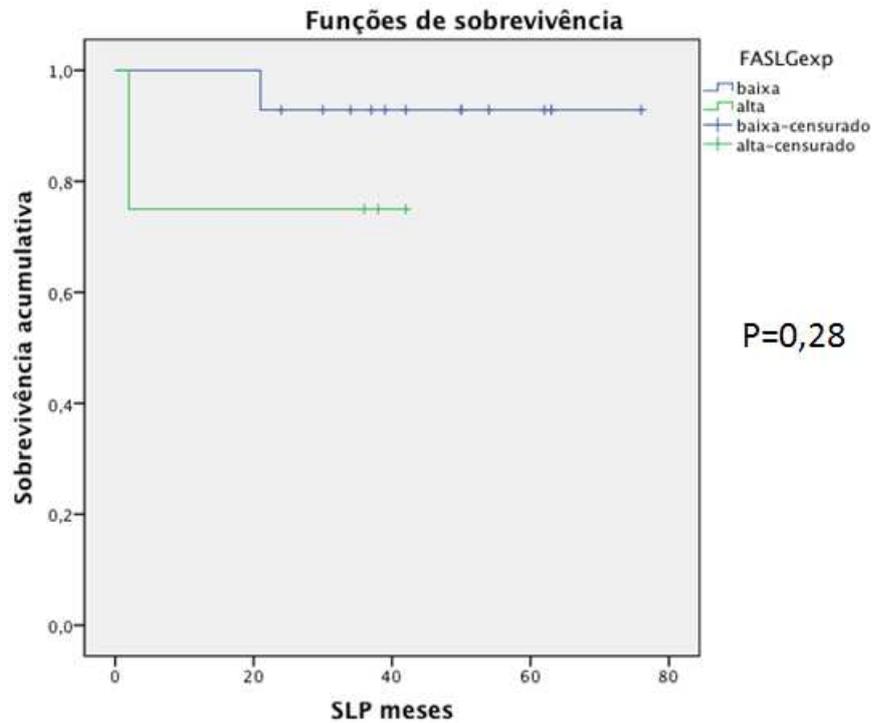


Figura 44. Sobrevida Livre de Progressão em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *FASLG*.

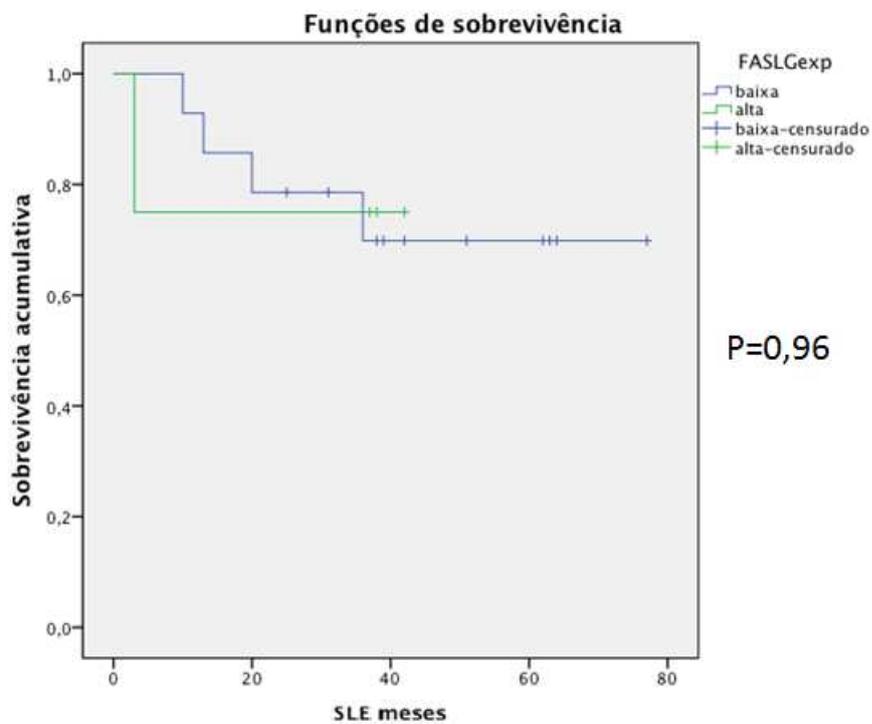
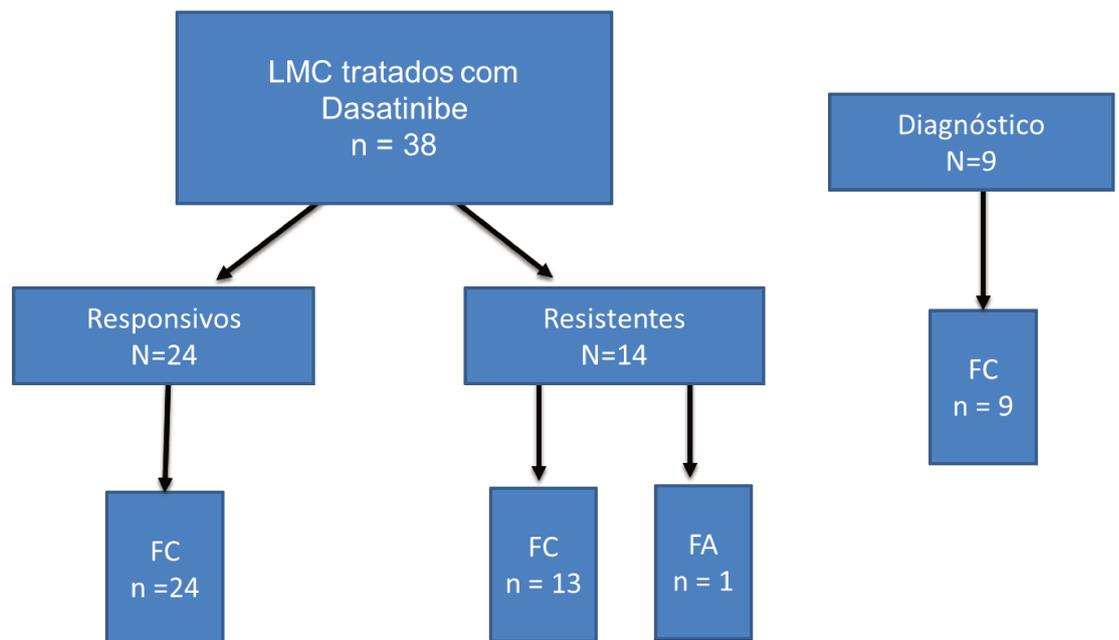


Figura 45. Sobrevida Livre de Eventos em pacientes com LMC tratados com imatinibe de acordo com a expressão de *FASLG*.

4.4 Pacientes com LMC tratados com dasatinibe

Foi extraído RNA de células mononucleares de sangue periférico de 47 pacientes com LMC, tratados com dasatinibe e tratamento prévio com imatinibe. Destes pacientes, 46 estavam em FC e um em FA. Avaliamos amostras de 9 casos ao diagnóstico, pré tratamento e posteriormente tratados com imatinibe e dasatinibe. Foram analisados 38 pacientes após tratamento: 24 responsivos 14 pacientes resistentes ao dasatinibe. Na data da coleta das amostras, um paciente estava em FA e os demais em FC.



4.4.1 Características dos pacientes

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico, responsivos e resistentes ao dasatinibe estão descritas nas tabelas 10, 11 e 12, respectivamente.

Tabela 10. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico (n=09)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	43 (21-69)	
Gênero: masculino	6	67

Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+*	01/9	11
Esplenomegalia		
Baço >10cm abaixo do RCE	2/9	22
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	123,8 (60,3 – 294,6)	
Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	338,2 (94,7 – 755,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	12,0 (8,6 – 14,6)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	3,0 (0 - 13)	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	5,4 (0 - 10)	
Tempo tratamento dasatinibe (intervalo), meses	60 (40 – 80)	
Tempo tratamento Imatinibe (intervalo), meses	12(5 – 31)	
Escore de Sokal		
Baixo	3	33,3
Intermediário	2	22,2
Alto	1	11,11
Não Avaliado	3	3,3

* 46,XX,t(10;12;15;22)(q23;p13;q26;q11)

RCE: rebordo costal esquerdo

Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC respondivos ao dasatinibe (n=24)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	45 (19 - 73)	
Gênero: masculino	16	67
Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+	0	
Esplenomegalia		
Baço >10cm abaixo do RCE	9/24	37
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	156,6 (5,6 – 500,2)	
Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	412,6 (39,4 – 996,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	11,6 (6,5 – 14,6)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	2,52 (0 - 6,0)	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	4,91 (0 - 12)	
Tempo tratamento dasatinibe (intervalo), meses	70 (39 – 129)	
Tempo tratamento Imatinibe (intervalo), meses	22 (1 - 80)	
Escore de Sokal		
Baixo	2	8,3
Intermediário	7	29,1
Alto	4	16,8
Não Avaliado	11	45,8

RCE: rebordo costal esquerdo

Tabela 12. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC resistentes ao dasatinibe (n=14)

Variáveis	n.	%
Mediana de idade (intervalo), anos	56 (21 - 77)	
Gênero: masculino	10	71
Anormalidades cromossômicas adicionais ao Ph+*	1	7
Esplenomegalia		
Baço >10cm abaixo do RCE	3/14	21
Leucócitos x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	11,8 (2,6 – 55,8)	
Plaquetas x 10 ⁹ /L, mediana (intervalo)	295,3 (8,0 – 823,0)	
Hb, g/L mediana (intervalo)	11,7 (6,2 – 16,1)	
Blastos SP, % mediana (intervalo)	1,47 (0 - 15,0)	
Basófilos SP, % mediana (intervalo)	2,96 (0,4 - 10)	
Tempo tratamento dasatinibe (intervalo), meses	38 (5 – 103)	
Tempo tratamento Imatinibe (intervalo), meses	28 (1 - 103)	
Escore de Sokal		
Baixo	1	7
Intermediário	2	15
Alto	1	7
Não Avaliado	10	71

Del 22; RCE: rebordo costal esquerdo

Dentre os 47 pacientes analisados, entre o grupo dos responsivos, 88% dos pacientes alcançaram ou mantiveram a RHC. Entre os 25 pacientes em FC que possuíam análise citogenética, 21 pacientes (84%) alcançaram RCC e 21 (84%) dos pacientes em FC com análise molecular alcançaram RMM. Porém, no grupo resistente, 29% alcançaram ou mantiveram RHC, os pacientes que possuíam análise citogenética 7% alcançaram RCC e os que possuíam análise molecular 7% alcançaram RMM.

4.4.2 Análise de mutações do domínio quinásico do BCR-ABL

Foi realizada análise de mutações do BCR-ABL1 em 22 de 38 pacientes tratados com dasatinibe. Foram detectadas mutações do ABL em 9/22 (40,9%) dos pacientes. As mutações encontradas estão descritas na tabela 13.

Tabela 13. Mutações no domínio quinásico BCR-ABL

Pacientes resistentes ao imatinibe (n=22)	Mutações (n=9)	Ausência de Mutação (n=13)	TKI utilizado na pesquisa de mutação
Responsivos ao dasatinibe (n=8)	E255K T315I M244V L387M	4	Dasatinibe
Resistentes ao dasatinibe (n=14)	F317L M244V T315I(2) Y253H	9	Dasatinibe

4.5 Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com LMC ao diagnóstico, tratados com dasatinibe e em doadores normais

4.5.1 Perfil de expressão do gene *TARP* em células mononucleares de pacientes com LMC tratados com dasatinibe

TARP estava hiperexpresso nos pacientes ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis (controle) (0,91[0,23 - 1,6] versus (vs) 0,21[0,02 - 1,2], respectivamente, P=0,0119) e hiperexpresso em pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos pacientes com LMC pós tratamento com dasatinibe, (0,91[0,23 - 1,6]

versus (vs) 0,24 [0,04 - 1,2], respectivamente, $P=0,0129$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 46).

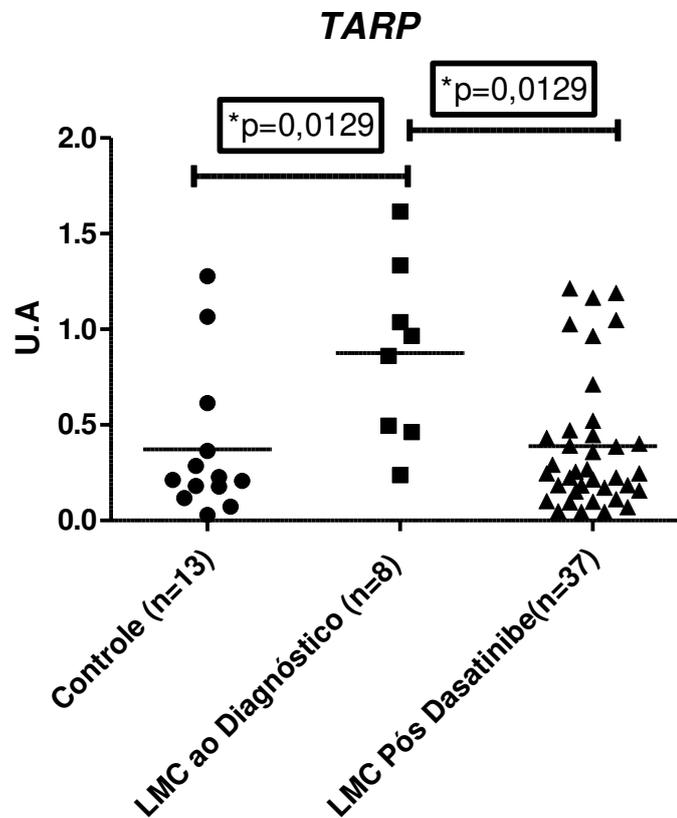


Figura 46. Perfil de expressão do TARP em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC tratados com dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P<0,05$ como significativo.

TARP estava hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos pacientes responsivos ao dasatinibe, (0,91 [0,23 - 1,6] versus (vs) 0,22 [0,04 - 1,19], respectivamente, $P=0,0076$). Não houve diferença de expressão entre os pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe ($P=NS$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 47).

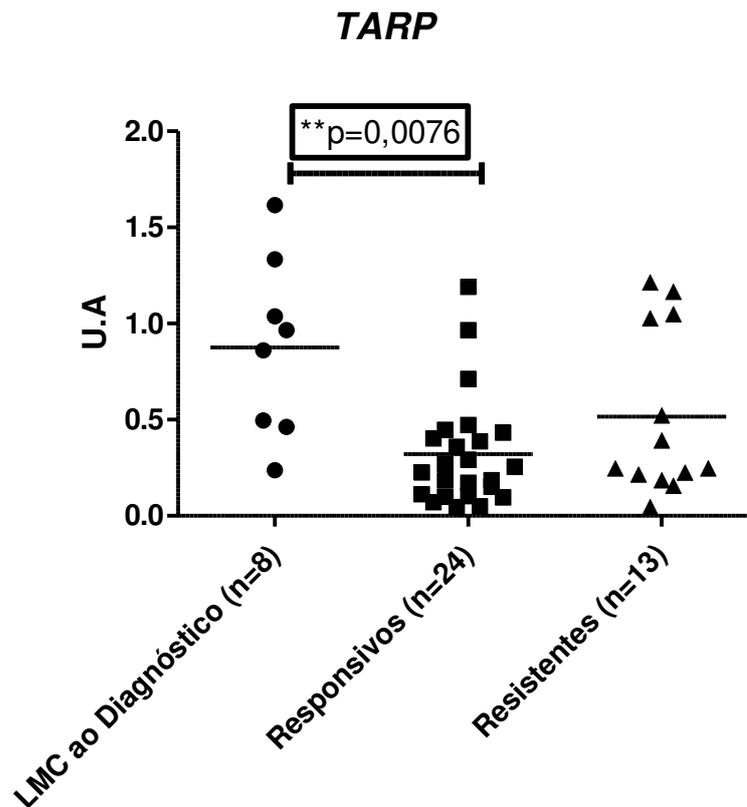


Figura 47. Perfil de expressão do *TARP* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.5.2 Perfil de expressão do gene *AKT1* em células mononucleares de pacientes com LMC

AKT1 estava hipoexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis, (0,38 [0,17 - 0,84] versus (vs) 1,07 [0,68 - 1,85], respectivamente, $P=0,0001$) e hiperexpresso em pacientes com LMC tratados com dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,75 [0,33 - 1,5] versus (vs) 0,38 [0,17 - 0,84], respectivamente, $P=0,0002$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 48).

