

**Centro Universitário de Brasília - UniCEUB**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DE PACIENTES PORTADORES DE  
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC) EM USO DE GLIVEC  
(STI571,CGP57148B).**

**Priscilla Lamar Matos**

**Brasília - 2006**



**Centro Universitário de Brasília - UniCEUB**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DE PACIENTES PORTADORES DE  
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LCM) EM USO DE GLIVEC  
(STI571,CGP57148B).**

**Priscilla Lamar Matos**

**Relatório Parcial apresentado à Assessoria  
Acadêmica pela Faculdade de Ciências da  
Saúde.**

**Orientadora: Fernanda Vinhaes de Lima**

**Brasília**  
**Agosto/2006**

**Aos meus pais**

Pelo amor, carinho, paciência, incentivo e por existirem na minha vida.

**Ao meu irmão**

Por ser meu irmão, meu mestre, minha vida e por sempre me ajudar nas traduções dos artigos.

**Ao Anderson**

Por ter sempre me incentivado, escutado, pelas inúmeras vezes que ouviu a minha apresentação, pelos conselhos e carinho dados em todos os momentos.

Agradeço especialmente,

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vinhaes de Lima, por tudo que tem feito por mim, pela paciência em me ensinar, por ser minha mestra e acima de tudo por ser minha irmã mais velha nas horas em que preciso.

## **Agradecimentos**

A Graciana Lordelo pela ajuda de todas as horas, pelos incentivos, pela força, por sentar, me ensinar e ser tão especial pra mim.

Ao João Rogério pelos ensinamentos e momentos de pavor que me fez passar.

A Daphne Renata por ter estudado comigo, pelas revisões de prontuário e por todas as ajudas.

Aos enfermeiros do Hospital de Base do Distrito Federal, Eva e Pacheco pela ajuda dada em todas as horas que precisamos.

A todos os funcionários do Hospital de Base que de uma maneira ou de outra colaboraram para que esse projeto seguisse em frente.

A Alessandra por ter ajudado a pegar os prontuários dos pacientes.

A todas as pessoas do Hospital de Apoio de Brasília que colaboraram para o andamento final do projeto.

A todos os funcionários do LaboCIEN pela ajuda e apoio dado.

A todos os médicos hematologistas do Hospital de Base do Distrito Federal por terem colaborado com este trabalho, pois sem essa ajuda o mesmo não teria prosseguido.

Ao Júnior por ter me suportado muitos dias “roubando” sua esposa ou mesmo invadindo sua casa até tarde.

A todos os que me suportaram nesse momento tenso, aos que me ouviram apresentar inúmeras vezes, e àqueles que de uma maneira ou de outra me ajudaram e colaboraram para a finalização desse projeto.

Por último quero agradecer as pessoas mais importantes desse projeto, os pacientes. Estes participaram de maneira fundamental, em um momento muito difícil das suas vidas, em uma luta diária, com torcida de todas as pessoas envolvidas. Com eles aprendi a ser mais humana e a lutar, por isso torço e rezo sempre por eles.

## RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é um câncer do tecido hematopoiético, no qual células imaturas permanecem com capacidade de diferenciação. A translocação cromossômica característica da LMC, cromossomo Filadélfia (Ph), está presente em 95% dos indivíduos portadores. Essa mutação produz uma proteína quimérica, a p210. A atividade dessa proteína está relacionada a uma hiperplasia na medula óssea. Os tratamentos comumente empregados na LMC baseiam-se na administração de quimioterápicos leucorreduzidores, com resposta citogenética modesta. A droga STI571 - *Glivec*, atua como inibidor clonal com resposta citogenética completa, negativamente o cromossomo Ph. Apesar dos resultados positivos frente ao STI571, constatou-se uma evolução para resistência a essa medicação em alguns pacientes. O mecanismo mais comum do desenvolvimento de resistência ao *Glivec* é a reativação da proteína tirosina cinase, independente da presença do *glivec*, por amplificação gênica ou por mutação pontual. Após diagnóstico clínico e laboratorial, foram selecionados 48 pacientes portadores de LMC, os quais apresentavam o cromossomo Ph em células da medula óssea. Todos os pacientes selecionados estavam em uso do *Glivec*. Os pacientes foram submetidos à avaliação citogenética, através da colheita de 10 mL de aspirado medular, mediante punção do osso esterno ou crista ilíaca posterior. A técnica de cultura temporária de células da medula óssea foi realizada conforme a técnica modificada de MOORHEAD *et al.*, (1960). A técnica de cultura temporária de células da medula óssea procedeu-se em duplicata e com duas culturas de durações diferentes; uma direta e, uma de 24 horas. A idade dos pacientes quando diagnosticados concentrou-se na faixa etária entre as décadas de quarenta e cinquenta anos de vida. A distribuição em relação ao sexo não apresentou diferença significativa. A contagem total de leucócitos no sangue periférico apresentou índices bem distintos quando comparados os pacientes antes e após o tratamento com *Glivec*, como também ocorreu com a contagem de plaquetas. O presente estudo constatou a eficácia da medicação através de análises citogenéticas realizadas pós-tratamento. A partir de seis meses de uso, 90% dos pacientes responderam a esse tratamento. Resposta maior foi verificada em 63,4% desses pacientes. A realização da análise citogenética após 28 meses de tratamento demonstra que 62,5% dos pacientes mantiveram resposta citogenética maior. Apesar dos resultados positivos frente ao STI571, constatou-se uma evolução para resistência a essa medicação em alguns pacientes. Outras drogas estão sendo testadas para serem utilizadas por aqueles pacientes que desenvolvem resistência ao *Glivec*. É o caso do Tasigna (nilotinib), uma nova droga que em cinco meses de uso demonstrou uma resposta hematológica completa em 92% dos pacientes com LMC na fase crônica.

**Palavras-chave:** Leucemia Mielóide Crônica, Cromossomo Philadelphia, *Glivec*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3. CASUÍSTICA &amp; MÉTODO</b>	<b>16</b>
3.1 Seleção dos pacientes	16
3.1.1 Critérios de Inclusão	16
3.1.2 Critérios de Exclusão	17
3.2 Estudo citogenético em cultura temporária de células da medula óssea	17
3.2.1 Colheita de amostra de células da medula óssea	18
3.2.2 Técnica de semeadura de células da medula óssea	18
3.2.3 Composição do meio de cultura	18
3.2.4 Técnica de cultura de células da medula óssea	19
3.2.5 Técnica de separação e fixação das células	19
3.2.6 Preparo e coloração das lâminas	20
3.2.7 Análise Citogenética	20
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
4.1 Características gerais dos pacientes	21
4.2 Características hematológicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) ao diagnóstico e após tratamento com STI571, CGP57148B ou Glivec.	24
4.3 Resultado da análise citogenética dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), pré e pós-tratamento ao STI571, CGP57148B ou <i>Glivec</i> .	26
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 1 - PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O sangue é uma massa líquida, heterogênea, mantida em movimento regular e unidirecional, devido essencialmente às contrações rítmicas do coração. É através da circulação sanguínea que as incontáveis células do organismo, em todas as espécies de tecidos, recebem sua nutrição, representada por proteínas, hidratos de carbono, gordura, água e sais minerais. Além disso, praticamente todo o sistema de defesa do organismo contra enfermidades e ataques de microrganismos patogênicos está concentrado no sangue. O controle da temperatura do corpo, o equilíbrio da distribuição de água e o processo de absorção celular também estão diretamente relacionados ao sangue (FLORÊNCIO, 1990; LORENZE, 1999).

Nas três primeiras semanas de gestação, o embrião humano apresenta-se ao lado de uma espécie de bolsa de grandes dimensões, o chamado saco vitelino. É nele que se inicia a formação dos vasos sanguíneos e dos glóbulos vermelhos do embrião. Por volta da terceira semana de gestação, podem ser observadas na parede externa do saco vitelino, pequenas massas celulares que sofrem transformação e originam pequenas ilhotas sanguíneas, as chamadas ilhotas de *Wolf*. As células que delimitam o contorno das ilhotas vão originar as paredes dos primeiros vasos sanguíneos e as células mais internas dessas ilhotas transformam-se em glóbulos vermelhos primitivos (FLORÊNCIO, 1990).