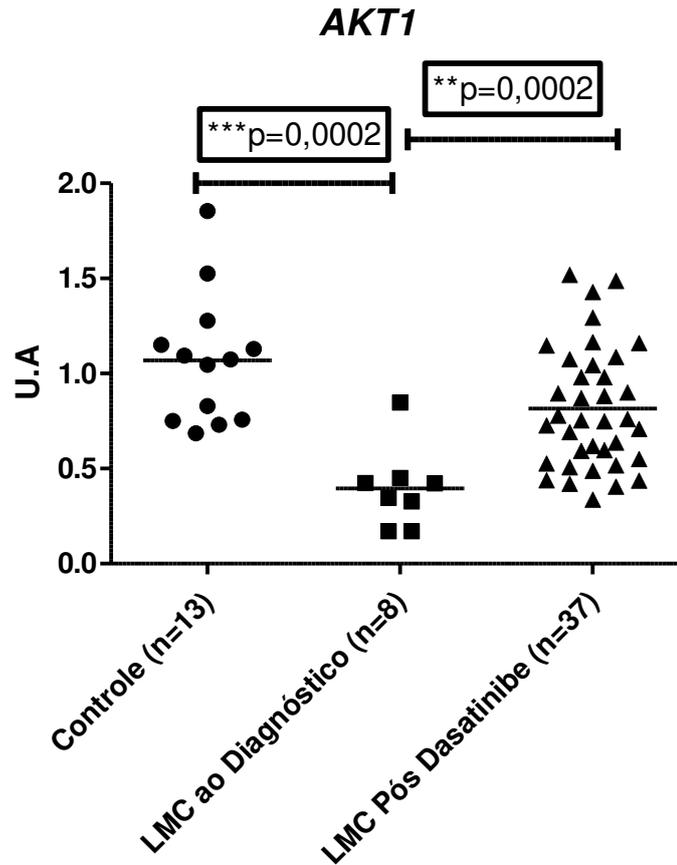


Figura 48. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes controle versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

AKT1 estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,76 [0,42 - 1,5] versus (vs) 0,38 [0,17 - 0,84], respectivamente, $P=0,0014$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo]. Não houve diferença de expressão entre os pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe ($P=NS$) (figura 49).

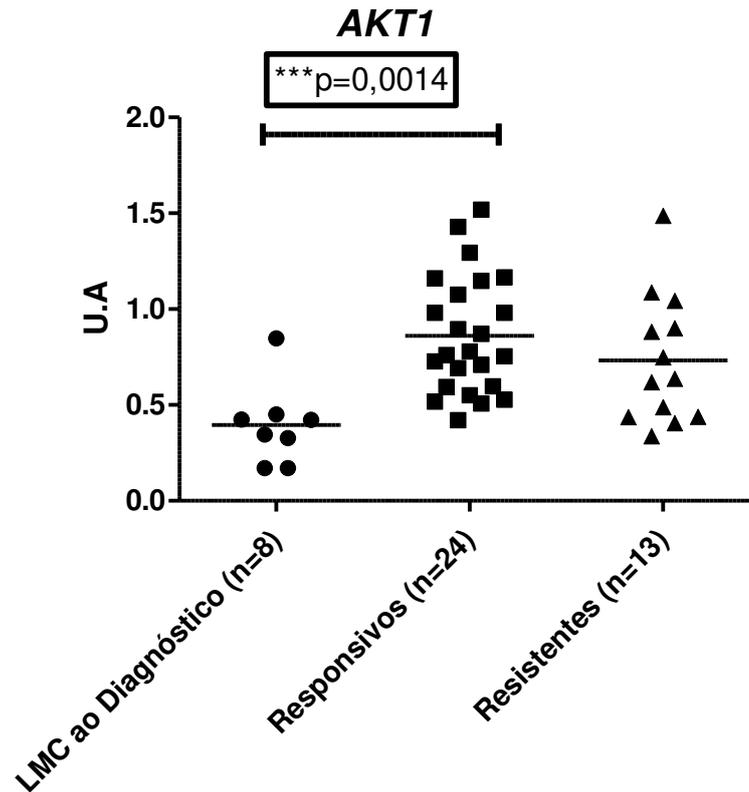


Figura 49. Perfil de expressão do *AKT1* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.5.3 Perfil de expressão do gene *IFNG* em células mononucleares de pacientes com LMC

IFNG estava hipoexpresso nos doadores saudáveis (controle) em relação aos pacientes com LMC pós dasatinibe, (0,06 [0,01 - 2,7] versus (vs) 0,6 [0,04 - 3,7], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso em pacientes com LMC pós dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,6 [0,04 - 3,7] versus (vs) 0,03 [0,01 - 0,39], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 50).

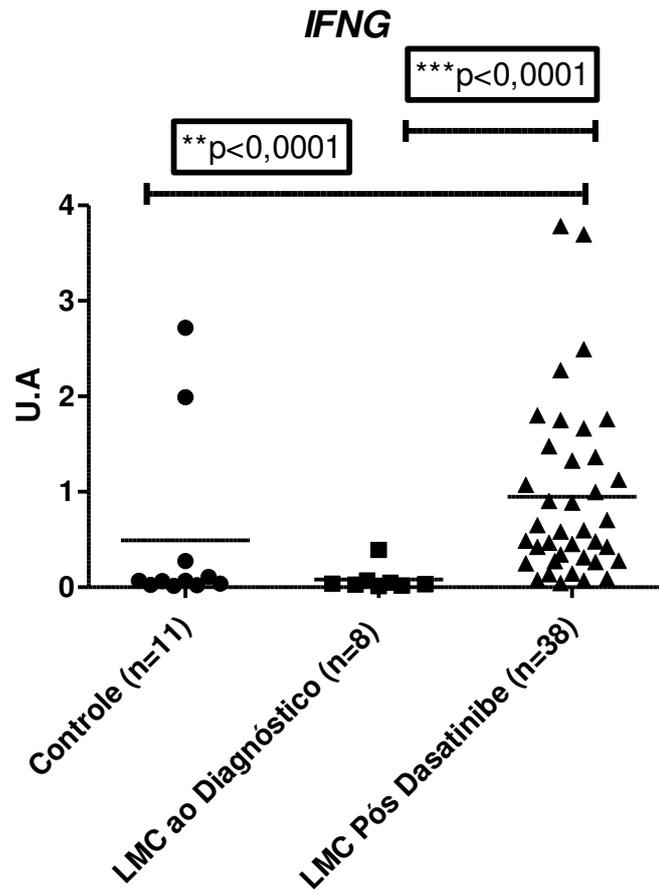


Figura 50. Perfil de expressão do *IFNG* em doadores saudáveis (controle) vs. pacientes com LMC ao diagnóstico vs. pacientes com LMC pós dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

IFNG estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,65 [0,04 - 3,7] versus (vs) 0,03 [0,01 - 0,39], respectivamente, $P = 0,0003$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, 0,44 [0,07 - 3,6], respectivamente $P = 0,0003$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 51).

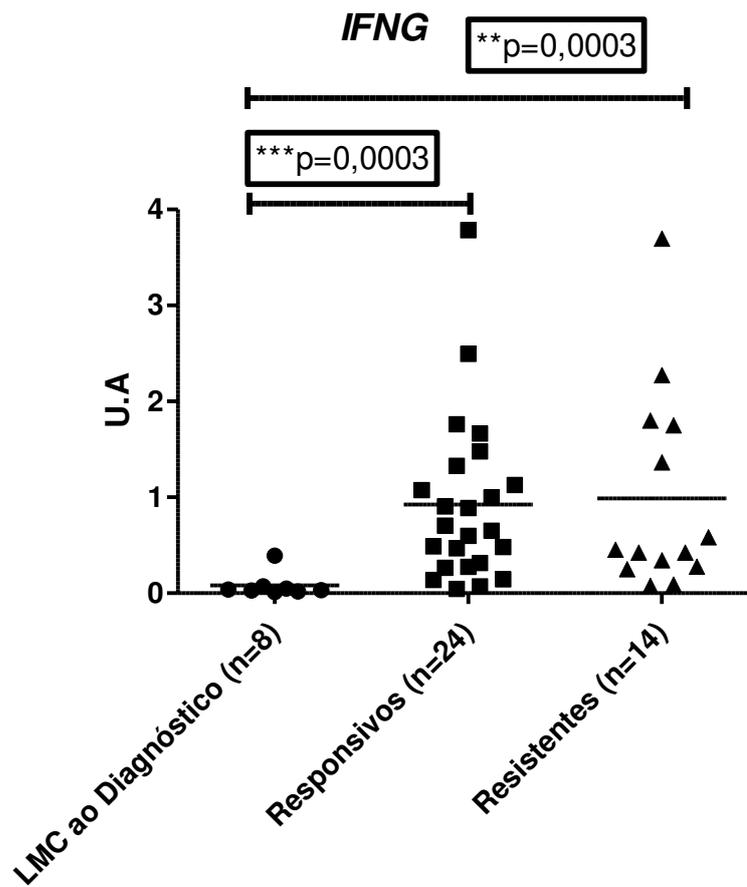


Figura 51. Perfil de expressão do *IFNG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.5.4 Perfil de expressão do gene *ncTNFAIP8* em células mononucleares de pacientes com LMC

ncTNFAIP8 estava hipoexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos doadores saudáveis (controle), (0,21 [0,04 - 0,77] versus (vs) 0,58 [0,26 - 1,3], respectivamente, $P < 0,0046$) e hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,53 [0,13 - 2,8] versus (vs) 0,21 [0,04 - 0,77], respectivamente, $P = 0,0051$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 52).

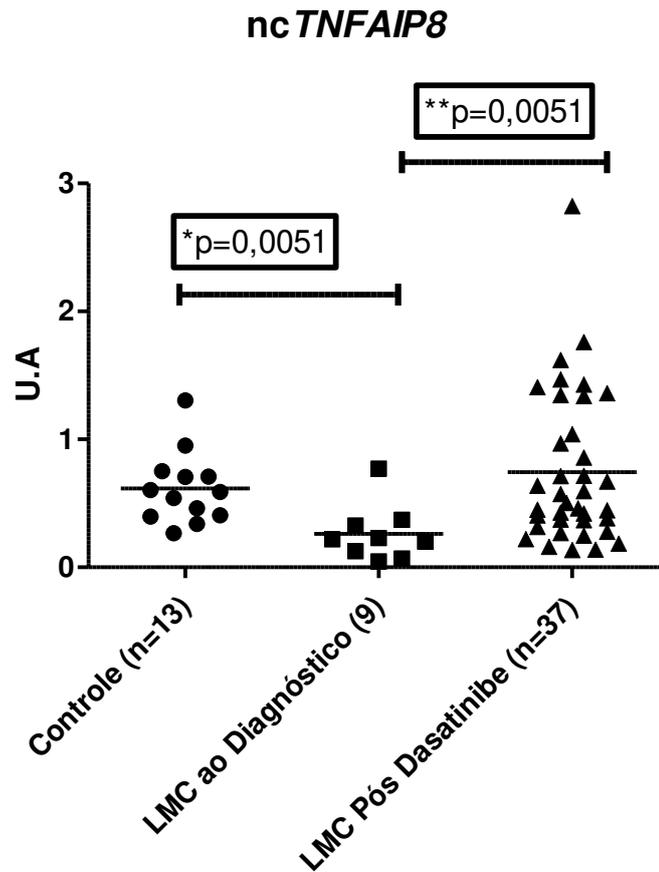


Figura 52. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

ncTNFAIP8 estava hiperexpresso nos pacientes responsivos em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,50 [0,16 - 2,8] versus (vs) 0,21 [0,04 - 0,77], respectivamente, $P=0,0086$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,57 [0,13 - 1,7], respectivamente, $P=0,0100$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 53).

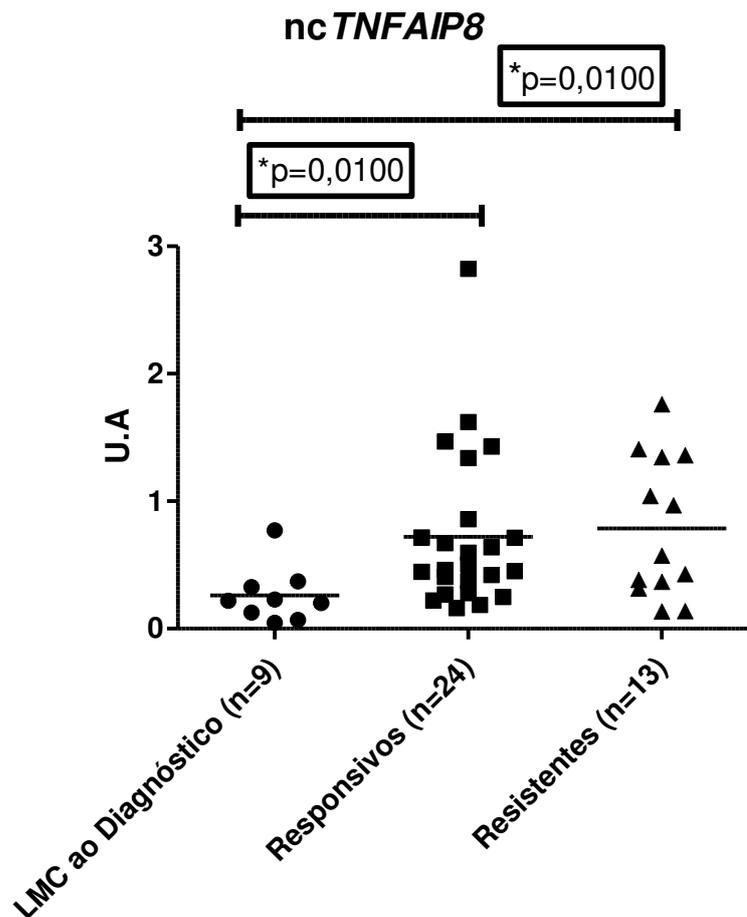


Figura 53. Perfil de expressão do *ncTNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.5.5 Perfil de expressão do gene *TNFAIP8* em células mononucleares de pacientes com LMC

TNFAIP8 estava hipoexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação aos pacientes saudáveis (controle), (0,22 [0,02 - 0,57] versus (vs) 0,78 [0,19 - 4,8], respectivamente, $P=0,0034$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo]. Não houve diferença de expressão entre os pacientes com LMC ao Diagnóstico em relação aos pacientes com LMC pós tratamento com dasatinibe ($P=NS$) (figura 54).