Aos poucos, o saco vitelino vai deixando de ter qualquer função para a vida embrionária e começa a involuir. A partir daí, as células sanguíneas passam a ser produzidas no interior do próprio organismo, mais especificamente no mesoderma. No início do desenvolvimento embrionário humano, o mesoderma é constituído apenas por uma massa gelatinosa de protoplasma com núcleos dispersos. Não existem limites evidentes entre as células, que se comunicam livremente, caracterizando, assim, o chamado sincício. Esse dá origem à rede de delgados vasos capilares forrados de endotélio; o protoplasma original se liquefaz e se transforma no plasma. Em alguns pontos do endotélio, suas células proliferam e se diferenciam, dando origem aos glóbulos vermelhos. Esse processo de formação do sangue, denominado hematopoese, que acontece no mesoderma é, ao que parece, o único exemplo de fabricação de hemácias no interior de vasos (FLORÊNCIO, 1990).

Após o terceiro mês de vida fetal, a formação do sangue se processa, em particular, no fígado e também no baço. É a chamada fase hepática da hematopoese fetal (FLORÊNCIO, 1990).

Um pouco mais tarde, aproximadamente na metade do período de vida fetal, a medula óssea torna-se o órgão principal na produção de células sanguíneas que em regra, continua durante toda a vida extra-uterina (Figura 1). Em casos especiais, em que o organismo exige maior quantidade de sangue, o fígado e o baço podem retomar a atividade de hematopoese. O mesmo pode ocorrer no caso de destruição extensa da medula óssea, por irradiação intensa, tumores ou depressão por drogas tóxicas (FLORÊNCIO, 1990; LORENZE, 1999).

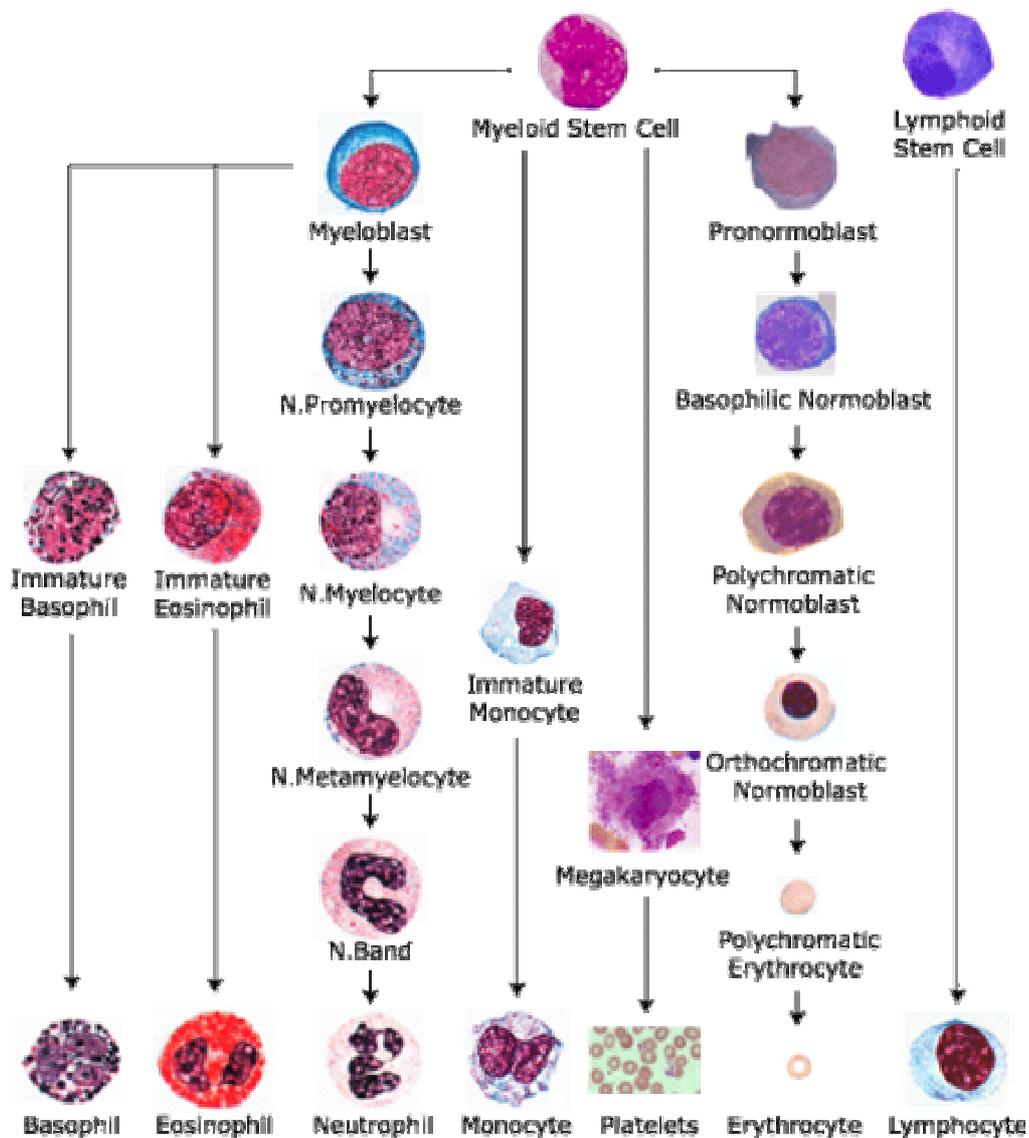


Figura 1. Hematopoese. Fonte: User Logic, 2004.

A medula óssea é constituída por um tecido esponjoso, mole, localizado no interior dos ossos longos. Nela se encontram as células totipotentes que têm grande capacidade de auto-renovação. No microambiente medular, a matriz estromal, as glicoproteínas induzem a divisão e diferenciação das células totipotentes em auto-renovação bem como na diferenciação de células progenitoras comprometidas com linhagens celulares mielóides, eritrocítica, granulocítica, megacariocítica e linfóide. Em sincronia com a matriz, a membrana das células totipotentes recebe a sinalização da necessidade de produção de uma linhagem específica e inicia sua divisão e diferenciação (PLUZNIK & SACHS, 1965; BRADLEY & METCALF, 1966).

O sangue ganha importância especial na defesa da integridade do organismo, pois é nele que se encontram as principais células responsáveis pelos mecanismos de defesa contra ataques de agentes externos. Os leucócitos, ou glóbulos brancos são os agentes de defesa do corpo. Moléculas especiais elaboradas pelos glóbulos brancos formam anticorpos, histaminas, que têm sua função relacionada às reações alérgicas, e a heparina, substância anticoagulante. A produção dessas substâncias torna possível a imunização do organismo contra a invasão de agentes estranhos, sobretudo de microorganismos patogênicos. Os granulócitos diferenciam-se nas linhagens celulares chamadas neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O sangue possui um número muito menor de glóbulos brancos que vermelhos (PLUZNIK & SACHS, 1965; BRADLEY & METCALF, 1966; FLORÊNCIO, 1990; LORENZE, 1999; ZAGO *et al.*, 2001).

Os glóbulos vermelhos, também chamados hemácias ou eritrócitos, são as células que existem em maior quantidade no sangue. No interior dos eritrócitos, encontram-se moléculas da proteína quaternária hemoglobina, a qual determina a cor vermelha do sangue. Em cada milímetro cúbico de sangue existem cerca de 5 a 5,5 milhões de glóbulos vermelhos no homem, e aproximadamente 4,5 milhões na mulher. Um terceiro elemento de importância fundamental no sangue são as plaquetas (150.000 a 450.000/mm<sup>3</sup>). É devido a elas que se dá a coagulação sanguínea, evitando perda contínua de sangue quando ocorre rompimento de pequenos vasos. As plaquetas são pequenos fragmentos de megacariócitos que para a formação do coágulo dependem da ativação de proteínas e íons encontrados no plasma, conhecidos como fatores de coagulação (LORENZE, 1999; ZAGO *et al.*, 2001).

Toda a parte líquida do sangue forma o plasma sanguíneo. Cerca de 90% do plasma é constituído por água pura. A percentagem restante corresponde às numerosas substâncias, como sais minerais, proteínas e gordura. Em cada litro de sangue existem de 60 a 80 gramas de proteínas, a mais abundante é a albumina. Em menor proporção estão as globulinas, relacionadas com a formação de anticorpos, e o fibrinogênio, fundamental no processo de coagulação. Além dessas funções, as proteínas controlam a viscosidade do sangue e regulam a osmose (FLORÊNCIO, 1990; LORENZE, 1999).