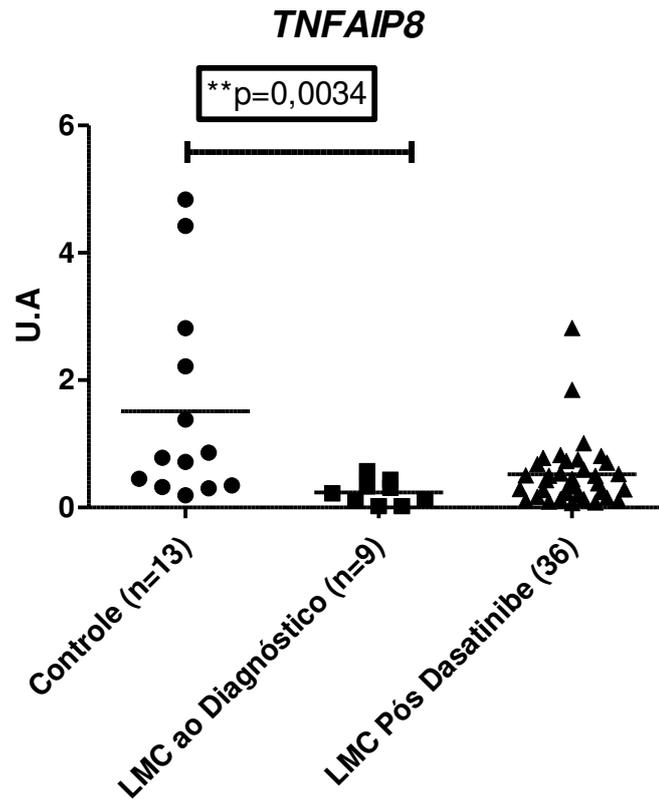


Figura 54. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

Não houve diferença de expressão entre os pacientes com LMC ao diagnóstico, pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe ($P = NS$) (figura 55).

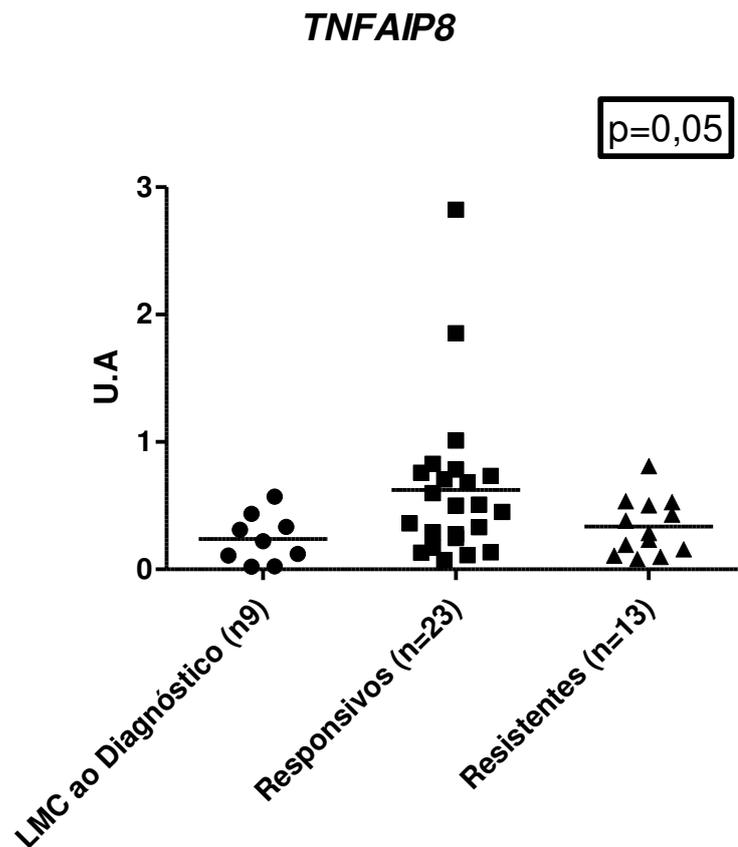


Figura 55. Perfil de expressão do *TNFAIP8* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

4.5.6 Análise Perfil de expressão do gene *FASLG* em células mononucleares de pacientes com LMC

FASLG estava hiperexpresso nos doadores saudáveis (controle) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,70 [0,33 - 4,1] versus (vs) 0,008 [0,002 - 0,019], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,54 [0,05 - 4,9] versus (vs) 0,008 [0,002 - 0,019], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 56).

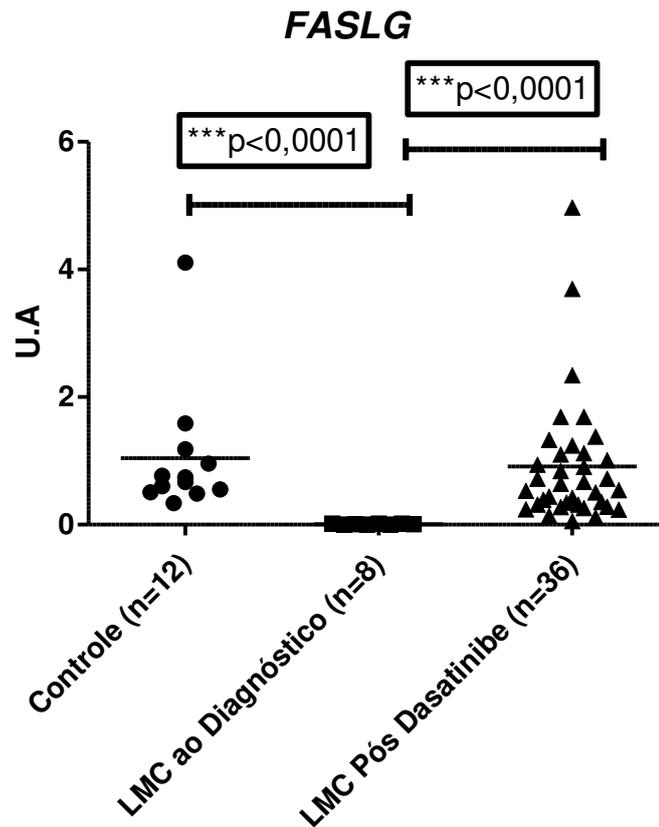


Figura 56. Perfil de expressão do *FASLG* em doadores saudáveis versus (vs.) pacientes com LMC pós dasatinibe versus (vs.) pacientes com LMC ao diagnóstico. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

FASLG estava hiperexpresso nos pacientes responsivos ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,59 [0,14 - 4,9] versus (vs) 0,008 [0,002 - 0,019], respectivamente, $P < 0,0001$) e hiperexpresso nos pacientes resistentes ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, (0,42 [0,05 - 3,6] versus (vs) 0,008 [0,002 - 0,019], respectivamente, $P < 0,0001$). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo - máximo] (figura 57).

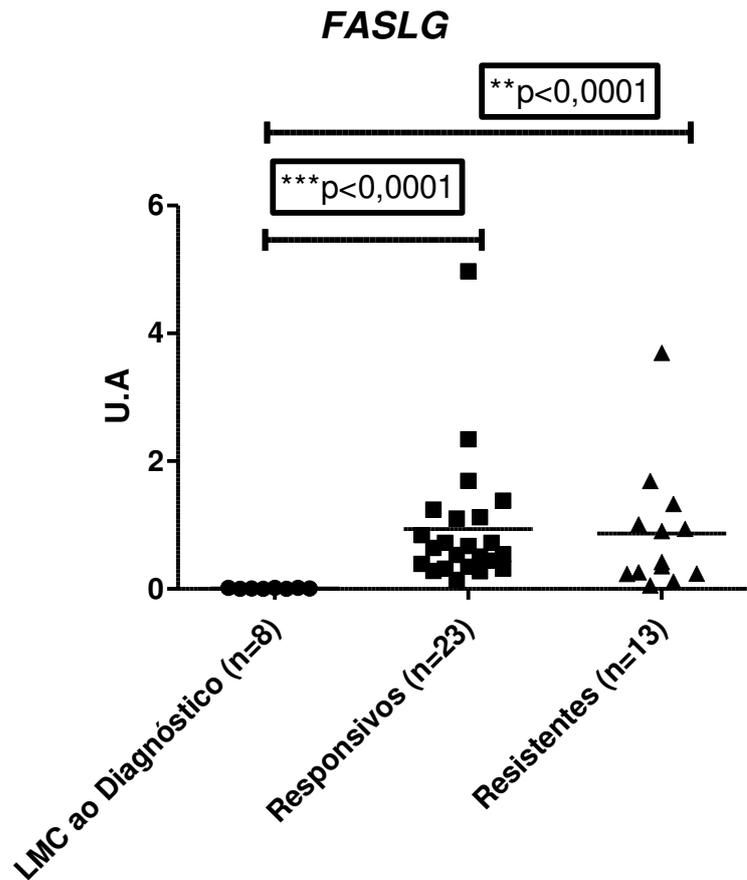


Figura 57. Perfil de expressão do *FASLG* em pacientes com LMC ao diagnóstico versus (vs.) pacientes responsivos ao dasatinibe (vs.) pacientes resistentes ao dasatinibe. Análise estatística realizada pelo teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $P < 0,05$ como significativo.

5. DISCUSSÃO

A LMC é uma das doenças neoplásicas hematológicas mais estudadas e caracterizadas. Novas terapias alvo surgiram através do entendimento das bases moleculares dessa doença. A terapia com imatinibe mudou o prognóstico dos pacientes com LMC ^{30,90}, aumentando sua sobrevida.

Apesar da eficácia do imatinibe, alguns pacientes ainda desenvolvem resistência ao tratamento, sendo necessário o uso dos TKI de segunda e terceira geração. Mutações do BCR-ABL são responsáveis por cerca de 50% dos casos de resistência^{53,91}. No entanto, outros mecanismos ainda não conhecidos podem estar envolvidos na resistência aos TKI. Os resultados de um estudo prévio do nosso grupo ⁶⁷, identificou conjuntos de genes diferencialmente expressos através da análise de microarranjos, a partir de comparação de subgrupos de amostras pré e pós-tratamento de pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe. No presente estudo selecionamos alguns genes identificados nesse trabalho anterior que apresentavam maior diferença de expressão e que poderiam estar relacionados a outros mecanismos de resistência: *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG*.

O gene *TARP* é um gene codificante de proteínas, previamente descrito com expressão alterada em células de câncer de próstata e mama ⁶⁸. *TARP* foi expresso em mais de 90% dos casos de câncer de próstata ⁹² levando a um comportamento tumoral mais agressivo nesses tumores ^{71,72}. Há um recente estudo de fase 1 que avaliou o uso de vacinas de células dendríticas dirigidas a epitopos do *TARP* em câncer de próstata ⁹³. No entanto, seu papel na fisiopatologia e prognóstico na LMC ainda não foi estudado.

Neste presente estudo, não encontramos diferença de expressão de *TARP* entre os pacientes responsivos e resistentes ao imatinibe e dasatinibe, porém encontramos aumento da expressão de *TARP* em amostras de pacientes de LMC ao diagnóstico e pacientes com LMC pós tratamento com imatinibe ou dasatinibe, em relação ao grupo controle.

No estudo de Silveira et al, ⁶⁷ na análise de microarranjos, a expressão de *TARP* estava aumentada nas amostras de pacientes pré-tratamento com dasatinibe (pacientes com falha anterior ao imatinibe), porém somente no grupo de pacientes que posteriormente respondeu ao tratamento com dasatinibe. Por outro lado, *TARP* estava hipoexpresso nos pacientes pré-tratamento do grupo não responsivo ao

dasatinibe. Não podemos fazer uma comparação direta dos resultados atuais com esse estudo, pois a população estudada foi diferente. O grupo de Sokal alto risco apresentou maior expressão de *TARP*. No entanto, não houve diferença significativa nas SG, SLP e SLE nos casos com alta expressão de *TARP*. Esses resultados são limitados em parte pelo pequeno número de casos. No nosso estudo, após a resistência ao imatinibe, todos os pacientes foram tratados com TKI de segunda geração. Futuros estudos funcionais poderão contribuir para um melhor entendimento do papel do *TARP* na fisiopatologia da LMC.

O gene *AKT1* tem papel importante nas vias de sinalizações celulares, na LMC e em outros tipos de câncer⁸⁴. A ativação compensatória da via PI3K/Akt/mTor induzida por imatinibe pode ser um mecanismo para a persistência de células leucêmicas em pacientes tratados com imatinibe⁹⁴. Em nosso estudo, observamos hipoexpressão de *AKT1* nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação ao grupo controle. Não houve diferença de expressão entre os pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe. Porém, foi hipoexpresso nos pacientes resistentes ao imatinibe quando comparado aos pacientes resistentes e ao diagnóstico. *AKT1* estava hiperexpresso nos pacientes com LMC pós tratamento com imatinibe e dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

Nossos resultados pela análise de PCR quantitativo foram controversos aos encontrados pela análise de microarranjos, onde o *AKT1* foi encontrado hipoexpresso nos pacientes pré-tratamento não responsivos e hiperexpresso nos pacientes pós-tratamento não responsivos. Porém, temos que considerar são coortes diferentes de pacientes. O estudo atual analisou uma coorte responsiva e comparou com uma coorte resistente e o estudo de microarranjos avaliou a expressão dos mesmos casos pré e pós tratamento com dasatinibe e depois os categorizou como resistentes ou responsivos. Outros métodos seriam necessários para melhor avaliação da AKT nesse cenário, como avaliação da expressão da proteína por Western blott ou citometria de fluxo. A avaliação da expressão gênica é limitada, pois podem ocorrer alterações pós translacionais ou modulação da expressão por outros genes.

Em relação ao gene *IFNG*, nossos resultados mostraram hipoexpressão de *IFNG* nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação ao grupo controle. Não houve diferença de expressão entre os pacientes responsivos ao imatinibe ou dasatinibe e os pacientes resistentes ao imatinibe ou dasatinibe. Entretanto, *IFNG*

estava hiperexpresso pós tratamento com imatinibe ou dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico e hiperexpresso nos pacientes com LMC responsivos ao imatinibe ou dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico. Observamos também hiperexpressão nos casos resistentes ao imatinibe e dasatinibe em relação ao diagnóstico, confirmando os dados encontrados na análise de microarranjos. Kim et al,⁹⁵ identificaram vários polimorfismos do IFNG e sua associação com os resultados do tratamento da LMC com imatinibe, alguns deles relacionados com obtenção de RCC e RMM e outros associados à resistência.

Quanto ao gene *ncTNFAIP8*, é um regulador da apoptose e tem importante função na proliferação, invasão, metástase e progressão de tumores malignos em câncer endometrial e câncer gástrico. Está relacionado com a patogênese de diversas neoplasias^{76,77}. Na literatura há escassos dados sobre o papel do *TNFAIP8* nas neoplasias hematológicas. Além do estudo de Silveira e al, há somente um estudo que demonstrou a hiperexpressão de *TNFAIP8* na linhagem K562⁹⁶. No presente estudo mostramos que não houve diferença de expressão entre os pacientes com LMC responsivos ao imatinibe ou dasatinibe em relação aos pacientes resistentes ao imatinibe ou dasatinibe. O *ncTNFAIP8* apresentou hiperexpressão nos pacientes com LMC pós dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico, corroborando os resultados encontrados na análise de microarranjos, onde o *ncTNFAIP8* estava hiperexpresso nos pacientes pré dasatinibe (previamente tratados com imatinibe). Quando comparamos os resultados do *ncTNFAIP8* com o *TNFAIP8* dos pacientes tratados com dasatinibe os resultados são semelhantes. Entretanto, quando comparamos os resultados do *ncTNFAIP8* e *TNFAIP8* dos pacientes tratados com imatinibe, observamos hiperexpressão no grupo responsivo ao imatinibe em relação ao grupo resistente. O gene *ncTNFAIP8* não foi descrito na LMC anteriormente.

Com relação ao gene *FASLG*, é um indutor de apoptose através da ativação das caspases. A via Fas/*FASLG* de apoptose tem importante papel no mecanismo de ação do imatinibe. No presente estudo, observamos hiperexpressão de *FASLG* no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico e uma hiperexpressão nos pacientes com LMC responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes resistentes. *FASLG* também estava hiperexpresso nos pacientes com LMC pós tratamento com imatinibe ou dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico. Quando comparamos os resultados do presente estudo com o da análise de microarranjos, observamos que no estudo de microarranjos, *FASLG* estava

também estava hiperexpresso nos pacientes pós tratamento com dasatinibe (grupo não responsivo). A hiperexpressão de *FASLG* pós tratamento pode também estar relacionada a algum mecanismo de ação do TKI sobre as vias de apoptose e justificam novos projetos nessa área. Apesar do pequeno número de casos analisados, houve uma tendência de maior expressão de *FASLG* no grupo de pacientes com Sokal de baixo risco. Não observamos diferença nas SG, SLP e SLE.