As células sanguíneas têm vida curta; eritrócitos apresentam vida média de 120 dias, leucócitos vivem em média 7 dias, e plaquetas, 9 dias. Há, portanto, células morrendo permanentemente, sendo destruídas ou eliminadas e substituídas por novas células (ZAGO *et al.*, 2001). Como já mencionado, é a medula óssea o órgão responsável por esta produção e constante renovação, das células sanguíneas (FLORÊNCIO, 1990; ZAGO *et al.*, 2001).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCA, 2005).

Inúmeras causas para o surgimento do câncer são conhecidas hoje em dia, como o uso do tabaco, contato prolongado ao sol, infecções por vírus e radiação, entre outros. A causa do câncer hoje não é totalmente um mistério. Há uma década, muitos geneticistas estavam confiantes no fato de que a ciência se aproximava de uma resposta final: o câncer seria resultado de mutações cumulativas que alteram pontos específicos no DNA de uma célula, modificando a síntese de proteínas específicas, decodificadas por genes relacionados à doença naqueles locais (GIBBS, 2003).

As mutações afetam dois tipos de genes oncogênicos. Os primeiros são chamados de supressores de tumor (ou genes de supressão tumoral) e normalmente refreiam a habilidade da célula de se dividir. As mutações desativam os genes permanentemente. A segunda variedade, conhecida como oncogenes, estimula o crescimento - ou seja, a divisão celular. As mutações mantêm os oncogenes em estado ativo constante (KNUDSON, 1971, 1985; VOGEL & MOTULSKY, 2000; GIBBS, 2003).

As células diplóides de organismos eucarióticos normalmente apresentam duas cópias de cada cromossomo (um doado pelo gameta paterno e outro pelo gameta materno) e, portanto, duas cópias, ou alelos, para cada gene. A mutação em um só alelo já é suficiente para ativar um oncogene permanentemente. Mas são necessários dois golpes para derrubar ambos os alelos de um gene supressor de tumor. Quatro a dez mutações nos genes corretos de uma mesma célula podem transformá-la em célula oncogênica (GIBBS, 2003).

A hipótese dos "dois golpes" - onde os dois alelos de um gene supressor de tumor precisam ser desativados - também está sendo derrubada pela descoberta de um fenômeno chamado haploinsuficiência. Em alguns tipos de câncer, os supressores de tumor não sofrem nenhuma mutação. A produção simplesmente se reduz, e isso parece ser suficiente para causar um tumor. Esse efeito foi observado em mais de uma dúzia de genes supressores de tumor. Procurar a mera presença ou ausência de gene para proteína é ser muito simplista. A dosagem desse gene também é fundamental (GIBBS, 2003).

Pesquisadores estão agora estudando mais atentamente outros fenômenos além dos erros no seqüenciamento genético do DNA que podem alterar drasticamente a dosagem de uma proteína específica na célula. Candidatos incluem a perda ou ganho de um cromossomo (ou parte de um) contendo o gene, mudanças na concentração de outras proteínas que regulam a transcrição e a tradução do gene, e, por fim, o chamado fenômeno epigenético, o qual altera a atividade gênica por meios reversíveis. Todas essas alterações são quase que onipresentes em um câncer já formado (GIBBS, 2003).

O tecido hematopoiético, responsável pela formação das células sanguíneas, também pode ser atingido por processos tumorais, em geral malignos. As células leucêmicas podem infiltrar-se nos diferentes órgãos criando tumores secundários, semelhante às metástases dos demais (FLORÊNCIO, 1990).

Nas leucemias, os glóbulos brancos apresentam-se freqüentemente aumentados, embora também possam se apresentar em número normal ou mesmo diminuído. O diagnóstico seguro é estabelecido pelo exame citogenético das células da medula óssea (FLORÊNCIO, 1990).

A citogenética é uma ciência onde a citologia e a genética passaram a sobrepor seus conhecimentos, tendo como foco principal o estudo dos

cromossomos. Em outras palavras, a citogenética é o estudo da estrutura, função, comportamento e patologia dos cromossomos, definidos como estruturas essenciais para a vida, pois contêm a informação genética de uma espécie (WUICIK, 2005). No estudo dos mecanismos patológicos, o conhecimento sobre fatores genéticos torna-se mais evidente, em um número cada vez maior de doenças crônico-degenerativas, infecciosas e neoplasias, desempenhando papel importante no controle e prevenção das mesmas (FRANCO 2004).

A citogenética humana constitui-se principalmente no estudo microscópico dos cromossomos e suas anomalias. As anomalias cromossômicas podem ser classificadas em duas diferentes categorias: estruturais: responsáveis pelo estudo qualitativo dos cromossomos, relacionados à sua estrutura; e numéricas: responsáveis pelo estudo quantitativo dos cromossomos, já que cada espécie apresenta um número de cromossomos determinado (BEIGUELMAN, 1982).

Embora o início da citogenética humana date de 1956, quando TJIO & LEVAN estabeleceram o número de cromossomos da espécie humana (46 cromossomos), o reconhecimento do seu papel na prática médica só foi estabelecido em 1959, quando LEJEUNE e colaboradores reconheceram um cromossomo extra do grupo G como agente etiológico da síndrome de Down (LEJEUNE *et al.*, 1959).

O desenvolvimento de métodos de bandeamento cromossômico revolucionou a citogenética a partir de 1968, adicionando um novo critério para a identificação dos cromossomos, o qual leva em consideração a presença de bandas e sub-bandas ao longo de cada cromossomo. Estes métodos permitiram análise comparativa dos pares de homólogos, a detecção de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais, algumas destas envolvendo várias ou até uma única banda. Desde então, a citogenética tem se firmado como uma ferramenta de grande valor no diagnóstico de muitas patologias, além de ser utilizada na prática da medicina preventiva através do aconselhamento genético (CASPERSSON *et al.*, 1970a, 1970b, 1970c). Com a necessidade de se estabelecer normas para a citogenética, ciência ainda muito recente, em 1972 foi realizada a Conferência Internacional de Paris, para o estabelecimento de uma nomenclatura cromossômica universal (MITELMAN, 1995).

Os progressos alcançados na citogenética e na biologia molecular com a tecnologia do DNA recombinante permitiu o mapeamento dos genes humanos e,

paralelamente, o desenvolvimento de novos métodos para o estudo de genes envolvidos em várias doenças genéticas. Sabe-se hoje que os distúrbios cromossômicos constituem uma categoria importante de doenças genéticas, respondendo por uma grande proporção de abortos espontâneos, malformações congênitas e retardo mental, além de desempenhar importante papel na patogenia do câncer (FRANCO, 2004).

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma disfunção mieloproliferativa de linhagem múltipla que se origina de um único precursor mielóide. A doença envolve linhagens de linfócitos B, megacariocíticos, eritróide, monocítico, mielóide e, algumas vezes, linfócitos T (GOLDMAN, 2000). As células progenitoras mielóides expandem-se em vários estágios de maturação, sendo liberadas prematuramente no sangue periférico e posteriormente seguem para locais extramedulares. A expansão desordenada das células progenitoras mielóides reflete as alterações na sua capacidade proliferativa e mudança no equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação, aumentando o número de células progenitoras e reduzindo células-tronco ou totipotentes (FADERL *et al.*, 1999).

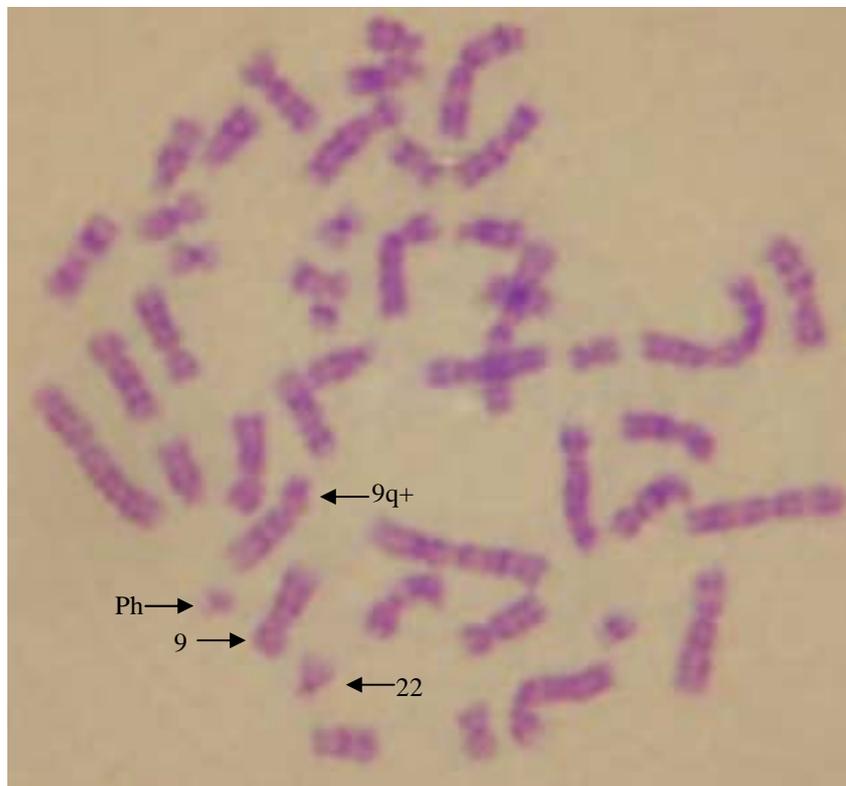
A aderência defeituosa de progenitores de LMC hematopoiéticos imaturos a elementos do estroma medular pode facilitar sua liberação no sangue. As células progenitoras hematopoiéticas normais aderem à matriz extracelular ou as citocinas de regulação de crescimento imobilizadas. A adesão é mediada por receptores da superfície celular nas células progenitoras, especialmente integrinas. As integrinas são glicoproteínas da superfície celular composta de duas subunidades: alfa e beta (FADERL *et al.*, 1999).

Essa neoplasia ocorre freqüentemente em indivíduos de meia idade, entre a quinta e sexta década, pela ativação de um oncogene. A ativação deste oncogene acontece por meio de uma anomalia cromossômica estrutural denominada, translocação cromossômica, a qual é, dentre outras anomalias estruturais, a mais freqüente nas malignidades hematológicas (ZAGO *et al.*, 2001).

Embora a doença tenha sido descrita pela primeira vez na literatura inglesa em 1845, o primeiro marco importante em seu estudo só ocorreu em 1969, quando NOWELL & HUNGERFORD descobriram uma anormalidade citogenética consistente em células leucêmicas (mais tarde denominado cromossomo Filadélfia – Ph) (GOLDMAN, 2000). A LMC foi a primeira doença hematológica na qual uma

anormalidade específica do cariótipo (o cromossomo Filadélfia) pôde ser ligado a eventos patogênicos característicos de leucemias (BAIKE *et al.*, 1960; KEARNEY *et al.*, 1981; BARTRAM *et al.*, 1985; FADERL *et al.*, 1999).

A translocação cromossômica presente na LMC foi descoberta por NOWELL & HUNGERFORD em 1960 (Foto 1), ao observarem um cromossomo anômalo do grupo G, o cromossomo Filadélfia (Ph), presente em 95% dos indivíduos acometidos por essa síndrome (SAGLIO *et al.*, 2004). O Ph também pode ser encontrado em 5% das crianças e em 15 a 30% dos adultos com LMA (FADERL *et al.*, 1999).



**Foto 1.** Célula metafásica obtida a partir de cultura direta de células da medula óssea. Metáfase portadora de cromossomo Filadélfia. Diagnóstico Citogenético: 46, XX, t (9;22) (q34;q11). Fonte: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vinhaes de Lima.

Com o aprimoramento das técnicas de bandeamento cromossômico, ROWLEY em 1973, descreveu a alteração cromossômica existente nesses pacientes com LMC. Essa alteração cromossômica foi descrita como uma translocação recíproca entre dois cromossomos, onde o cromossomo 22 apresenta perda da porção terminal do seu braço longo e o cromossomo 9 apresenta ganho

desse respectivo material genético, na porção terminal do seu braço longo. A quantidade de material genético translocado para o cromossomo 9 é aproximadamente equivalente àquela perdida pelo cromossomo 22, caracterizando-se assim como uma alteração balanceada. A translocação ocorre entre a banda q34 do cromossomo 9 e a banda q11 do cromossomo 22. O cromossomo Ph clássico é descrito dessa forma: t(9;22)(q34;q11).

A translocação responsável pela origem do Ph adiciona um segmento 3' do gene *ABL* (cromossomo 9) ao segmento 5' do gene *BCR* (cromossomo 22), criando um gene híbrido (*BCR-ABL*) que é transcrito em um RNA quimérico *BCR-ABL* (Figura 2). O gene *ABL* possui um receptor de tirosina cinase e o ponto de quebra ocorre, geralmente, no segmento 5', no éxon 2 do *ABL*. Os éxons 2 a 11 do *ABL* são "transpostos" para a região de ponto de quebra maior (*M-bcr*) do gene *BCR* no cromossomo 22, entre os éxons 12 e 16. A fusão do RNAm é traduzido em uma proteína quimérica chamada p210 (DEKLEIN *et al.*, (1982); BARTRAM *et al.*, 1983; HEISTERKAMP *et al.*, 1983). O oncogene *ABL* é homólogo ao oncogene viral, *v-ABL*, responsável pela malignização de células em cultura e indução da leucemia em ratos susceptíveis (KONOPKA & WITTE, 1985).

Dependendo em qual éxon ocorreu a quebra (b2a2 ou b3a2), as características clínicas, a resposta ao tratamento e o prognóstico são similares, exceto na contagem de plaquetas, que em b3a2 é aumentada. Em 50% dos adultos e 80% das crianças com LLA com Ph positivo, e em raros casos de LMC, o ponto de quebra no cromossomo 22 fica a 5' do *M-bcr*, dentro de um segmento chamado região de ponto de quebra menor (*m-bcr*). Com a junção dos éxons e1 e e2, forma-se um transcrito *BCR-ABL*, o qual é traduzido em uma pequena proteína de fusão *BCR-ABL*, p190. Um terceiro local de ponto de quebra está localizado nos éxons 19 e 20 (*μ-bcr*). Eles transcrevem um RNA de fusão com a junção e19a2 (p230). A expressão da p190 na LMC pode ser associada com monocitose (HEISTERKAMP *et al.*, 1985; GAO & GOLDMAN, 1991; FADERL *et al.*, 1999).

O gene *ABL* possui receptor de tirosina cinase e em seu segmento terminal, o mesmo possui dois domínios, SH2 e SH3, conectando o *ABL* à membrana plasmática. Defeitos em SH2 diminuem a absorção de fosfotirosina e reduzem a capacidade de transformação de *ABL*. SH3 tem um efeito regulatório na função da tirosina cinase (FADERL *et al.*, 1999).

O segmento N-terminal de *BCR* aumenta a atividade da tirosina cinase. O domínio serina tirosina cinase, do *BCR*, ativa a tirosina cinase do *ABL* e a p210 (MARU & WITTE, 1991). A fusão do segmento N-terminal de *BCR* para *ABL* adiciona uma longa seqüência de aminoácidos ao segmento SH2 de *ABL*. O gene *BCR* interfere com um domínio regulatório de SH3 cinase adjacente que faz com que *ABL* se torne ativo como tirosina cinase (FADERL *et al.*, 1999).

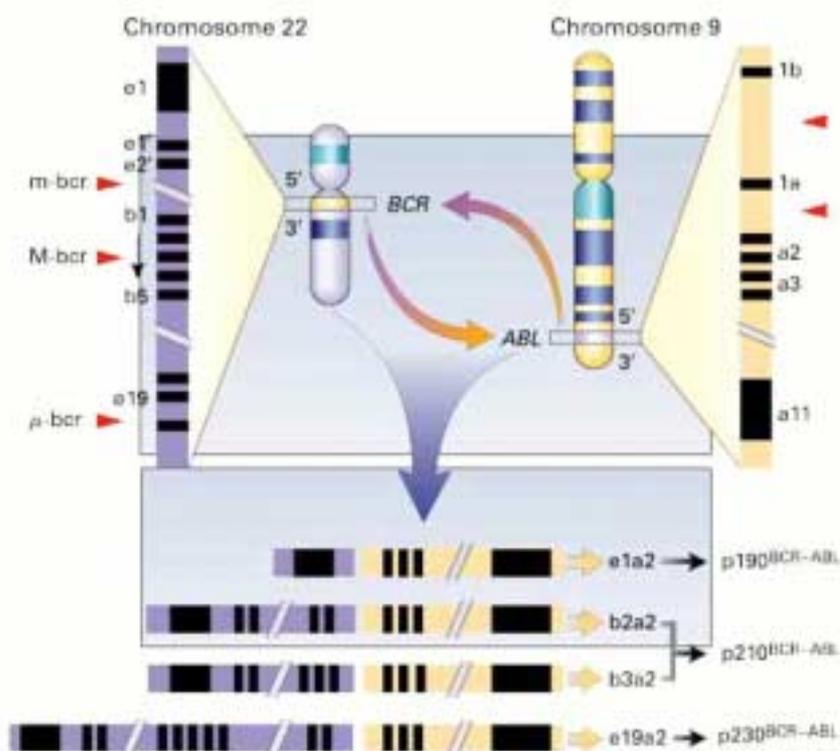


Figura 2. Região de quebra nos cromossomos 9 e 22, na formação do cromossomo filadélfia. Fonte: FADERL *et al.*, 1999.