Em resumo, o presente estudo avaliou pela primeira vez a expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em uma coorte de pacientes com LMC ao diagnóstico e após tratamento com imatinibe e dasatinibe. O melhor entendimento das vias em que cada um desses genes atua poderá ampliar o conhecimento de outros mecanismos de resistência e também da ação do TKI nessas vias.

6. CONCLUSÕES

6.1. Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8* e *FASLG* em pacientes tratados com dasatinibe:

- *TARP*: hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação ao grupo controle, pacientes com LMC pós dasatinibe e em pacientes responsivos ao dasatinibe.

- *AKT1*: hiperexpresso no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico e hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe e nos pacientes responsivos ao dasatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

- *IFNG*: hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe (nos responsivos e resistentes) em relação ao grupo controle e pacientes com LMC ao diagnóstico.

- *ncTNFAIP8*: hiperexpresso no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico; hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

- *TNFAIP8*: hiperexpresso no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

- *FASLG*: hiperexpresso no grupo controle em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico; hiperexpresso nos pacientes com LMC pós dasatinibe (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

6.2. Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8* e *FASLG* em pacientes tratados com imatinibe:

- *TARP*: hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico e pós imatinibe em relação ao grupo controle; hiperexpresso nos pacientes com Sokal alto risco em relação ao grupo Sokal baixo risco

- *AKT1*: hiperexpresso no grupo controle e nos pacientes com LMC pós imatinibe (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico; hiperexpresso nos pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes resistentes ao imatinibe e hiperexpresso nos pacientes resistentes.

- *IFNG*: hiperexpresso no grupo controle e nos pacientes com LMC pós tratamento (responsivos e resistentes) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

- *ncTNFAIP8*: hiperexpresso nos pacientes com LMC ao diagnóstico em relação ao grupo controle.

- *TNFAIP8*: hiperexpresso nos pacientes com LMC pós imatinibe e pacientes responsivos ao imatinibe em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico; hiperexpresso nos pacientes responsivos em relação aos resistentes.

- *FASLG*: hiperexpresso no grupo controle e nos pacientes com LMC pós imatinibe (resistentes e responsivos) em relação aos pacientes com LMC ao diagnóstico.

6.3. Análise de sobrevidas:

Não houve alterações significativas na SG, SLP e SLE dos pacientes tratados com imatinibe de acordo com a expressão gênica de *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8* e *FASLG*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic Myeloid Leukemia. *Am. Soc.Hematol*, p.132-152, 2003.
3. Deininger MW. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(2):59-72.
4. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):441-53.
5. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108(6):1809-1820.
6. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041-6051.
7. Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M and Thiele J. Chronic myelogenous leukemia BCR-ABL1 positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al, eds. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lion: IARC; 2008: 32-37.
8. Arber et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*.2016
9. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.*Science*. 1960;132:1497.

10. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*.1973;243:290-293.
11. KANTARJIAN H, SCHIFFER C, JONES D et al: Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*;111(4):1774-80.2008.
12. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Cancer*. 2005;5(3):172–183.
13. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*.1990;247(4946):1079-82.
14. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-30.
15. KANTARJIAN, H. M., et al. - Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, Vol.13,nº 4 (2007): p. 1089-97.
16. KANTARJIAN, H. M., et al. - New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med*, Vol.145,nº 12 (2006): p. 913-23.
17. FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. - Chronic Myeloid leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J*, Vol.76,nº 1 (2007): p. 8-17.
18. WALZ, C.; SATTLER, M. - Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit Rev Oncol Hematol*, Vol.57,nº 2 (2006): p. 145-64.

19. STEELMAN, L. S., et al. - JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR - ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, vol.18, n° 2 (2004):p. 189-218.
20. DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. - Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, Vol.13,n° 22 (1999): p. 2905-27.
21. HAZLEHURST, L. A., et al. - Signaling networks associated with BCR-ABLdependent transformation. *Cancer Control*, Vol.16,n° 2 (2009): p. 100-7.
22. Lichtman M. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In:Williams W, Beutler E, Marshall AL, Barrys SC, Thomas JK. *Hematology*. 5nd. New York: Mc Graw-Hill, 1995.
23. Fabarius A1, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Jotterand M, Reiter A, Jung-Munkwitz S, Proetel U, Schwaab J, Hofmann WK, Schubert J, Einsele H, Ho AD, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Lauseker M, Pfirrmann M, Hasford J, Saussele S, Hehlmann R; Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK) and the German CML Study Group. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6760-8. doi: 10.1182/blood-2011-08-373902. Epub 2011 Oct 28.
24. Giles FJ, Abruzzese E, Rosti G, et al. Nilotinib is active in chronic and accelerated phase chronic myeloid leukemia following failure of imatinib and dasatinib therapy. *Leukemia*. 2010;24(7):1299–1301.
25. HENKES, M.; VAN DER KUIP, H.; AULITZKY, W. E. - Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevectrade mark). *Ther Clin Risk Manag*, Vol.4,n° 1 (2008): p. 163-87.

26. Jabbour E, Cortes JE, Giles FJ, O'Brien S, Kantarjian HM. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;109(11):2171–2181.
27. Innes AJ, Apperley JF. Chronic Myeloid Leukemia-Transplantation in the Tyrosine Kinase Era. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014;28(6):1037–1053.
28. KANTARJIAN, H. M., et al. - Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*, Vol.97,nº 4 (2003): p. 1033-41.
29. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Palandri F, Rosti G. Treatment Recommendations for Chronic Myeloid Leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1).
30. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1031–1037.
31. Von Bubnoff N, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2010;107(7):114–121.
32. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res*. 2013;3(3):191–200.
33. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041–6051.
34. Bendit I, Sanabani SS, Conchon M, et al. Evaluation of long-term outcomes, cytogenetic and molecular responses with imatinib mesylate in early and late chronic-phase chronic myeloid leukemia: a report from a single institute. *Acta haematologica*. 2012;128(4):223–232.

35. CELLA, D.; NOWINSKI, C.; FRANKFURT, O. The impact of symptom burden on patient quality of life in chronic myeloid leukemia. *Oncology*, v. 87, n. 3, p. 133-147, jul. 2014.
36. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(6):1054-61.
37. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(7):2640-53.
38. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872–884.
39. Santos FPS, Kantarjian H, Quintás-Cardama A, Cortes J. Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2011;17(6):465–476.
40. Hochhaus A. Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. *Expert Opinion*. 2007;8(18):3257-64.
41. Hochhaus A. Management of Bcr-Abl-positive leukemias with dasatinib. *Drug Profile*. 2007;7(11):1529-36.
42. WEI, G.; RAFIYATH, S. LIU, D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J. Hematol. Oncol.*, v. 3, n. 47, 2010.
43. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Jones D, et al. Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood*. 2007;109(2):497–499.

44. Giles FJ, Abruzzese E, Rosti G, et al. Nilotinib is active in chronic and accelerated phase chronic myeloid leukemia following failure of imatinib and dasatinib therapy. *Leukemia*. 2010;24(7):1299–1301.
45. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The lancet oncology*. 2007;8(11):1018–1029.
46. Milojkovic D, Apperley JF, Gerrard G, et al. Responses to second-line tyrosine kinase inhibitors are durable: an intention-to-treat analysis in chronic myeloid leukemia patients. *Blood*. 2012;119(8):1838–1843.
47. Peng B, Hayes M, Resta D, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of clinical oncology*. 2004;22(5):935–942.
48. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells : implications for drug resistance. *Blood*. 2004;104(12):3739–3746.
49. Dwyer MEO, Mauro MJ, Kurilik G, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*. 2002;100(5):1628–1633.
50. Dwyer MEO, Mauro MJ, Blasdel C, et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood*. 2004;103(2):451–455.
51. Bhatia R, Holtz M, Niu N, et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*. 2003;101(12):4701–4707.
52. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. 2006;107(11):4532–4539.

53. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276–283.
54. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chr. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(18):4100–4109.
55. Mathisen MS, et al. Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):347-9.
56. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyro-sine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BRC-ABL mutation really matter? *Blood*. 2009;114(27):5426–35).
57. GORRE, M. E., et al. - Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, Vol.293,nº5531(2001): p.876-80.
58. BIXBY, D.; TALPAZ, M. - Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, nº (2009): p. 461-76.
59. MELO, J. V.; CHUAH, C. - Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett*, Vol.249,nº 2 (2007): p. 121-32.
60. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(24):7374–7379.

61. Kim S, Kim D, Kim D, et al. Analysis of Bcr-Abl kinase domain mutations in Korean chronic myeloid leukaemia patients : poor clinical outcome of P-loop and T315I mutation is disease phase dependent. *Hematological Oncology*. 2009;27:190–197.
62. Nicolini FE, Hayette S, Corm S, et al. Clinical outcome of 27 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients harboring a T315I BCR-ABL mutation. *Haematologica*. 2007;92(9):1238–1241.
63. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2075–2088.
64. Pagnano. KB.et al, BCR-ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia treated With Tyrosine Kinase Inhibitors and Impact on Survival. *Cancer Investigation*,2015.
65. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2075–2088.
66. Soverini S, de Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Jun;15 Suppl:S120-8. doi: 10.1016/j.clml.2015.02.035.
67. SILVEIRA, R. et al. Avaliação da resistência aos inibidores de tirosinoquinases em pacientes com leucemia mieloide crônica pela pesquisa de mutações do gene bcr-abl e análise do perfil de expressão gênica de pacientes tratados com imatinibe e dasatinibe, 2013.
68. Hiroshi Maeda, et al. The T Cell Receptor α Chain Alternate Reading Frame Protein (*TARP*), a Prostate-specific Protein Localized in Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2004.

69. ZHAO Li-jun, et al. Value of T cell receptor gamma alternate reading frame protein and keratin 5 in endometrial carcinoma. *Chin Med J* 2013;126 (22).
70. Curt D. Wolfgang, et al. *TARP*: A nuclear protein expressed in prostate and breast cancer cells derived from an alternate reading frame of the T cell receptor g chain locus Laboratory of Molecular Biology, Division of Basic Sciences, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Building 37, Room 4E16, Bethesda, MD 20892
71. Fritzsche FR, Stephan C, Gerhardt J, Lein M, Hofmann I, Jung K, et al. Diagnostic and prognostic value of T-cell receptor gamma alternative reading frame protein (*TARP*) expression in prostate cancer. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):733-9.
72. Tang S, Bhatia B, Maldonado CJ, Yang P, Newman RA, Liu J, et al. Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(18):16189-201.
73. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Genetics.* 2009;10:155–159.
74. Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, Calin G a. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene.* 2012;31(43):4577–4587.
75. Gibb E a, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular cancer.* 2011;10(38):1–17.
76. Tianbo L, Hongyu G, Meng Y, et al. Correlation of *TNFAIP8* overexpression with the proliferation, metastasis, and disease-free survival in endometrial cancer. *International Society of Oncology and BioMarkers.* 2014; 35:5805–5814.
77. Yansen L, Changqing J, Yuezhi C, et al. Expression of tumor necrosis factor α -induced protein 8 is upregulated in human gastric cancer and regulates cell

- proliferation, invasion and migration. *Molecular Medicine Reports* . 2015; 12: 2636-2642.
78. Yunwei Lou, Suxia Liu. The TIPE (*TNFAIP8*) family in inflammation, immunity, and cancer. *Molecular Immunology*. 2011
79. LING CHEN. et al, Association between the expression levels of tumor necrosis factor- α -induced protein 8 and the prognosis of patients with gastric adenocarcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016; 12: 238-244,
80. Zhitong Wu. et al, Association of Interferon Gamma β 874T/A Polymorphism and Leukemia Risk. *Medicine*. 2016; 95(12):e3129
81. Kim DH, Kong JH, Byeun JY, Jung CW, Xu W, Liu X, et al. The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2010;16(21):5339-50.
82. Jason D. Lickliter. et al, Fas ligand is highly expressed in acute leukemia and during the transformation of chronic myeloid leukemia to blast crisis. *Experimental Hematology* 27 (1999) 1519–1527
83. Ravandi F, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenousleukemia: associations and significance. *Cancer*.2001 Jun1;91(11): 1964-72.
84. DATTA, S. R. et al, *Genes Dev*, Vol.13, nº 22 (1999): p. 2905-27
85. Vara JAK, Casado E, Castro J de, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barín M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:193-204.
86. Luciana Meija Lage. GBETH Newsletter. Volume 05 Número 21 05 de agosto de 2007

87. Yanjuan Tang. et al, Coexpression of hyperactivated *AKT1* with additional genes activated in leukemia drives hematopoietic progenitor cells to cell cycle block and apoptosis. *Experimental Hematology* 2015;43:554–564
88. Hilmar Quentmeie et al, BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. Quentmeier et al. *Journal of Hematology & Oncology* 2011, 4:6
89. Aggeliki Tserga. et al, Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016
90. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitor and prognostic implications *Cancer*. 2008;112:2112-2118.
91. Volpe G, Panuzzo C, Ulisciani S, et al. Imatinib resistance in CML. *Cancer Lett* 2008, doi:10.1016/j.canlet.2008.06.003.
92. Essand, M., Vasmatazis, G., Brinkmann, U., Duray, P., Lee, B. and Pastan, I., High expression of a specific T-cell receptor gamma transcript in epithelial cells of the prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999 96: 9287–9292.
93. Castiello L1, Sabatino M2, Ren J3, Terabe M4, Khuu H5, Wood LV6, Berzofsky JA7, Stroncek DF8. Expression of CD14, IL-10 and tolerogenic signature in dendritic cells inversely correlate with response to *TARP* vaccination in prostate cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 10. pii: clincanres.2199.2016. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2199.
94. Burchert A1, Wang Y, Cai D, von Bubnoff N, Paschka P, Müller-Brüsselbach S, Ottmann OG, Duyster J, Hochhaus A, Neubauer A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia*. 2005 Oct;19(10):1774-82.

95. Kim DH, et al, The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2010;16 (26):5339-50
96. T Liu, et al, TNFAIP8 as a predictor of metastasis and a novel prognostic biomarker in patients with epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer* (2013) 109, 1685–1692 | doi: 10.1038/bjc.2013.501
97. Fardel S, Talpaz M, Estrov Z, et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J. Med* 1999; 341:164-172

8. APÊNDICES

Tabela 14. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em leucócitos totais de pacientes com LMC ao diagnóstico

Amostra	Expressão Gene <i>TARP</i>	Expressão Gene <i>AKT1</i>	Expressão Gene <i>IFNG</i>	Expressão Gene <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>TNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>FASLG</i>
1	0,71258318	0,54586334	0,1306994	1,274684821	1,37614575	0,191191909
2	0,57491698	0,93427081	0,01613692	0,884209522	0,468919304	Não Avaliado
3	0,60257819	0,74591424	0,16793689	1,377058466	1,092231963	0,680507551
4	1,18103229	0,76549849	0,01023327	1,255389888	0,414139443	0,065185836
5	0,17000974	0,59350285	0,02386298	0,776906431	0,135190146	0,14598714
6	0,2582668	1,84027813	0,05895072	0,642153687	0,609819908	0,597018661
7	0,33743623	1,47220603	0,2035119	0,286781865	0,480850955	0,367803186
8	0,37675129	0,83215893	0,02903598	0,695756339	0,285842555	0,112435379
9	1,28674794	0,83075684	Não Avaliado	1,222527909	0,540496842	Não Avaliado
10	0,62361251	0,48836026	0,03278071	0,486848885	0,257009591	0,011615438
11	0,68424787	0,47381654	0,01461488	1,245384529	0,361773176	0,048694868
12	0,11557955	1,00663027	0,20647733	0,383626427	0,226955936	Não Avaliado
13	0,50381944	0,48095999	0,04409624	1	0,433303382	0,14284024
14	0,33834866	0,40475286	Não Avaliado	1,226925593	0,489209059	Não Avaliado
15	0,44518845	0,6579855	Não Avaliado	1,640239275	0,459594736	Não Avaliado
16	1,35535979	0,32258582	0,00221402	0,747669192	0,305169871	0,004671666
17	0,48209699	0,63280641	0,05843772	0,133240443	0,520143658	0,037682353
18	0,81070472	0,25757902	Não Avaliado	1,068758444	0,730728381	0,00389071
19	1,13997564	0,32115836	0,01841126	0,768800811	0,848648424	Não Avaliado
20	0,20668572	0,46233411	0,03813156	0,545613335	0,54528234	0,005946197
21	0,61298042	0,84474733	0,35296166	0,444599382	2,473154921	0,13783809
22	0,4236244	0,31561589	0,01277506	0,9073054	0,79494093	0,005628697
23	0,42245185	0,38568067	0,00808858	0,548999314	0,596587857	0,006279096
24	0,98137573	0,27060487	0,00651035	1,111649769	0,99535185	0,002455477
25	0,45740767	0,31885874	Não Avaliado	0,968674217	1,147166897	Não Avaliado
26	0,296722	0,3519377	0,00172881	0,692047801	0,232247493	0,035793367
27	1,04856175	0,3445057	Não Avaliado	1,136165208	0,273313881	Não Avaliado
28	2,06590226	0,25224165	Não Avaliado	1,28415287	0,303132988	Não Avaliado
29	0,42542067	0,60030327	0,04152055	0,416963017	0,179874022	Não Avaliado
30	0,86179156	0,49840384	0,07337774	2,103810442	0,648587392	0,084323934
31	1,61013586	0,27548108	Não Avaliado	1,936925856	0,422396841	0,124965548

Tabela 15. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em leucócitos totais de pacientes responsivos ao imatinibe

Amostra	Expressão Gene <i>TARP</i>	Expressão Gene <i>AKT1</i>	Expressão Gene <i>IFNG</i>	Expressão Gene <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>TNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>FASLG</i>
1	1,615556164	2,17847229	0,284728965	0,575446623	0,931891803	1,881811044
2	1,755585903	1,27473032	0,590392416	1,159723882	1,507212364	1,115007175
3	0,240192441	1,07930645	0,487318334	0,198581719	1,15356136	0,390170765
4	0,321631277	1,4732886	0,20776693	0,40032644	0,514821701	0,420968261
5	0,717163664	1,33800811	1,681872877	0,559089783	2,707304616	3,193263626
6	0,619499291	1,55364442	0,825485763	1,581172237	5,685408994	2,815806883
7	0,525125104	1,88336911	0,487294817	1,356763567	2,696179946	1,958141856
8	0,570299125	1,44325617	0,697628891	0,113075488	0,59238694	0,270110543
9	2,094096676	1,74860429	0,668649033	0,805366538	1,468700911	2,625637537
10	0,197746634	1,31123855	0,166636993	0,262039952	0,838636538	0,630166135
11	1,336621976	1,56303393	0,849112488	1,366372421	1,524353191	3,415777342
12	Não Avaliado	2,33436802	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado
13	0,138390813	1,60065066	0,080225289	0,337907886	1,674834523	0,229547926
14	0,59054425	1,6707807	0,481530383	0,650323537	1,453078902	0,881078094
15	0,584125378	1,70850407	1,396012437	0,793210288	2,562919352	2,542054472
16	1,042857553	1,36600938	0,483515623	0,669602227	2,230172091	1,80656071
17	0,120672846	1,5205892	0,280732648	0,367480208	1,020712993	0,478947891
18	0,19320168	1,43289352	0,267657362	0,40530842	1,409140848	0,536741982
19	1,46910582	1,14790877	1,147537014	0,952685431	1,925258475	2,579448369
20	1,537288596	1,35665774	0,727476098	1,570431691	3,446667249	Não Avaliado
21	0,493384866	1,41587202	0,457368063	0,481432673	1,114442729	0,908758585
22	0,398790832	1,01668944	2,782731024	0,874053663	2,782731024	1,748583483
23	1,878033246	0,55449934	1,878033246	0,289596343	1,878033246	Não Avaliado
24	0,440126884	1,39544779	0,141576165	0,580603353	0,525982512	2,221596828
25	Não Avaliado	1,98746521	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado
26	Não Avaliado	2,49386146	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado
27	0,434483644	1,10343243	0,577174668	0,551430727	0,636631642	Não Avaliado
28	0,920089797	Não Avaliado	0,560627865	0,532608172	1,042695563	1,32259717
29	1,950370188	1,72822653	0,108839841	1,50289949	1,027926242	3,918759394
30	1,206581627	1,66006452	0,18320864	1,834320895	1,051758512	5,273468635
31	1,023747697	1,80706473	2,217048964	2,217048964	2,217048964	4,202800721
32	1,173887115	1,87375265	1,543719343	2,031632245	2,42561382	1,772860931

Tabela 16. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em leucócitos totais de pacientes resistentes ao imatinibe

Amostra	Expressão Gene <i>TARP</i>	Expressão Gene <i>AKT1</i>	Expressão Gene <i>IFNG</i>	Expressão Gene <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>TNFAIP8</i>	Expressão Gene <i>FASLG</i>
1	0,277637564	0,299345779	0,018760953	0,192668193	0,352699739	0,00391272
2	0,899419412	1,125179775	0,629689767	1,047608429	1,321037491	0,80087573
3	0,675699181	0,696403749	1,416034883	0,299292357	0,858178301	0,14706469
4	0,230366803	0,587403895	0,122679184	0,411015077	1,273386175	0,07596928
5	2,639414645	0,788979173	0,046888802	0,370233744	0,628193056	0,06847153
6	0,736618981	0,349720875	0,075806695	0,395086423	0,380730497	0,0281855
7	0,33181677	1,017366433	0,213202194	0,438079659	0,98583088	0,07655259
8	0,440750227	0,733710934	1,348390318	1,141596953	2,76220119	0,22078105
9	0,46818091	0,629204192	0,18582392	0,196738633	0,495489065	0,10604656
10	0,200582304	0,79396885	0,619641408	0,709940356	0,888295199	0,1465863
11	0,457708319	0,721525532	2,467121536	0,249245411	0,889521522	0,13373503
12	0,465521353	0,722966896	0,223097579	0,325676536	0,245288473	0,08533942
13	0,273466228	0,875194947	0,122454998	0,166316206	0,174187389	Não Avaliado
14	0,421351343	0,692430809	1,04871772	0,528835399	0,498844523	0,11720178
15	1,63529169	0,235393439	Não Avaliado	0,031435536	0,031028741	0,10372077
16	1,12753334	1,559035321	0,228032519	1,782903376	1,924493758	3,96979683
17	1,018818086	0,796308364	0,028866824	0,778343168	0,479097664	0,46706963
18	0,803822531	1,519495995	1,266986454	1,662738757	1,241535235	0,89431961
19	0,937024352	1,384726138	1,368930028	1,883731433	2,193217684	2,029494
20	0,445480483	2,443806806	0,647781875	1,594002817	1,685736326	1,67138498
21	1,409900225	1,583605272	0,913581324	1,236910197	1,307937692	2,02575312
22	0,648901306	1,707118881	0,283216351	1,937038532	1,236148388	0,97358128
23	1,697609977	1,210837954	0	2,281321758	0,794772823	Não Avaliado
24	0,479722606	2,008315895	0,553475799	1,390744822	1,196996921	1,75250978
25	0,91619092	2,019091383	1,41676238	1,667911605	2,12811871	1,19700404
26	0,47159765	1,863028528	0,095911869	1,977538142	1,07285118	2,09494126

Tabela 17. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico.

Amostra	Expressão <i>TARP</i>	Expressão <i>AKT1</i>	Expressão <i>IFNG</i>	Expressão <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão <i>TNFAIP8</i>	Expressão <i>FASLG</i>
1	0,496602628	0,170371552	Não Avaliado	0,046798724	0,221053257	Não Avaliado
2	0,23740727	0,424861979	0,031774338	0,067939694	0,024788854	0,008303199
3	1,334805736	0,422213992	0,07042636	0,325108681	0,108968487	0,002139093
4	0,860521554	0,451382004	0,018402783	0,218954563	0,120290162	0,015314435
5	1,615360744	0,327173608	0,029868048	0,370436687	0,43516285	0,019643391
6	0,46183744	0,171574412	0,049311818	0,126409116	0,02068425	0,009181857
7	1,037912761	0,848060151	0,03993472	0,201637187	0,570334186	0,015290805
8	0,96531002	0,346493354	0,011080198	0,772429294	0,310317339	0,003578866
9	Não Avaliado	Não Avaliado	0,391984254	0,229525772	0,333949909	0,002659591

Tabela 18. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em células mononucleares de pacientes responsivos ao dasatinibe

Amostra	Expressão <i>TARP</i>	Expressão <i>AKT1</i>	Expressão <i>IFNG</i>	Expressão <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão <i>TNFAIP8</i>	Expressão <i>FASLG</i>
1	1,190073723	1,51955124	0,99988499	2,82270418	2,82270418	2,343273193
2	0,447783934	1,161524535	0,48122459	0,504419276	1,011072401	0,444949256
3	0,172280407	1,294368722	0,3147812	1,621197241	0,705601409	0,279300153
4	0,292667219	1,146688494	0,48858436	0,420220644	0,112441102	0,508962727
5	0,225103363	0,98044979	0,14387335	1,338929166	0,73391855	1,69291335
6	0,096075838	0,726757047	0,27401415	0,713737699	0,130279405	0,280247974
7	0,472803766	0,598131825	0,46891992	0,716798247	0,784828207	0,540376093
8	0,070710214	0,593551888	0,04512433	0,639631261	0,450011543	1,12296993
9	0,18472485	0,692690845	0,59996567	0,450642028	0,072932219	Não Avaliado
10	0,388043608	1,429036989	0,7051948	0,672020255	0,50119559	0,84478754
11	0,35930647	0,980228161	1,12731125	0,4460884	0,828581721	0,722899039
12	0,269057353	1,165567935	1,32907219	0,596885283	0,598733114	1,10452271
13	0,048385232	0,507183703	0,65163946	0,858398428	0,331141659	0,641507517
14	0,966035177	0,895643056	3,78480618	1,42799448	1,852891158	4,971603235
15	0,09959449	0,75493595	2,49492662	0,278475533	0,13456532	0,393326695
16	0,712661849	1,076647817	0,13787254	0,187156662	0,758525571	1,240120335
17	0,045655039	0,709238172	0,07171153	1,467846798	0,246892441	0,143069872
18	0,402544343	0,871274341	1,66590397	0,268730652	0,27570862	1,383083136
19	0,18652319	0,527187258	0,90520926	0,162364365	Não Avaliado	0,721006316
20	0,432393207	0,778853734	1,76302305	0,462217684	0,507698262	0,319991782
21	0,15186847	0,55054348	0,88836978	0,220649447	0,291747394	0,317321676
22	0,103300376	0,517760519	1,07405181	0,374050887	0,683116214	0,532644789
23	0,112587548	0,421629406	0,26586576	0,405079945	0,171045571	0,345659718
24	0,256615403	0,761600939	1,47995537	0,248442183	0,361050723	0,6719172

Tabela 19. Expressão dos genes *TARP*, *AKT1*, *IFNG*, *ncTNFAIP8*, *TNFAIP8* e *FASLG* em células mononucleares de pacientes resistentes ao dasatinibe

Amostra	Expressão <i>TARP</i>	Expressão <i>AKT1</i>	Expressão <i>IFNG</i>	Expressão <i>ncTNFAIP8</i>	Expressão <i>TNFAIP8</i>	Expressão <i>FASLG</i>
1	0,39176225	1,08771004	0,5840528	1,40862304	0,537071345	1,333043955
2	0,24813559	1,04484275	0,3451763	0,38431148	0,109686409	1,691965758
3	0,15726923	0,88240761	0,4565413	0,139964296	0,1932529	0,359980456
4	0,24775239	0,48941089	0,4258483	0,429234968	0,098177353	0,424325334
5	0,22536451	0,74954519	0,4265532	0,368151516	0,529706219	0,940755639
6	0,21585217	0,43701614	1,3655146	1,761193115	0,382789729	0,241384781
7	0,52191604	0,90081948	1,8020082	1,041454255	0,503038727	1,013195988
8	0,04593287	0,61945916	0,0924509	0,574677609	0,159650525	0,11738926
9	1,16597636	0,40585589	0,2517329	0,135479643	0,081423332	0,055559569
10	1,0492683	0,63799451	1,7508863	1,362480571	0,811660809	0,260504215
11	1,21367547	0,33766941	0,0776905	1,346079286	0,23280484	Não Avaliado
12	1,02754783	1,48762748	3,6994872	0,315744638	0,285591736	3,699487152
13	0,18595651	0,43998551	2,2742238	0,968497498	0,430617017	0,905017198
14	Não Avaliado	Não Avaliado	0,2780675	Não Avaliado	Não Avaliado	0,239786317

Tabela 20. Correlações BCR-ABL com expressão genica ao diagnóstico–Pearson

		<i>BCR-</i>	<i>TARP</i>	<i>AKT</i>	<i>IFNG</i>	<i>NCTNFAIP8</i>	<i>TNFAIP8</i>	<i>FASLG</i>
<i>BCR-ABL</i>	Correlação de Pearson	1	-0,172	0,165	0,173	-0,074	-0,289	0,289
	Sig. (2 extremidades)		0,443	0,463	0,506	0,742	0,192	0,338
	N	22	22	22	17	22	22	13

Tabela 21. Correlações Escore de Sokal e expressão gênica – Pearson

		<i>AKT</i>	<i>IFNG</i>	<i>NCTNFAIP8</i>	<i>TNFAIP8</i>	<i>FASLG</i>	Sokal	Sokal
Sokal	Correlação de Pearson	0,517**	-,413*	-0,24	0,142	-0,071	-0,429	1
	Sig. (2 extremidades)	0,01	0,04	0,37	0,489	0,73	0,111	
	N	26	26	16	26	26	15	26

*. A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

**.. A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Tabela 22. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC ao diagnóstico

Amostra	Sexo	Idade na coleta	Fase da doença coleta	Cariótipo	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta %	Leucócitos (Coleta)	Plaquetas
1	F	27	FC	100% Ph	0	0,66	22,5	35,6	932,0
2	M	51	FC	100	1	0,64	130,76	118,3	228,0
3	M	51	FC	Não realizado	0	0,62	182,94	43,2	152,0
4	M	67	FA	100	2	NA	107,69	121,7	1075,0
5	F	67	FC	46XX, -3, +DEL(3)(P14), +DEL(3)(Q21), -16.	0	0,88	20,36	60,2	610,7
6	F	45	FC	100	Não Avaliado	Não tem	1,92	34,9	1064,0
7	F	46	FA	100	0	Não Avaliado	Não Avaliado	133,0	1190,0
8	M	62	FC	100	0	0,78	178,49	86,7	215,0
9	F	53	FC	100	16	1,68	11,9	297,6	381,0
10	F	49	FC	100	5	0,78	69,96	84,9	171,0
11	F	27	FC	100	18	0,83	14,92	154,8	305,0
12	M	32	FC	100	Não Avaliado	Não Avaliado	235,67	158,1	150,0
13	M	19	FC	100	0	0,51	45,88	183,6	415,0
14	M	45	FC	100	0	0,64	60,55	174,7	100,0
15	M	69	FC	100	0	0,82	24,77	52,4	384,0
16	F	48	FC	100	5	1,43	NA	306,0	344,0
17	M	49	FC	100	0	0,69	NA	107,0	523,0
18	M	49	FC	100	4	1,16	NA	194,7	636,0
19	M	29	FC	100	20	0,98	69,95	179,5	206,0
20	M	69	FC	Sem metáfases para análise	0	1,02	65,93	40,9	205,0
21	F	54	FC	100	3	0,87	1,7	32,5	700,0
22	F	77	FC	100	0	1,64	10,34	84,0	201,0
23	F	57	FC	100	0	0,95	2,8	93,8	500,0
24	M	24	FC	100	17	2,51	16,12	447,5	488,0
25	M	67	FC	100	0	0,78	Não Avaliado	109,0	278,0
26	M	92	FC	100	0	1,04	Não tem	75,5	292,4
27	M	22	FC	100	2	2,02	147,89	240,1	187,3
28	M	39	FC	100	9	1,81	28,01	302,0	838,0
29	M	43	CB	46, XY, inv(3)(q21q26.1), t(9;22)(q34;q11) 20 meta	12	Não calcula	56,05	277,2	457,0
30	M	76	FC	100	0	1,22	Não tem	155,2	503,0
31	M	33	FC	100	5	0,9	49,24	261,0	737,0