A proteína híbrida p210 permite várias interações. Vários domínios de *BCR* servem para absorver proteínas adaptadoras. O SH2 do GRB2 se liga a um resíduo de tirosina cinase do *BCR* na p210. Isso ocasiona a ligação da p210 ao RAS, uma proteína guanosina que está envolvida na regulação da diferenciação e proliferação celular e no centro do caminho de sinalização mais proeminente na patogênese da LMC. A ativação do RAS é mediada por uma série de proteínas adaptadoras como a GRB2. Os eventos de sinalização descendentes do RAS não são tão bem

caracterizados, mas parecem envolver essencialmente proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKS), preferencialmente o caminho cinase JUN (JNK) (FADERL *et al.*, 1999).

A atividade da proteína p210 está relacionada a uma hiper celularidade na medula óssea com predominância granulocítica, de aspecto morfológico normal ou exibindo discreto assincronismo de maturação (BEN-NERIAH *et al.*, 1985; STAM *et al.*, 1985). A célula progenitora ou de menor grau de diferenciação, denominada mieloblasto, encontra-se na medula em proporções inferiores a 10%. Na circulação periférica há leucocitose a níveis superiores a  $25.000/\text{mm}^3$ , o que reflete uma similaridade medular. Pacientes nesse estado de proliferação podem desenvolver, ainda, basofilia, eosinofilia, anemia, trombocitose ou trombopenia e esplenomegalia, com sintomatologia relacionada ao hipermetabolismo celular (ZAGO *et al.*, 2001).

A LMC tem incidência de 1 a 2 casos em 100.000 pessoas por ano e responde a 15% de leucemias em adultos. A média de idade dos pacientes ao diagnóstico é de 45 a 55 anos. Cerca de 10 a 30% dos pacientes tem 60 anos ou mais e esta é uma importante consideração para a utilização de estratégias terapêuticas tais como o transplante de células-tronco (FADERL *et al.*, 1999).

Estudos etiológicos da LMC indicam como causa dessa translocação cromossômica, as radiações ionizantes (ICHIMARU *et al.*, 1978; PRESTON *et al.*, 1994). Mulheres portadoras do câncer de colo uterino que se submeteram às radioterapias apresentam frequência de LMC significativamente maior quando comparadas a grupos de pacientes que não se submeteram à radiação (BOICE *et al.*, 1985).

Relatos sobre a evolução da LMC distinguem a fase crônica ou inicial com duração média de três a cinco anos, evoluindo para fase acelerada e fase blástica, caracterizada por uma resistência terapêutica e acentuação do quadro hematológico (KADAM *et al.*, 1991). A fase crônica é caracterizada pela proliferação e maturação de células mielóides, com aumento da contagem de leucócitos. Em pacientes não tratados, observa-se elevação progressiva na contagem de leucócitos de  $20.000/\text{mm}^3$  para mais de  $500.000/\text{mm}^3$ . Disfunções plaquetárias são comuns na LMC. Trombocitose é encontrada em 25% dos pacientes, ocasionalmente com contagem acima de  $1.000.000/\text{mm}^3$ , e muitos pacientes apresentam tendências a sangramento. A maior parte dos pacientes não apresenta anemia no diagnóstico.

Em geral, a qualidade de vida dos portadores de LMC não é alterada na fase crônica, especialmente se a contagem de leucócitos estiver controlada (GREER *et al.*, 2004).

Aproximadamente 20% dos casos evoluem para a fase acelerada ou blástica. Durante a fase acelerada observa-se aumento do número de células blásticas ou indiferenciadas na medula e periferia, além de evolução clonal citogenética. Com o avanço da doença, o paciente atinge a fase blástica, diagnosticada através do número de blastos acima de 30%, febre, sudorese noturna, anorexia, perda de peso, dores ósseas e aumento da esplenomegalia. Alterações citogenéticas são encontradas em 70% dos casos sendo as mais comuns: cromossomo Ph adicional, trissomias, isocromossomo 17 (KADAM *et al.*, 1991). As fases posteriores à crônica têm curta duração, e correspondem ao período terminal da doença. A sobrevida média dos pacientes portadores de LMC após o diagnóstico é de 4 a 6 anos sendo que as fases acelerada e blástica apresentam duração média de 3 a 6 meses (ZAGO *et al.*, 2000; GREER *et al.*, 2004).

A transformação da doença é freqüentemente precedida de rejeição ao tratamento da leucocitose com aumento nos blastos medulares e sanguíneos, pancitopenia, basofilia, aumentos ou diminuições da contagem de plaquetas não relacionadas à terapia e manifestações clínicas, tais como febre inexplicável, esplenomegalia, doenças extramedulares (sangramentos), perda de peso, dores nos ossos e nas articulações. As mudanças medulares e citogenéticas (evolução clonal, como trissomias e/ou monossomias) ocorrem em 50 a 70% dos pacientes durante a transição das fases acelerada e blástica. Anormalidades moleculares podem corresponder a mudanças citogenéticas (FADERL *et al.*, 1999).

Embora 5% dos casos de LMC não apresentem o cromossomo Ph clássico no estudo citogenético, a análise molecular detecta o rearranjo *BCR-ABL* na maioria dos casos (SAGLIO *et al.*, 2004). Aqueles em que o rearranjo também é negativo tratam-se de uma variante da LMC de menor proliferação de mielócitos e maior número de células monocitóides e neutrófilos atípicos que em geral tem mau prognóstico (KURZROCK *et al.*, 1986; BARTRAM, 1987; WIEDEMANN *et al.*, 1987; DUBÉ *et al.*, 1989; GREER *et al.*, 2004).

Os indivíduos acometidos com LMC Ph positivo são de melhor prognóstico, além de possuírem indicação para transplante. Não havendo doador compatível, esses indivíduos são tratados a fim de prolongar a fase crônica (ZAGO *et al.*, 2001).

O tratamento da LMC baseia-se no emprego de drogas, que são quimioterápicos com a capacidade de promover a redução ao nível normal dos leucócitos circulantes em excesso de acordo com a fase na qual se encontra a doença. O mecanismo de ação destes medicamentos dá-se principalmente pela interferência na síntese do DNA através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (ZAGO *et al.*, 2001). A utilização desses medicamentos pode ocasionar aplasia medular, a qual é definida como uma falência do tecido, além de fibrose pulmonar e amenorréia em mulheres. A quimioterapia seja através do uso de uma única droga ou associada a outros medicamentos, é o método mais eficiente de se controlar a evolução para a fase blástica dessa síndrome.

A utilização inicial do bussulfano e da hidroxiuréia objetiva promover uma rápida resposta clínica e hematológica, porém com manutenção do controle da doença por um período muito curto, aproximadamente 12 meses. Esse fato se deve à manutenção do clone celular mutado, isto é, portador de cromossomo Ph. A ação desses medicamentos é limitada a leucorredução, diminuição dos níveis de leucócitos circulantes na periferia (ZAGO *et al.*, 2001). Dados na literatura relatam que a sobrevida de pacientes tratados com hidroxiuréia, 5 anos, é significativamente maior que os tratados com bussulfano, pouco mais de 3 anos (KENNEDY, 1992).

O interferon, proteínas próprias da resposta imunológica à atividade viral, é também utilizado como inibidor da proliferação dos granulócitos, principalmente na fase blástica, onde os elementos celulares encontram-se nos estágios mais imaturos. Entretanto, seu emprego terapêutico pode provocar reações gerais como auto-imunização e distúrbios da esfera psíquica (TALPAZ *et al.*, 1987).