Tabela 22. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC ao diagnóstico (Cont)

Amostra	Hb	Blastos	Basófilos	Mutação	Óbito	Data início de Imatinibe	Data Fim de imatinibe	RHC	Data RHC	RCC	Data RCC	RMM	Data RMM	Progressão
1	12,5	0	6	Não	Não	10/10/2013	17/02/2016	Sim	07/11/2013	Sim	09/11/2014	Sim	09/11/2014	Não
2	13,8	0	4	Não	Não	29/02/2012	06/01/2016	Sim	29/03/2012	Sim	30/05/2012	Sim	11/03/2013	Não
3	14,4	0	1	Não	Não	31/10/2013	30/03/2016	Sim	02/01/2014	Sim	17/04/2015	Sim	23/12/2015	Não
4	11,8	10	6,5	Não	Não	09/08/2012	10/09/2013	Sim	18/10/2012	Não Avaliado		Não		Não
5	12,4	3	13,5	Não	Não	16/01/2014	10/09/2014	Sim	29/01/2014	Não Avaliado		Sim	07/01/2014	Não
6	11,1	Não tem	2	Não	Sim	28/08/2012	28/11/2012	Sim	31/10/2012	Não Avaliado		Sim	16/04/2013	Sim
7	10,6	16	0	Não	Não	29/05/2013	07/12/2016	Sim	13/04/2013	Sim	06/11/2013	Sim	04/06/2014	Não
8	13,1	1	3	Não	Não	28/05/2013	30/11/2016	Sim	27/08/2013	Sim	13/12/2013	Sim	16/07/2014	Não
9	8,7	4	2	Não	Não	10/05/2012	24/07/2013	Sim	28/06/2012	Não Avaliado		Sim	25/03/2015	Não
10	11,7	1	3,5	Não	Não	20/09/2012	14/12/2016	Sim	22/11/2012	Sim	05/12/2012	Sim	19/03/2013	Não
11	9,6	3,5	1,5	Não	Não	02/10/2013	23/11/2016	Sim	05/11/2013	Sim	07/01/2014	Sim	20/08/2014	Não
12	11,8	12	0	Não	Não	11/04/2012	31/08/2016	Sim	12/06/2012	Sim	06/05/2013	Sim	20/02/2013	Não
13	10,3	1	2	Não	Não	26/06/2013	28/09/2016	Sim	17/09/2013	Sim	11/07/2014	Sim	02/07/2014	Não
14	10,7	2	0,5	Não	Não	08/02/2012	30/11/2016	Sim	04/04/2012	Sim	27/05/2013	Sim	27/09/2016	Não
15	14,2	0	1	Não	Não	22/01/2014	14/12/2016	Sim	12/03/2014	Sim	21/07/2014	Sim	26/11/2014	Não
16	9,0	7,5	4,5	Não	Não	12/12/2014	05/10/2016	Sim	07/01/2015	Não Avaliado		Sim	15/04/2015	Não
17	12,0	0	0	Não	Não	13/05/2010	28/09/2016	Sim	27/05/2010	Sim	12/08/2010	Sim	06/07/2011	Não
18	11,4	4	3,5	Não	Não	31/07/2014	26/10/2016	Sim	13/08/2014	Sim	12/11/2014	Sim	07/07/2015	Não
19	8,7	4	2	Não	Não	29/02/2012	18/07/2012	Sim	15/05/2012	Não Avaliado		Sim	23/05/2013	Não
20	13,9	0	6	Não	Não	09/05/2012	29/04/2015	Sim	19/07/2012	Sim	13/09/2012	Não		Não
21	10,3	0	2	Não	Não	21/09/2011	20/04/2016	Sim	21/12/2011	Sim	09/04/2012	Sim	27/06/2012	Não
22	7,7	5	6,5	Não	Não	19/08/2011	30/11/2016	Sim	30/09/2011	Não Avaliado		Sim	06/03/2012	Não
23	13,2	3	2	Não	Não	06/08/2011	30/11/2016	Sim	14/09/2011	Sim	16/11/2011	Sim	07/03/2012	Não
24	6,8	6	5	Não	Não	19/10/2010	09/11/2016	Sim	04/11/2010	Sim	06/03/2012	Sim	09/05/2012	Não
25	12,2	0	2,5	Não	Não	23/09/2010	05/10/2016	Sim	15/12/2010	Sim	31/10/2011	Sim	28/03/2012	Não
26	10,9	0	3	Não	Não	07/08/2012	27/08/2014	Sim	20/09/2012	Sim	30/01/2013	Sim	08/05/2013	Não
27	10,3	1	1	Não	Não	27/10/2011	09/10/2013	Sim	10/01/2012	Sim	23/05/2012	NA		Não
28	6,5	7	3,5	Não	Não	18/07/2011	23/11/2016	Sim	02/08/2011	Sim	23/01/2012	Sim	07/12/2011	Não
29	10,0	31,5	0,5	Não	Sim	09/01/2013	02/03/2015	Sim	20/02/2013	Não Avaliado		Não		Sim
30	12,6	3	3	Não	Não	11/03/2014	05/10/2016	Sim	26/03/2014	Sim	18/06/2014	Sim	19/12/2014	Não
31	11,2	2,1	7	Não	Sim	22/09/2010	29/08/2012	Sim	19/10/2010	Sim	04/01/2013	Sim	19/06/2013	Sim

Tabela 23. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC responsivos ao imatinibe

Amostra	Sexo	Idade na coleta	Fase da doença	Cariótipo (%)	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta	Leucócitos	Plaquetas	Hb	Blastos	Basófilos
1	F	27	FC	0	0	0,66	0,028	3,4	189,0	11,3	0	0,2
2	M	20	FC	20% em 18/12/2013	0	0,51	0,03	5,4	151,0	14,0	0	0,5
3	F	55	FC	0	0	0,78	0,007	4,5	276,0	10,1	0	0,2
4	M	52	FC	0	1	0,64	0,068	7,2	229,0	12,7	0	0,7
5	M	70	FC	0	0	0,82	0,05	3,9	160,0	13,5	0	0,5
6	M	58	FC	0	0	1,03	0,05	5,3	213,0	13,7	0	0,9
7	F	57	FC	0	0	0,95	0,003	3,0	197,0	12,7	0	0,6
8	M	43	FC	0	0	0,57	0,002	7,4	294,4	15,6	0	1,1
9	M	53	FC	0	0	0,74	0,08	5,7	247,0	14,4	0	0,9
10	M	55	FC	0	1	0,72	0,07	10,6	249,4	10,8	0	0,7
11	F	58	FC	0	0	0,98	0,03	5,2	183,0	13,0	0	0,9
12	F	50	FC	0	4	0,92	0,07	4,8	254,0	10,8	0	0,9
13	M	24	FC	0	0	0,46	0,03	5,3	211,2	13,1	0	0,4
14	F	88	FC	0	8	1,64	0,03	3,8	205,0	10,2	0	0,9
15	F	55	FC	0	3	0,88	0,003	4,2	348,0	11,1	0	0,8
16	M	40	FC	0	9	1,81	Indetectável	7,9	278,0	14,2	0	0,8
17	F	60	FC	0	6	1,3	0,02	6,1	195,0	11,7	0	0,6
18	M	93	FC	0	0	1,04	0,01	5,6	228,0	11,8	0	0,4
19	F	47	FC	0	0	Não Calcula	0,007	3,4	66,0	12,7	0	0,4
20	M	29	FC	0	14	1,78	0,06	4,6	210,0	16,0	0	1,2
21	F	50	FC	0	5	0,78	0,03	5,5	252,0	12,6	0	0,5
22	F	44	FC	0	0	1,86	0,07	3,6	283,7	10,1	0	1,7
23	F	28	FC	0	18	0,83	0,03	5,0	203,0	12,2	0	0,3
24	M	31	FC	0	0	0,51	0,02	5,4	191,0	15,9	0	1,1
25	M	42	FC	0	4	2,27	0,008	7,6	97,0	15,2	0	0
26	F	71	FC	0	0	1,29	Indetectável	6,8	310,7	14,0	0	2,3
27	M	63	FC	0	0	0,78	0,07	9,0	205,0	14,6	0	1,4
28	F	67	FC	Não tem na data da coleta	2	1,07	0,05	2,2	120,0	10,2	0	0,4
29	M	77	FC	0	0	1,22	0,02	5,4	163,0	12,0	0	0,3
30	F	48	FC	Não tem na data da coleta	5	1,43	0,04	3,4	156,0	12,8	0	1,5
31	F	79	FC	0	0	1,64	0,018	4,6	183,4	9,4	0	0,6
32	M	70	FC	0	0	0,96	0,06	4,4	192,0	11,2	0	1

Tabela 23. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC responsivos ao imatinibe (Cont)

Amostra	Mutação	Data última consulta	Óbito	Data início Imatinibe	Data fim Imatinibe	RHC	Data RHC	RCC	Data RCC	RMM	Data RMM
1	Ausência	17/02/2016	NÃO	10/10/2013	17/02/2016	SIM	07/11/2013	SIM	09/01/2014	SIM	09/01/2014
2	Ausência	16/03/2016	NÃO	26/06/2013	16/03/2016	SIM	20/08/2013	SIM	11/07/2014	SIM	02/07/2014
3	Ausência	05/01/2016	NÃO	31/05/2012	05/01/2016	SIM	26/07/2012	SIM	27/09/2012	SIM	02/01/2013
4	Ausência	06/01/2016	NÃO	29/02/2012	06/01/2016	SIM	29/03/2012	SIM	30/05/2012	SIM	11/03/2013
5	Ausência	27/01/2016	NÃO	05/02/2014	27/01/2016	SIM	12/03/2014	SIM	21/07/2014	SIM	26/11/2014
6	Ausência	16/12/2015	NÃO	26/09/2013	16/12/2015	SIM	24/11/13	SIM	09/04/2014	SIM	09/04/2014
7	Ausência	06/01/2016	NÃO	06/08/2011	06/01/2016	SIM	14/09/2011	SIM	16/11/2011	SIM	07/03/2012
8	Ausência	24/02/2016	NÃO	23/11/2011	24/02/2016	SIM	23/11/2011	SIM	01/06/2012	SIM	01/08/2012
9	Ausência	27/01/2016	NÃO	22/02/2011	27/01/2016	SIM	24/03/2011	SIM	07/06/2011	SIM	07/12/2011
10	Ausência	03/02/2016	NÃO	04/10/2011	03/02/2016	SIM	01/11/2011	SIM	04/01/2012	SIM	11/04/2012
11	Ausência	21/08/2013	NÃO	08/03/2012	21/08/2013	SIM	08/03/2012	SIM	30/05/2012	SIM	11/04/2012
12	Ausência	06/01/2016	NÃO	28/09/2011	06/01/2016	SIM	08/11/2011	SIM	03/01/2012	SIM	28/11/2012
13	Ausência	12/01/2016	NÃO	17/11/2010	12/01/2016	SIM	15/12/2010	SIM	18/02/2011	SIM	26/10/2011
14	Ausência	27/01/2016	NÃO	26/01/2011	27/01/2016	SIM	01/03/2011	SIM	26/04/2011	SIM	29/02/2012
15	Ausência	06/01/2016	NÃO	01/11/2011	06/01/2016	SIM	21/12/2011	SIM	09/04/2012	SIM	04/04/2012
16	Ausência	03/02/2016	NÃO	18/07/2011	03/02/2016	SIM	02/08/2011	SIM	23/01/2012	SIM	18/04/2012
17	Ausência	10/09/2015	NÃO	01/11/2012	10/09/2015	SIM	18/12/2012	SIM	05/04/2013	SIM	05/04/2013
18	Ausência	27/08/2014	NÃO	07/08/2012	27/08/2014	SIM	08/05/2013	SIM	08/05/2013	SIM	08/05/2013
19	Ausência	27/01/2016	NÃO	29/05/2013	27/01/2016	SIM	19/06/2013	SIM	26/11/2013	SIM	04/06/2014
20	Ausência	24/02/2016	NÃO	03/01/2013	24/02/2016	SIM	24/01/2013	SIM	04/04/2013	SIM	10/07/2013
21	Ausência	02/03/2016	NÃO	20/09/2012	02/03/2016	SIM	22/11/2012	SIM	05/12/2012	SIM	19/03/2013
22	Ausência	06/01/2016	NÃO	27/05/2010	06/01/2016	SIM	17/06/2010	SIM	25/08/2010	SIM	25/08/2010
23	Ausência	16/12/2015	NÃO	02/10/2013	16/12/2015	SIM	27/11/2013	SIM	07/01/2014	SIM	20/08/2014
24	Ausência	16/12/2015	NÃO	08/09/2011	16/12/2015	SIM	28/09/2011	SIM	21/12/2011	SIM	04/04/2012
25	Ausência	24/02/2016	NÃO	06/10/2010	24/02/2016	SIM	10/11/2010	SIM	28/02/2011	SIM	09/02/2011
26	Ausência	17/02/2016	NÃO	09/02/2011	17/02/2016	SIM	30/11/2011	SIM	30/11/2011	SIM	25/07/2012
27	Ausência	13/01/2016	NÃO	28/05/2013	13/01/2016	SIM	02/07/2013	SIM	13/12/2013	SIM	16/07/2014
28	Ausência	24/02/2016	NÃO	16/01/2014	10/09/2014	SIM	29/01/2014	NÃO		SIM	07/05/2014
29	Ausência	09/03/2016	NÃO	11/03/2014	09/03/2016	SIM	26/03/2014	SIM	24/06/2014	SIM	19/02/14
30	Ausência	09/12/2015	NÃO	12/12/2014	09/12/2015	SIM	11/02/2015	NÃO		SIM	15/04/2015
31	Ausência	17/02/2016	NÃO	19/08/2011	17/02/2016	SIM	13/09/2011	Não Avaliado		SIM	06/03/2012
32	Ausência	03/07/2013	Sim	07/12/2011	05/07/2013	SIM	21/12/2011	Não Avaliado		SIM	03/04/2012

Tabela 24. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC resistentes ao imatinibe

Amostra	Sexo	Idade na coleta	Fase da doença coleta /Dx	Cariótipo%Ph	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta	Leucócitos	Plaquetas	Hb	Blastos
1	F	64	FA	50%	11	1,58	65,91	35,3	86,0	12,4	21
2	M	29	FC	70%	3	0,51	5,85	4,6	202,0	13,8	0
3	M	23	FC	95%	29	2,51	30,09	7,4	163,1	13,8	0
4	M	69	FC	Não tem	2	1,29	9,26	1,9	154,0	11,6	0
5	F	57	CB	Não tem	9	Não calcula	70,61	42,1	26,0	7,5	64
6	M	35	FC	Evolução Clonal	5	0,9	1,83	13,9	465,0	13,4	0
7	M	23	FC	Evolução Clonal	15	1,11	29,83	4,4	195,4	14,3	0
8	M	45	FC	Não tem	10	20,15	3,4	3,9	938,0	11,5	0
9	M	39	FC	Evolução Clonal	20	1,85	150,05	6,0	112,0	14,0	0
10	F	48	FC	100%	12	2,3	13,98	7,4	240,0	12,5	Não tem
11	F	41	FC	40%	12	0,98	110,11	3,8	423,0	11,8	1
12	M	51	FC	35%	4	0,82	14,78	5,4	113,0	15,8	0
13	M	29	FC	85%	12	1,17	252,66	9,7	246,4	14,9	0
14	F	51	FC	80%	0	0,63	56,44	8,4	243,0	14,5	0
15	M	66	FC	100%	Não avaliado	Não tem	517,8	17,76	807,0	12,8	0
16	M	75	FC	Evolução Clonal	10	1,64	4,42	4,0	115,0	10,5	0
17	F	75	CB	Evolução Clonal	0	Não calcula	15,2	122,7	13,0	6,5	69
18	M	66	FC	Não tem	Não avaliado	Não tem	14,64	4,9	74,8	10,7	0
19	M	40	FC	30%	0	0,64	43,43	7,7	258,0	11,8	0
20	M	60	FC	20%	3	1,05	2,69	6,8	189,0	13,5	0
21	M	64	FC	50%	0	0,92	20,57	4,9	168,0	12,6	0
22	M	33	FC	60%	0	0,57	119,16	7,4	132,0	14,9	0
23	M	61	FC	100%	Não avaliado	Não tem	183,4	13,0	171,0	12,6	0
24	M	32	FC	0	7	0,69	4,49	6,1	102,0	13,4	0
25	M	39	FC	0	12	0,94	0,77	3,5	217,0	10,8	0
26	M	21	FC	0	2,5	0,39	72,9	13,0	224,0	13,2	0

Tabela 24. Características Clínicas e laboratoriais em leucócitos totais de pacientes com LMC resistentes ao imatinibe (Cont)

Amostra	Basófilos	Mutação	Óbito	Data início IM	Data fim IM	RHC	Data RHC	RCC	Data RCC	RMM	Progressão
1	1	Ausência	Sim	20/06/2007	24/11/2008	Sim	20/09/2007	Não	Não Avaliada	Não	Sim/CB
2	0,2	Ausência	Não	12/02/2008	11/11/2015	Sim	12/02/2008	Sim	03/02/2009	Não	Não
3	0,7	Não Avaliada	Não	05/01/2011	29/04/2015	Sim	03/02/2011	Sim	11/01/2012	Não	Não
4	1,3	Ausência	Não	09/08/2012	01/10/2013	Sim	18/10/2012	Não avaliada	Não Avaliada	Não	Não
5	1	Não Avaliada	Sim	06/01/2011	18/01/2012	Sim	17/02/2011	Sim	07/04/2011	Não	Sim/CB
6	3	Ausência	Sim	22/09/2010	21/09/2012	Sim	09/11/2010	Não	Não Avaliada	Não	Sim
7	2,1	Ausência	Não	04/03/2010	21/11/2012	Sim	25/03/2010	Não	Não Avaliada	Não	Sim
8	14	Ausência	Sim	08/04/2009	02/03/2011	Sim	04/08/2009	Sim	13/07/2009	Não	Sim
9	1,3	Ausência	Não	01/06/2007	05/03/2009	Sim	01/08/2007	Ph neg	Não Avaliada	Não	Sim
10	Não tem	Não Avaliada	Não	24/09/2009	18/01/2011	Sim	24/09/2009	Não	Não Avaliada	Não	Não
11	3	Não Avaliada	Não	08/02/2010	03/01/2011	Sim	08/02/2010	Não	Não Avaliada	Não	Não
12	0,9	Não Avaliada	Não	04/02/2010	06/08/2013	Sim	18/03/2010	Sim	06/07/2011	Não	Não
13	1,9	Não Avaliada	Não	24/07/2008	30/08/2011	Sim	16/12/2008	Sim	11/12/2010	Não	Não
14	1,3	Ausência	Não	01/07/2007	22/10/2008	Sim	01/07/2007	Sim	01/07/2007	Não	Não
15	7,1	Ausência	Não	08/11/2007	22/01/2009	Sim	03/01/2008	Não	Não Avaliada	Não	Sim
16	0,6	Ausência	Não	14/02/2014	29/04/2015	Sim	28/05/2014	Não	Não Avaliada	Não	Não
17	0	Ausência	Sim	01/04/2015	16/12/2015	Sim	26/05/2015	Não	Não Avaliada	Não	Sim
18	0,4	Não Avaliada	Sim	30/03/2010	28/06/2011	Sim	27/04/2010	Não	Não Avaliada	Não	Não
19	0,9	Ausência	Não	06/04/2006	04/02/2010	Sim	04/05/2006	Não		Não	Não
20	0,5	Não Avaliada	Não	05/01/2005	30/04/2008	Sim	16/02/2005	Sim	04/10/2006	Não	Não
21	0,4	3151	Sim	01/06/2005	16/06/2009	Sim	27/07/2005	Não		Não	Não
22	1,16	Não Avaliada	Não	19/11/2009	17/05/2011	Sim	19/11/2009	Sim	08/04/2010	Não	Não
23	1,9	Não Avaliada	Não	04/04/2004	25/08/2008	Sim	Não sabemos	Não		Não	Não
24	0,3	Não Avaliada	Sim	20/07/2006	15/04/2009	Sim	20/09/2006	Sim	13/08/2007	Não	Não
25	1,3	Não Avaliada	Não	01/02/2006	11/07/2012	Sim	01/02/2006	Sim	01/02/2006	Não	Não
26	4,5	Ausência	Sim	01/01/2003	28/08/2008	Sim	04/02/2003	Sim	24/06/2003	Não	Não

Tabela 25. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico

Amostra	Amostra	Sexo	Idade na coleta	Cariótipo%Ph	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta	Leucócitos (Coleta)	Plaquetas	Hb
1	1	M	69	Não Avaliado	0	Não	84,39	60,3	183	13,9
2	2	M	23	100%	0	Não	82,24	67,3	327	13,6
3	3	M	55	100%Ph e del Y 80%	3	0,8	5	111	94,7	10,7
4	4	F	30	100%	Não	Não	385,75	221,2	425	8,59
5	5	F	40	100%	15	1,55	8,6	75,7	755	10,3
6	6	F	53	46,XX,t(10;12;15;22)[q23;p1	0	0,76	38,97	112,3	328	12,9
7	7	M	32	100%	0	0,57	4,34	95,9	136	11,4
8	8	M	21	100%	15	1,11	44,45	294,6	430	11,9
9	9	M	65	100%	0	0,86	66,41	75,5	365	14,6

Tabela 25. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC ao diagnóstico (Cont)

Amostra	Blastos	Basófilos	Nome TKI	Data início TKI	Data Fim TKI	Mutação	Data início de Imatinibe	Data Fim de imatinibe
1	1,5	8,5	Dasatinibe	10/06/2010	02/10/2013	Não	21/10/2009	10/06/2010
2	0	2	Dasatinibe	02/02/2011	25/05/2016	Não	29/07/2010	20/01/2011
3	1	9	Dasatinibe	20/04/2011	01/06/2016	Não	13/07/2010	19/04/2011
4	13	10	Dasatinibe	10/02/2011	28/07/2016	Não	31/08/2010	09/02/2011
5	3,5	10	Dasatinibe	16/09/2011	20/07/2016	Não	27/10/2009	06/05/2010
6	1	3	Dasatinibe	19/11/2009	05/07/2016	Não	25/06/2009	01/10/2009
7	2	1,5	Dasatinibe	03/05/2011	25/05/2016	Não	19/11/2009	03/05/2011
8	5	5	Dasatinibe	18/01/2012	01/06/2016	Não	04/02/2010	18/01/2012
9	0	0	Dasatinibe	11/07/2012	13/07/2016	Não	17/12/2009	11/07/2012

Tabela 26. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC responsivos ao dasatinibe

Nome Paciente	Sexo	Idade na coleta	Fase da doença coleta	Cariótipo (%)	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta	Leucócitos Diag	Plaquetas Diag	Hb Diag	Blastos Diag	Basófilos Diag
1	F	46	FC	100	0	Não Avaliado	0,001	5,6	420	11,1	0	0
2	F	30	FC	100	Não Avaliado	Não Avaliado	0,02	Não Avaliado	Não Avaliado	Não	Não	Não Avaliado
3	M	58	FC	100	3	0,8	indetectável	111	94,7	10,7	1	9
4	M	73	FC	100	18	2,32	0,011	61,3	340	8,9	4	7
5	M	25	FC	999	15	1,11	0,002	294,6	430	11,9	5	6,3
6	M	62	FC	100	6	1,01	0,01	22,3	583	14,5	0	10
7	F	67	FC	100	7	1,49	0,01	202,8	626	12,2	3	2
8	M	33	FC	100	16	1,06	indetectável	208	437	13,2	2,9	2,5
9	M	44	FC	0	20	Não Avaliado	0,007	500,19	368	6,5	6	2
10	M	40	FC	0	12	0,94	0,04	180,2	480	11,6	2	9
11	F	44	FC	100	15	Não Avaliado	0,002	75,7	755	10,3	3,1	10
12	M	73	FC	999	0	Não Avaliado	indetectável	60,3	183	13,9	1,5	8,5
13	F	57	FC	Não	Não Avaliado	0,76	indetectável	112,3	328	12,9	3	3
14	M	69	FC	100	0	0,86	0,012	75,5	365	14,6	0	0
15	M	27	FC	100	0	Não Avaliado	0,001	67,3	327	13,6	0	2
16	M	36	FC	Não	Não Avaliado	Não Avaliado	Não Avaliado	95,9	136	11,4	2	1,5
17	F	47	FC	90	Não Avaliado	Não Avaliado	0,01	22,1	39,4	11,4	1	5
18	M	51	FC	999	Não Avaliado	Não Avaliado	0,125	Não Avaliado	Não Avaliado	Não	Não	Não Avaliado
19	M	36	FC	100	5	0,9	0,013	Não Avaliado	Não Avaliado	Não	Não	Não Avaliado
20	F	19	FC	999	Não Avaliado	Não Avaliado	0,221	Não Avaliado	Não Avaliado	Não	Não	Não Avaliado
21	F	52	FC	100	12	2,3	0,002	310	996	9,9	6	3,5
22	M	31	FC	100	12	1,17	0,012	230	516	9,8	4	2
23	M	26	FC	100	Não Avaliado	Não Avaliado	0,003	13,7	397	14,5	0	12
24	M	42	FC	70	22	1,95	0,071	483,6	431	9,6	6	3

Tabela 26. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC responsivos ao dasatinibe (Cont)

Nome Paciente	Nome TKI	Data início TKI	Data fim TKI	Mutação	Óbito	Data início Imatinibe	Data fim Imatinibe	RHC	Data RHC	RCC	Data RCC	RMM	Data RMM	Motivo de troca do imatinibe
1	Dasatinibe	10/11/2005	08/06/2016	Não Avaliado	Não	28/12/2001	15/06/2005	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Resistência
2	Dasatinibe	20/10/2005	06/01/2016	E255K	Não	20/06/2002	20/10/2005	Sim	26/07/2012	Sim	26/07/2012	Sim	26/07/2012	Resistência
3	Dasatinibe	22/06/2011	01/06/2016	Não Avaliado	Não	13/07/2010	19/04/2011	Sim	22/06/2011	Sim	22/06/2011	Sim	22/06/2011	Intolerância
4	Dasatinibe	05/03/2009	23/08/2016	Não Avaliado	Não	04/01/2007	05/03/2009	Sim	05/03/2009	Sim	08/10/2009	Sim	12/03/2010	Resistência
5	Dasatinibe	23/02/2012	01/06/2016	não	Não	04/02/2010	18/01/2012	Sim	25/03/2010	Sim	25/04/2012	Sim	19/09/2012	Resistência
6	Dasatinibe	08/05/2009	04/11/2015	não	Sim	02/10/2008	07/05/2009	Sim	18/06/2009	Sim	09/04/2010	Sim	27/07/2011	Resistência
7	Dasatinibe	10/12/2010	06/04/2016	não	Não	17/10/2007	09/12/2010	Sim	10/12/2009	Sim	10/12/2009	Sim	03/08/2010	Resistência
8	Dasatinibe	20/09/2012	29/06/2016	Não Avaliado	Não	29/10/2008	25/11/2011	Sim	20/09/2012	Sim	20/09/2012	Sim	20/09/2012	Resistência
9	Dasatinibe	10/06/2009	24/08/2016	não	Não	20/06/2007	20/09/2008	Sim	05/09/2007	Sim	10/06/2009	Sim	10/04/2008	Resistência
10	Dasatinibe	08/08/2012	18/05/2016	Não Avaliado	Não	19/01/2006	08/08/2012	Sim	11/07/2012	Sim	11/07/2012	Sim	31/10/2012	Resistência
11	Dasatinibe	07/11/2011	20/07/2016	Não Avaliado	Não	27/10/2009	06/05/2010	Sim	22/12/2009	Não	Não	Sim	30/06/2011	Resistência
12	Dasatinibe	10/06/2010	02/10/2013	Não Avaliado	Não	21/10/2009	10/06/2010	Sim	21/01/2010	Sim	10/02/2011	Sim	09/02/2011	Intolerância
13	Dasatinibe	02/12/2009	24/02/2016	Não Avaliado	Não	25/06/2009	01/10/2009	Sim	02/12/2009	Sim	02/12/2009	Sim	28/07/2010	Intolerância
14	Dasatinibe	11/07/2012	13/07/2016	Não Avaliado	Não	18/01/2010	10/07/2012	Sim	11/07/2012	Sim	11/07/2012	Sim	28/11/2012	Intolerância
15	Dasatinibe	10/03/2011	25/05/2016	Não Avaliado	Não	29/07/2010	26/01/2011	Sim	10/03/2011	Sim	10/03/2011	Sim	28/06/2011	Intolerância
16	Dasatinibe	03/05/2011	25/05/2016	L387M	Não	19/11/2009	03/05/2011	Sim	17/12/2009	Sim	05/09/2012	Sim	08/04/2010	Resistência
17	Dasatinibe	24/11/2010	03/08/2016	Não Avaliado	Não	22/09/2010	13/10/2010	Sim	14/06/2011	Sim	26/10/2011	Sim	04/04/2012	Intolerância
18	Dasatinibe	22/08/2009	17/08/2016	Não Avaliado	Não	15/07/2003	17/01/2007	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Resistência
19	Dasatinibe	29/08/2012	16/11/2015	T315I	Sim	22/09/2010	28/08/2012	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Resistência
20	Dasatinibe	08/04/2010	06/07/2016	Não Avaliado	Não	15/12/2008	29/03/2010	Sim	08/04/2010	Sim	02/07/2010	Não	Não	Resistência
21	Dasatinibe	19/01/2011	17/08/2016	Não Avaliado	Não	27/08/2009	18/01/2011	Sim	19/01/2011	Sim	04/05/2011	Sim	16/03/2011	Intolerância
22	Dasatinibe	30/08/2011	15/06/2016	Não Avaliado	Não	24/07/2008	30/08/2011	Sim	23/11/2011	Sim	14/03/2012	Sim	19/09/2012	Resistência
23	Dasatinibe	01/04/2009	08/06/2016	M244V	Não	11/03/2009	01/04/2009	Sim	01/04/2009	Sim	18/08/2009	Sim	10/06/2010	Resistência
24	Dasatinibe	17/04/2008	Não	Não Avaliado	Não	10/04/2007	03/04/2008	Sim	24/04/2008	Sim	26/04/2011	Sim	18/06/2013	Resistência