O transplante de medula óssea alogênico é a única possibilidade de cura da LMC. Sobrevida de 5 anos tem sido relatada em 40 a 70% dos pacientes que receberam transplante durante a fase crônica da doença (SAWYERS, 1999; GOLDMAN, 1997; PASSWEG *et al.*, 1998; HEHLMANN *et al.*, 2000). O transplante de medula óssea está associado ao aumento da mortalidade e da morbidade devido a intercorrências nos períodos pré e pós-transplante como: doença do enxerto contra

o hospedeiro, imunossupressão e toxicidade de múltiplos órgãos (KANTARJIAN *et al.*, 1998; FADERL *et al.*, 1999).

Atualmente uma nova opção de tratamento produzido com base na biologia molecular tem sido testada em pacientes que se tornaram intolerantes ao interferon. A droga STI571, CGP57148B (mesilato de imatinib) ou *Glivec*, atua como componente inibidor do gene *BCR-ABL*, bloqueando o seu sítio de ligação de ATP (Figura 3) (CAPDEVILLE *et al.*, 2002a, 2002b; LEVITZKI, 2002; RADFORD, 2002). A ação do *glivec* é restrita ao clone Ph positivo, impedindo a tradução do gene quimérico e facilitando apoptose. A tradução do gene é bloqueada devido à presença do princípio ativo do *glivec* no sítio de ligação do ATP na p210, impedindo assim, sua autofosforilação. Além da negatização do cromossomo Filadélfia, outras vantagens desse medicamento é a menor freqüência de efeitos colaterais e maiores respostas, clínica e hematológica (BEHAM-SCHMID *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2002; CAPDEVILLE *et al.*, 2002a, 2002b; COHEN *et al.*, 2002; DRUKER, 2002, 2003; HERNANDEZ-BOLUDA & CERVANTES, 2002; LEVITZKI, 2002; RADFORD, 2002; SAWYERS *et al.*, 2002).

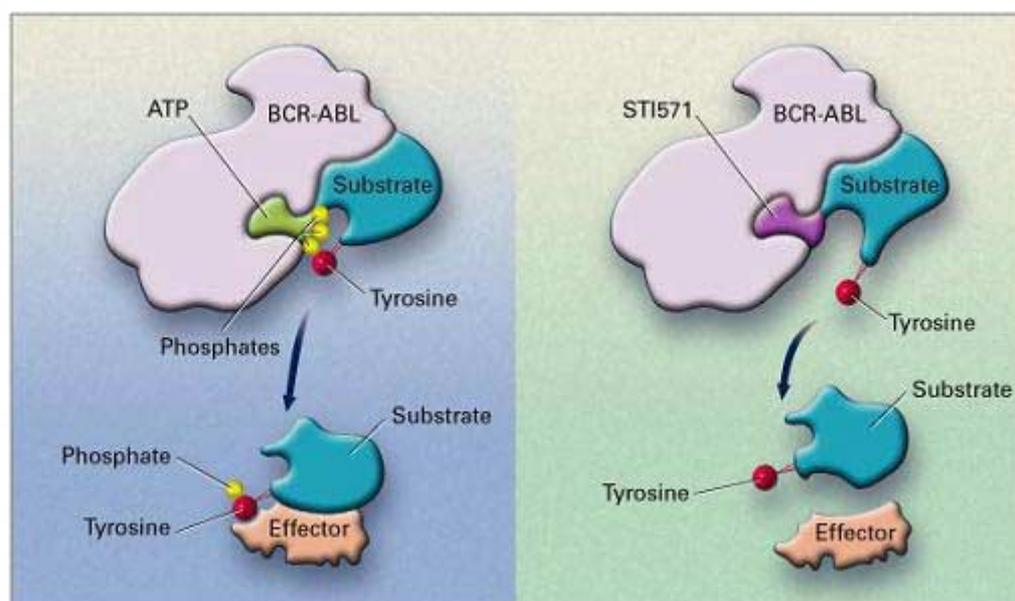


Figura 3. Mecanismo de ação do *glivec*. Fonte: SAVAGE & ANTMAN, 2002.

Apesar dos resultados positivos frente ao *glivec*, constatou-se uma evolução para resistência a essa medicação em alguns pacientes (DRUKER *et al.*, 2001; TALPAZ *et al.*, 2002). O mecanismo mais comum do desenvolvimento de resistência ao *glivec* é a reativação da proteína tirosina cinase, independente da presença da droga, por amplificação gênica (LE COUTRE *et al.*, 2000; GORRE *et al.*, 2001) ou por mutação pontual (GORRE *et al.*, 2001; SHAH *et al.*, 2002). Mutações pontuais no domínio *ABL* cinase no gene BCR/*ABL*, são os mecanismos mais comuns de reativação da proteína híbrida (BRANFORD *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2002).

O estabelecimento da positividade de cromossomos Filadélfia nos quadros clínicos de Leucemias Mielóide Crônica, é relevante principalmente em diagnósticos precoces quando as células normais e os clones anômalos não são distinguíveis por critérios morfológicos. Assim a investigação citogenética da translocação t(9;22) é uma ferramenta de fundamental importância para o diagnóstico e o controle da LMC.

A ação do oncogene *BCR-ABL* tem sua carcinogênese bem reconhecida. A busca por tratamentos mais eficazes, com menores reações adversas é significativamente relevante.

Devido à ação altamente específica do *glivec* sobre o clone mutado, este medicamento desperta grande interesse para a sociedade científica, já sendo utilizado em pacientes portadores da LMC em vários estados no Brasil, e na região do Distrito Federal. Por esse motivo, a análise citogenética para avaliar a presença do cromossomo Filadélfia em pacientes portadores da LMC, pré e pós-tratamento ao *glivec*, torna-se uma ferramenta indispensável para avaliação da eficácia deste medicamento.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito terapêutico do *glivec* em pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC), portadores do cromossomo Filadélfia, através de periódicas análises citogenéticas de células da medula óssea desses pacientes, pré e pós-tratamento ao medicamento.

### **3. CASUÍSTICA & MÉTODO**

Os procedimentos laboratoriais deste estudo foram realizados no Banco de Sangue do Hospital de Base de Brasília (HBDF) em parceria com o Laboratório Multidisciplinar da Faculdade de Ciências da Saúde (LaboCien), no Centro Universitário de Brasília (UniCEUB).

Os pacientes estudados eram provenientes da rede hospitalar pública do Distrito Federal, atendidos no serviço ambulatorial do HBDF, onde era coletado o material para análise, pelos médicos hematologistas responsáveis neste hospital. Todos os pacientes selecionados, que integraram o presente trabalho, são indivíduos adultos.

Após o procedimento de coleta, o material era processado até a fase de obtenção de lâminas, pelos responsáveis desse projeto de pesquisa, no HBDF. Os reagentes necessários foram adquiridos pelo LaboCien e a análise citogenética em microscópio óptico foi realizada no Laboratório Multidisciplinar da Faculdade de Ciências da Saúde, no Centro Universitário de Brasília, pela professora orientadora e sua aluna, em horários pré-determinados.

#### **3.1 Seleção dos pacientes**

Após diagnóstico clínico e laboratorial, foram selecionados 48 pacientes atendidos no Hospital de Base de Distrito Federal da Rede Pública do Distrito Federal, com leucemia mielóide crônica (LMC), em fase crônica da história natural da doença. Todos os pacientes selecionados estavam em uso da medicação STI571.

Para cada paciente, foi preenchido um protocolo, incluindo dados de identificação, antecedentes patológicos, hematológicos e, citogenéticos. Além desses dados, o paciente era questionado quanto ao uso de outras medicações, as quais poderiam interferir na análise citogenética (Anexo 1).

##### **3.1.1 Critérios de Inclusão**

Os critérios de inclusão para esse projeto de pesquisa foram: (1) pacientes com alterações hematológicas, como contagens alteradas dos números de

leucócitos e plaquetas; (2) pacientes com hemogramas e mielogramas recentes, apresentando células com morfologia para leucemia mielóide crônica; (3) pacientes com leucemia mielóide crônica, em fase crônica da história natural da doença portadores do cromossomo filadélfia; e (4) pacientes em tratamento com a medicação STI571, como primeira opção de tratamento ou mesmo, pacientes que já foram anteriormente tratados com os quimioterápicos convencionais e mostraram-se resistentes aos mesmos.

### **3.1.2 Critérios de Exclusão**

Os critérios de exclusão para esse projeto de pesquisa foram: (1) pacientes sem alterações hematológicas visíveis em hemogramas de rotina; (2) pacientes que apesar de apresentarem hemogramas e/ou mielogramas alterados quanto à contagem de células, não apresentem a morfologia conhecida para leucemia mielóide crônica; (3) pacientes que realizaram exames citogenéticos e não apresentam o cromossomo filadélfia em suas células; (4) pacientes com leucemia mielóide crônica, em fase acelerada ou blástica da doença; (5) pacientes portadores de outros tipos de leucemias, como a leucemia linfóide; e (6) pacientes que não se encontram em uso da medicação STI571.

## **3.2 Estudo citogenético em cultura temporária de células da medula óssea**

Para a avaliação citogenética dos pacientes, utilizou-se do método de cultura temporária de células da medula óssea, conforme a técnica modificada de MOORHEAD *et al.*, (1960).

O item descrito a seguir – **Colheita de amostra de células da medula óssea** – foi realizado pelos médicos responsáveis por esse procedimento no HBDF. A partir do item – **Técnica de sementeira de células da medula óssea** – a responsabilidade de sua realização era dos participantes desse projeto de pesquisa. Todo o procedimento descrito abaixo foi realizado sob observação e com auxílio da professora orientadora do projeto.

### **3.2.1 Colheita de amostra de células da medula óssea**

Após a devida anuência dos pacientes em participar desse estudo (Anexo 2), e seguindo os preceitos recomendados pela Comissão de Ética em Pesquisa, foi realizada, pelo médico responsável, a colheita de 10 mL de aspirado medular em todos os integrantes do presente projeto de pesquisa, mediante punção do osso esterno ou crista ilíaca posterior, utilizando-se de seringas e agulhas descartáveis estéreis. A superfície interna da seringa foi previamente umedecida com uma solução de heparina sódica (Liquemine "Roche" ®, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S/A, Rio de Janeiro, RJ), frasco-ampola de 5000 U/mL, com desprezo de todo o excesso da solução anticoagulante contida no interior da seringa.

### **3.2.2 Técnica de semeadura de células da medula óssea**

Apenas parte do aspirado medular colhido, cerca de 5mL, foi utilizado para esse projeto. O aspirado medular colhido era rapidamente introduzido em um tubo de ensaio estéril juntamente com meio de cultura RPMI-1640, com glutamina e sem bicarbonato de sódio. A seguir, procedeu-se a semeadura em quatro frascos contendo meio de cultura completo. O processo de semeadura consiste na adição de 1,0 mL do aspirado medular, utilizando-se de pipeta graduada estéril, em cada frasco contendo 4,0 mL do meio de cultura, resultando no volume final de 5 mL. Todas as amostras foram semeadas no mesmo dia de sua respectiva obtenção, com observação rigorosa dos princípios de assepsia e sob câmara de fluxo laminar.

### **3.2.3 Composição do meio de cultura**

O meio RPMI-1640, com glutamina e sem bicarbonato de sódio (Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK), contendo 10,42g sob a forma de pó, foi dissolvido em 1000 mL de água destilada e deionizada.

Ao meio de cultura RPMI-1640, procedeu-se à suplementação dos seguintes componentes: (1) Soro bovino fetal (Laboratório Cultilab, Campinas, SP), utilizado na proporção de 15% do volume total da cultura; (2) Penicilina G potássica cristalina "Wieth" ® (Laboratórios Wieth Ltda., São Paulo, SP), 100 U em 20 mL; (3) Sulfato de estreptomicina "Wieth" ® (Laboratórios Wieth Ltda., São Paulo, SP), 0,025 mg em 20

mL; (4) Heparina sódica, frasco-ampola de 5000 U/mL, (Liquemine "Roche" ®, Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos S/A, Rio de Janeiro, RJ).

#### **3.2.4 Técnica de cultura de células da medula óssea**

Após a semeadura, os frascos dos meios de cultura eram colocados em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> úmida, sob temperatura de 37°C, durante determinados períodos de tempo. Foram realizadas para cada paciente duas culturas durante diferentes períodos de tempo, sendo eles: (1) a cultura direta, realizada no mesmo dia da obtenção do material e subsequente semeadura e (2) a cultura de 24 horas, realizada 24 horas após obtenção e semeadura do material. Para todos os tempos determinados acima foram realizadas culturas em duplicatas. Todas as culturas foram tratadas com colchicina "alkaloid" (Fischer Scientific CO, USA) para bloquear a divisão celular em metáfase. A cada frasco de cultura foi adicionada 0,05 mL da colchicina diluída em água estéril, na concentração de 0,016 mg/mL, uma hora antes de completar o período de incubação.

#### **3.2.5 Técnica de separação e fixação das células**

Após o período de incubação, procedeu-se à transferência do conteúdo de cada frasco de cultura para o seu respectivo tubo de centrifuga de fundo cônico, previamente identificado. Os tubos cônicos eram colocados na centrífuga (Centrífuga International, modelo K, tamanho 2, rotor nº 250, não refrigerada) durante o período de 10 minutos, a 1000 rotações por minuto. A seguir, o sobrenadante resultante da centrifugação era desprezado. Ao resíduo contendo as células acrescentou-se 8 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio 0,075 M (Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda., Diadema, SP), previamente aquecida sob temperatura de 37°C, seguida da agitação em Vortex. Após completa homogeneização, os tubos eram mantidos em estufa, sob temperatura de 37°C, por quinze minutos. Em seguida, os tubos eram submetidos à nova centrifugação, durante o período de cinco minutos, a 1000 rotações por minuto. O sobrenadante foi novamente desprezado, adicionando-se ao resíduo 5 mL de fixador recém-preparado, constituído de uma solução de metanol (Álcool metílico P.A., Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ) e ácido acético (Ácido acético glacial P.A., Labsynth Produtos Para Laboratórios Ltda., Diadema, SP), na proporção de 3 para 1. A homogeneização no Vortex foi repetida,

seguida da centrifugação a 1000 rotações por minuto, por 5 minutos. Esse último procedimento, com acréscimo do fixador, era repetido por pelo menos mais três vezes. À última fixação acrescentou-se apenas 1 mL da solução fixadora sobre o resíduo de células com a finalidade de se obter a diluição apropriada para o preparo das lâminas.

### **3.2.6 Preparo e coloração das lâminas**

As lâminas de vidro utilizadas na preparação citológica foram adequadamente limpas e mantidas em água destilada, dentro de geladeira, sob temperatura de 4 a 6°C. No momento do uso, as lâminas, já fora da geladeira, eram posicionadas de modo ligeiramente inclinado e, sobre sua superfície ainda úmida, era depositada uma gota do resíduo de células.

Após devida secagem das lâminas, estas passaram pelo processo de bandeamento G, utilizando-se a enzima tripsina. As lâminas, assim preparadas, foram introduzidas em solução corante de Giemsa (Grupo Química, Penha, RJ) diluída em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 (Fosfato dibásico de sódio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Fosfato monobásico de potássio –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck S/A Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ), na proporção de 1 para 30, durante o período de cinco minutos. Cada lâmina devidamente identificada e corada era então reservada para avaliação citogenética.

### **3.2.7 Análise Citogenética**

A análise citogenética utilizada nessa pesquisa obedeceu às regras do “teste cego”, técnica que impede o cientista de identificar o paciente do qual pertence o material analisado. Utilizou-se microscópio óptico, com objetiva de imersão para ampliação de 100 X e ocular de 10X, com um aumento final da imagem de 1000X.

Para a avaliação cromossômica foram analisadas em média 37 metáfases de cada paciente. A quantidade de células analisadas foi diretamente proporcional à qualidade da cultura dos mesmos. As alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas das células da medula óssea foram observadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características gerais dos pacientes

As características gerais dos pacientes selecionados se referem à idade atual, o sexo, o tempo de diagnóstico, a idade dos pacientes quando foi realizado o diagnóstico, a data de início do tratamento e conseqüentemente o tempo de uso do *Glivec*.

Os dados de cada paciente foram inseridos em tabela do Microsoft Excel para posterior análise estatística. A Tabela 1 mostra a distribuição dos pacientes quanto ao sexo. Nota-se uma pequena diferença na ocorrência da doença entre os sexos, já que 52,1% dos pacientes eram do sexo masculino, sendo o restante (47,9%) do sexo feminino.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) quanto ao sexo.

<b>Sexo</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Feminino</b>	23	47,9
<b>Masculino</b>	25	52,1
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

Os pacientes estudados foram agrupados em faixas etárias na Tabela 2. A idade dos pacientes encontra-se distribuída de forma razoavelmente homogênea até os setenta anos de vida (93,7%). A partir da década dos setenta, observa-se uma considerável diminuição desse percentual, com apenas 6,3% dos pacientes.