Tabela 27. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC resistentes ao dasatinibe

Amostra	Sexo	Idade na coleta	Fase da doença coleta	Cariótipo	Tam. Baço cm	SOKAL	BCR-ABL coleta	Leucócitos Diag	Plaquetas Diag	Hb Diag	Blastos Diag	Basófilos Diag
1	M	74	FC	Não realizado	10	Não Avaliado	2,96	8,61	369,5	15,61	0	3,9
2	M	75	FC	Não realizado	0	1,04	47,751	6,15	168	10	0	0,4
3	F	77	FC	Não realizado	Não Avaliado	Não Avaliado	Não realizado	13,94	214	9,1	0	1,9
4	M	40	FA	100% + del22	12	Não Avaliado	Não realizado	5,57	94	6,2	15	10
5	F	41	FC	15% Ph	20	Não Avaliado	0,585	3,58	186	11,6	0	0,4
6	M	68	FC	0%	10	Não Avaliado	8,026	10,47	296	8,9	0	3,1
7	M	45	FC	60%	Não Avaliado	Não Avaliado	19,753	9,56	245	13	0	1,2
8	M	21	FC	Ph 15%	Não Avaliado	Não Avaliado	1,112	2,6	8	10,8	5	1
9	M	65	FC	85%	14	8,23	1,459	22,75	579	12,2	0	7
10	F	60	FC	100%	Não Avaliado	Não Avaliado	48,651	10,79	823	9,5	0	1,7
11	F	77	FC	100%	0	1,08	Não realizado	55,84	415	11,3	0,6	2
12	M	37	FC	90%	5	0,9	6,927	5,05	176	14,5	0	0,6
13	M	71	FC	Não realizado	Não Avaliado	Não Avaliado	2,946	4,91	266	15,4	0	3
14	M	32	FC	100%	Não Avaliado	Não Avaliado	74,492	6,06	295	16,1	0	5,3

Tabela 27. Características Clínicas e laboratoriais em células mononucleares de pacientes com LMC resistentes ao dasatinibe (Cont)

Amostra	Nome TKI	Data Início TKI	Data Fim TKI	Mutação	Óbito	Data início IM	Data fim IM	RHC	Data RHC	RCC	Data RCC	RMM
1	Dasatinibe	27/10/2005	22/08/2013	F317L	Não	06/02/2003	13/10/2005	Sim	27/10/2005	Não		Não
2	Dasatinibe	22/09/2011	19/11/2013	Não	Não	08/06/2006	20/01/2011	Sim	30/11/2011	Não		Não
3	Dasatinibe	12/04/2011	17/04/2013	Não	Não	07/11/2002	12/04/2011	Sim		Sim	17/01/2012	Não
4	Dasatinibe	08/02/2011	30/05/2012	Não	Não	17/12/2004	08/03/2006	Sim	28/06/2011	Não		Não
5	Dasatinibe	24/06/2010	19/11/2013	Não	Não	20/06/2007	18/07/2007	Sim	24/06/2010	Sim	10/05/2011	Não
6	Dasatinibe	02/03/2006	26/11/2009	Não	Não	02/04/2002	01/02/2006	Sim	04/01/2007	Não		Não
7	Dasatinibe	29/01/2010	23/07/2014	M244V	Não	06/04/2006	13/10/2008	Sim	29/01/2010	Não		Não
8	Dasatinibe	10/02/2011	13/08/2013	Não	Não	Não Avaliado	Não Avaliado	Sim	02/03/2011	Não		Não
9	Dasatinibe	27/03/2008	13/11/2008	T315I	Sim	06/09/2007	13/03/2008	Sim	17/04/2008	Não		Não
10	Dasatinibe	08/10/2008	08/10/2008	Não	Não	27/02/2008	02/10/2008	Sim	18/12/2008	Não		Não
11	Dasatinibe	28/08/2009	04/02/2010	Não	Não	21/01/2009	28/08/2009	Sim	28/08/2009	Não		Não
12	Dasatinibe	29/08/2012	16/11/2015	T315I	Não	22/09/2010	29/08/2012	Sim	10/10/2012	Sim	04/01/2013	Sim
13	Dasatinibe	28/10/2005	09/04/2014	Y253H	Não	06/04/2005	17/10/2005	Sim	24/11/2005	Não		Não
14	Dasatinibe	24/11/2005	15/10/2009	Não	Não	18/03/2003	07/03/2005	Sim	27/11/2005	Não		Não

9. ANEXOS

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão dos genes
TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1
em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica
resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe

Pesquisador: KATIA BORGIA BARBOSA PAGNANO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31983514.1.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 699.651

Data da Relatoria: 24/06/2014

Apresentação do Projeto:

Propõe-se avaliar a expressão dos genes TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1 em leucócitos totais e células mononucleares de sangue periférico de pacientes (n=40) com leucemia Mielóide Crônica (LMC) responsivos ou resistentes ao dasatinibe e compará-los a um grupo controle (n=20) constituído por doadores saudáveis. Serão convidados pacientes atendidos no Hemocentro-Unicamp, de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade, independentemente da fase da doença em que se encontram e em pré-tratamento ou tratamento com dasatinibe. Para realização dos ensaios propostos no estudo serão colhidos 24ml de sangue periférico dos participantes. O diagnóstico da LCM será determinado pela presença do cromossomo Filadélfia ou do transcrito BCR-ABL. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes e informações sobre o tratamento serão extraídos dos prontuários médicos. Os materiais biológicos colhidos serão empregados somente para a finalidade descrita nesse estudo. Todavia, será solicitado aos participantes, por meio do TCLE, autorização para armazenamento de material biológico, sendo esclarecido que os mesmos somente serão utilizados para outro estudo após autorização do CEP. Os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE somente para os pacientes participantes do projeto (CAAE: 09868112.9.0000.5404, parecer 236.752, de 21/03/2013), que previamente autorizaram por

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 699.651

escrito o armazenamento de material biológico para futuras pesquisas e autorizaram a realização de outros estudos com as amostras armazenadas no biorrepositório aprovado, desde que o novo projeto seja aprovado pelo CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão dos genes TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1 em leucócitos totais e células mononucleares de sangue periférico de pacientes responsivos e resistentes ao dasatinibe e de um grupo controle constituído por doadores saudáveis.

Objetivo Secundário:

Correlacionar a expressão dos genes estudados com resposta ao tratamento (resposta citogenética, resposta molecular) e prognóstico (sobrevida global, livre de eventos e livre de progressão).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos previsíveis, exceto o desconforto da punção venosa para coleta das amostras, que será minimizado uma vez que estas serão colhidas junto com as amostras da consulta de rotina do paciente.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos ao sujeito de pesquisa. No entanto, os resultados poderão contribuir para um melhor entendimento nos mecanismos de resistência aos inibidores de tirosina quinase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevância do estudo na possibilidade de correlacionar expressão dos genes TARP, ncTNFAIP8, IFNG, FASLG e AKT1 com a resistência ao tratamento da LMC com o dasatinibe.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada por

Katia B. Barbosa Pagnano, pesquisadora principal, e por Joyce Maria A Bizzacchi, coordenadora associada do Hemocentro-Unicamp, instituição indicada como proponente;

2. Termo de consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 699.651

4. Projeto completo.
5. Regulamento do biorrepositório.

Recomendações:

1. Recomenda-se dispensa do TCLE somente para os pacientes participantes do projeto (CAAE: 09688112.9.0000.5404, parecer 236.752, de 21/03/2013), que previamente autorizaram por escrito o armazenamento de material biológico para futuras pesquisas e autorizaram a realização de outros estudos com as amostras armazenadas no biorrepositório aprovado, desde que o novo projeto seja aprovado pelo CEP. Para todos os novos casos será necessário consentimento assinado por meio do TCLE.
2. Uma vez que as versões finais impressas dos TCLEs têm duas folhas, o participante ou o representante legal pelo participante, bem como, o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no 003/2011/CONEP/CNS).
3. TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador desenvolver o projeto conforme apresentado nesta plataforma, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 699.651

CAMPINAS, 26 de Junho de 2014

Assinado por:
Monica Jacques de Moraes
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-867
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefons: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

HEMOCENTRO-UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz
CEP 13083-970 - Fone: (19) 3521-8740- Fax : (19) 35218600



UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe”

Pesquisadores: Katia B. Barbosa Pagnano, Fernanda de Cássia Frasson Carvalho.

O Sr(a) tem diagnóstico de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e faz tratamento no Hemocentro Unicamp com medicamentos chamados inibidores de tirosina quinase, desenvolvidos especificamente para o controle da doença. Os pacientes que atualmente usam esses medicamentos podem apresentar diferentes respostas no decorrer do acompanhamento. Apesar dos excelentes resultados atuais no tratamento da LMC ainda há casos que se tornam resistentes ao tratamento.

A avaliação da resposta ao tratamento já é feita rotineiramente no ambulatório através da análise do hemograma, cariótipo de medula óssea e PCR quantitativo dos transcritos BCR-ABL, exames realizados periodicamente.

O objetivo dessa pesquisa será a Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe. Portanto, não haverá benefícios diretos para o Sr(a), mas os resultados dessa pesquisa poderão ser importantes no melhor entendimento da doença e auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para os pacientes que futuramente tenham a mesma doença.

Nessa pesquisa serão coletadas 24 ml (6 tubos de EDTA de 4 ml) de amostras de sangue periférico em duas ocasiões: na resistência ao imatinibe (pré dasatinibe) e após um ano de tratamento com dasatinibe ou na detecção de resistência (o que ocorrer primeiro). Essas amostras serão empregadas somente para as finalidades do estudo, sob o cuidado dos pesquisadores responsáveis. Ainda, todos os dados obtidos a partir delas, bem como outros importantes para a pesquisa serão mantidos sob sigilo, resguardando a sua privacidade. Se o Sr(a) já estiver recebendo o medicamento dasatinibe será avaliada a sua resposta atual (resistente ou responsivo) e serão coletados 24 ml de sangue uma única vez.

Caso o Sr(a) aceitar ou recusar participar desse estudo, o seu acompanhamento clínico será o mesmo a que são submetidos os pacientes não participantes. Caso decida participar, pode pedir esclarecimentos dos procedimentos aos pesquisadores antes ou durante a pesquisa e ainda pode retirar-se dela a qualquer momento sem prejuízo ao seu tratamento.

Tendo isso em vista, os pesquisadores acima gostariam de solicitar ao (à) senhor(a) que participe deste estudo. Os pesquisadores solicitam, também, que possam manter guardadas (congeladas) amostras de sangue do senhor(a), que sobram dos exames realizados para alguma pesquisa posterior, mantendo sua identidade em segredo e sem nenhum custo. O material ficará guardado no Laboratório de Onco-Hematologia do Hemocentro-Unicamp, sob os cuidados dos pesquisadores. Qualquer informação obtida de uma pesquisa realizada com este material e que possa beneficiá-lo(a), será repassada ao senhor(a). Se preferir, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo e recusar-se a autorizar o armazenamento de material biológico.

Eventuais dúvidas que o Sr(a) possa ter poderão ser esclarecidas pela pesquisadora responsável por esse estudo: Dra. Katia B. Barbosa Pagnano, telefone 3521-8740. Se caso se sentir prejudicado em decorrência da pesquisa pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/UNICAMP, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, telefone 3521-8936.

Todos os dados obtidos nesta pesquisa serão mantidos em segredo e seu uso será apenas para fins médico-científicos.

Se após a leitura deste termo o Sr(a) concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Eu, _____, abaixo assinado, recebi as informações acima e, ciente dos meus direitos, concordo em participar do estudo acima.

Nome do paciente: _____ data: __/__/__

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisador: _____ data: __/__/__

Assinatura do pesquisador: _____

Fui esclarecido(a) em relação ao armazenamento de material biológico e assinalo:

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Nome do paciente: _____ data: __/__/__

Assinatura do paciente: _____

Nome do pesquisador: _____ data: __/__/__

Assinatura do pesquisador: _____



HEMOCENTRO-UNICAMP
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Rua Carlos Chagas 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz
 CEP 13083-970 - Fone: (19) 3521-8740- Fax : (19) 35218600



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA INDIVÍDUOS CONTROLES

Projeto: “Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe”

Pesquisadores: Katia B. Barbosa Pagnano, Fernanda de Cássia Frasson Carvalho.

Pacientes com diagnóstico de Leucemia Mieloide Crônica (LMC) geralmente fazem tratamento com medicamentos chamados inibidores de tirosina quinase, desenvolvidos especificamente para o controle da doença. Os pacientes que atualmente usam esses medicamentos podem apresentar diferentes respostas no decorrer do acompanhamento. Apesar dos excelentes resultados atuais no tratamento da LMC ainda há casos que se tornam resistentes ao tratamento.

A avaliação da resposta ao tratamento já é feita rotineiramente no ambulatório através da análise do hemograma, cariótipo de medula óssea e PCR quantitativo dos transcritos BCR-ABL, exames realizados periodicamente.

O objetivo dessa pesquisa será a Avaliação da expressão dos genes *TARP*, *ncTNFAIP8*, *IFNG*, *FASLG* e *AKT1* em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica resistentes ao imatinibe tratados com dasatinibe. Portanto, não haverá benefícios diretos para o Sr(a), mas os resultados dessa pesquisa poderão ser importantes no melhor entendimento da doença e auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para os pacientes.

O Sr(a) participará dessa pesquisa como indivíduo controle (sem a doença e, portanto, sem tratamento), doando amostras de sangue periférico que serão coletadas em tubos de EDTA de 4 mL. Essas amostras serão empregadas somente para as finalidades do estudo, sob o cuidado dos pesquisadores responsáveis. Ainda, todos os dados obtidos a partir delas, bem como outros importantes para a pesquisa serão mantidos sob sigilo, resguardando a sua privacidade.

Caso decida participar, pode pedir esclarecimentos dos procedimentos aos pesquisadores antes ou durante a pesquisa e ainda pode retirar-se dela a qualquer momento.

Tendo isso em vista, os pesquisadores acima gostariam de solicitar ao (à) senhor(a) que participe deste estudo. Os pesquisadores solicitam, também, que possam manter guardadas (congeladas) amostras de sangue do senhor(a) para alguma pesquisa posterior, mantendo sua identidade em segredo e sem nenhum custo. O material ficará guardado no Laboratório de Onco-Hematologia do Hemocentro-Unicamp, sob os cuidados dos pesquisadores. Qualquer informação obtida de uma pesquisa realizada com este material e que possa beneficiá-lo(a), será repassada ao senhor(a). Se preferir, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo e recusar-se a autorizar o armazenamento de material biológico.

Eventuais dúvidas que o Sr(a) possa ter poderão ser esclarecidas pelas pesquisadora responsável por esse estudo: Dra. Katia B. Barbosa Pagnano, telefone 3521-8740. Se caso se sentir prejudicado em decorrência da pesquisa pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/UNICAMP, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP: 13083-887, telefone 3521-8936.

Todos os dados obtidos nesta pesquisa serão mantidos em segredo e seu uso será apenas para fins médico-científicos.

Se após a leitura deste termo o Sr(a) concordar em participar deste estudo, preencha as informações abaixo e assine após.

Eu, _____, abaixo assinado, recebi as informações acima e, ciente dos meus direitos, concordo em participar do estudo acima.

Nome do indivíduo controle: _____ data: __/__/__

Assinatura do indivíduo controle: _____

Nome do pesquisador: _____ data: __/__/__

Assinatura do pesquisador: _____

Fui esclarecido(a) em relação ao armazenamento de material biológico e assinalo:

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Nome do indivíduo controle: _____ data: __/__/__

Assinatura do indivíduo controle: _____

Nome do pesquisador: _____ data: __/__/__

Assinatura do pesquisador: _____