Tabela 2. Distribuição de freqüência da idade dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC).

<b>Idade (anos)</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>21 – 30</b>	8	16,7
<b>31 – 40</b>	9	18,8
<b>41 – 50</b>	11	22,9
<b>51 – 60</b>	9	18,8
<b>61 – 70</b>	8	16,7
<b>71 – 80</b>	3	6,3
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

A Tabela 3 relata o tempo de diagnóstico da doença para os pacientes em estudo. Observa-se que a maioria dos pacientes encontra-se com menos de 6 anos de evolução da doença (79,1%), sendo que o maior percentual desses pacientes encontra-se entre 2 a 6 anos de diagnóstico (70,8%). Sendo assim poucos pacientes (18,7%) apresentam mais de 6 anos de diagnóstico.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) quanto ao tempo de diagnóstico.

<b>Tempo de Diagnóstico (anos)</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>0 – 2</b>	4	8,3
<b>2 – 4</b>	17	35,4
<b>4 – 6</b>	17	35,4
<b>6 – 8</b>	5	10,4
<b>&gt; de 8</b>	4	8,3
<b>Não relatado</b>	1	2,1
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

Através da data de realização do diagnóstico para cada paciente, foi possível elaborar a Tabela 4, a qual demonstra as faixas etárias dos pacientes, quando realizado o diagnóstico da doença. A faixa etária na qual se concentrou a maior

freqüência dos pacientes foi na década dos cinquenta anos de vida, com 31,3% dos pacientes. Entre as décadas de quarenta e cinquenta anos de vida, se encontram mais da metade (52,1%) dos pacientes diagnosticados. A partir dos sessenta anos de idade o percentual sofre um decréscimo significativo (6,3%).

Tabela 4. Distribuição de freqüência da idade dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) ao diagnóstico.

<b>Idade ao Diagnóstico (anos)</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>21 – 30</b>	11	22,9
<b>31 – 40</b>	8	16,7
<b>41 – 50</b>	10	20,8
<b>51 – 60</b>	15	31,3
<b>61 – 70</b>	3	6,3
<b>Não Relatado</b>	1	2,1
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

A Tabela 5 relata o tempo de tratamento desses pacientes com o STI571, CGP57148B ou *Glivec*. Mais da metade desses pacientes (54,2%) encontram-se no intervalo de 2 a 3 anos de uso da medicação. Nota-se, porém, que a grande maioria (83,4%) encontra-se entre 1 a 3 anos de uso da droga.

Tabela 5. Distribuição dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) quanto ao tempo de tratamento com *Glivec*.

<b>Tempo de Uso do Glivec (anos)</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>1 – 2</b>	14	29,2
<b>2 – 3</b>	26	54,2
<b>3 – 4</b>	6	12,5
<b>4 – 5</b>	2	4,2
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

#### 4.2 Características hematológicas dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) ao diagnóstico e após tratamento com STI571, CGP57148B ou Glivec.

A Tabela 6 mostra a contagem de leucócitos totais antes e após o tratamento com *Glivec*. Com relação a esse dado, os pacientes pré-tratamento apresentaram índices variando de 4.600 a 582.000/mm<sup>3</sup>. O valor referencial para a contagem de leucócitos compreende o intervalo de 4.500 a 10.000/mm<sup>3</sup>, no qual se encontram 12,5% dos pacientes pré-tratamento desse estudo. O maior percentual relatado encontra-se no intervalo de 100.001 a 200.000/mm<sup>3</sup> (25,0%).

Com relação à mesma tabela, pode-se perceber a diferença entre a contagem de leucócitos totais desses mesmos pacientes antes e após o tratamento com *Glivec*. Após tratamento, os índices variaram de 2.400 a 19.400/mm<sup>3</sup>. No intervalo do valor referencial para a contagem de leucócitos se encontram 41,7% dos pacientes, enquanto que apenas 8,3% desses apresentaram contagens superiores a 10.000/mm<sup>3</sup>.

Tabela 6. Distribuição dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) quanto à contagem de leucócitos, pré e pós-tratamento ao *Glivec*.

Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Pré-tratamento	%	Pós-tratamento	%
<b>Até 4.500</b>	0	0,0	10	20,8
<b>4.501 - 10.000</b>	6	12,5	20	41,7
<b>10.001 - 20.000</b>	2	4,2	4	8,3
<b>20.001 - 50.000</b>	3	6,3	0	0,0
<b>50.001 - 100.000</b>	9	18,8	0	0,0
<b>100.001 - 200.000</b>	12	25,0	0	0,0
<b>200.001 - 400.000</b>	6	12,5	0	0,0
<b>400.001 - 600.000</b>	3	6,3	0	0,0
<b>Não Relatado</b>	7	14,6	14	29,2
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

A contagem de plaquetas dos pacientes pré-tratamento também se apresentou bastante alterada dos valores referenciais (150.000 – 450.000/mm<sup>3</sup>), como verificados na Tabela 7. Uma porcentagem significativa de pacientes (37,5%) apresentava índices normais para a contagem de plaquetas, porém para 35,4% dos pacientes este índice encontrava-se superior a 450.001/mm<sup>3</sup>. Pacientes pré-tratamento apresentaram índices variando entre 89.000 até 1.685.000/mm<sup>3</sup>. Pequena porcentagem (10,9%) apresentou valores reduzidos, abaixo dos valores referenciais.

Após tratamento com *Glivec* a contagem de plaquetas apresentou-se de maneira distinta quando comparada aos mesmos pacientes, antes do tratamento. Mais da metade dos pacientes (66,7%) apresentou valores de plaquetas até 450.000/mm<sup>3</sup>, enquanto apenas 4,2% dos pacientes apresentaram índices superiores ao da normalidade. Pacientes pós-tratamento apresentaram índices variando de 57.000 até 854.000/mm<sup>3</sup>.

Tabela 7. Distribuição dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) quanto à contagem de plaquetas, pré e pós-tratamento ao *Glivec*.

<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Pré- tratamento</b>	<b>%</b>	<b>Pós- tratamento</b>	<b>%</b>
<b>Até 150.000</b>	6	12,5	15	31,3
<b>150.001 - 450.000</b>	18	37,5	17	35,4
<b>Acima 450.001</b>	17	35,4	2	4,2
<b>Não Relatado</b>	7	14,6	14	29,2
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>

### **4.3 Resultado da análise citogenética dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), pré e pós-tratamento ao STI571, CGP57148B ou *Glivec*.**

A Tabela 8 demonstra os resultados da análise citogenética das células da medula óssea desses pacientes selecionados, os quais se encontravam em fase crônica da história natural da doença, antes e após o tratamento com *Glivec*. A análise citogenética pré-tratamento demonstrou que o cromossomo Ph estava presente em todos os pacientes em estudo, variando o percentual das células positivas. Cerca de 80% (82,5%) desses pacientes apresentam o cromossomo Ph em 91 a 100% das células analisadas. Em uma porcentagem significativamente menor (15,0%) o cromossomo Ph foi visível em torno de 35 a 90% das células analisadas. Apenas 1 paciente (2,5%) apresentou uma resposta citogenética diferenciada, apresentando o cromossomo Ph em menos de 35% das suas células analisadas.

A análise citogenética pós-tratamento foi verificada com 6, 12, 18, 24 e 28 meses. Após 6 meses de tratamento, 30 pacientes foram analisados. Mais de 60% dos pacientes (63,4%) obtiveram resposta citogenética maior sendo que a resposta completa foi observada em 26,7%. Apenas 10% dos pacientes não apresentaram resposta.

A resposta citogenética após 12 meses de tratamento demonstrou que o percentual de pacientes com resposta completa elevou-se para 33,3% enquanto que o percentual de pacientes que não responderam à droga sofreu um decréscimo significativo para 3,3%. Vale a pena ressaltar que 73,3% dos pacientes obtiveram resposta citogenética maior.

Após 18 e 24 meses, mais de 50% dos pacientes analisados apresentaram negativação do cromossomo Ph (resposta citogenética completa). Entretanto, foram observados percentuais maiores de pacientes que não responderam ao tratamento (5,3 e 15,4%, respectivamente).

A realização da análise citogenética após 28 meses de tratamento, só foi possível em apenas 8 pacientes. Apesar da diminuição da amostra, o percentual de pacientes com resposta completa foi de 37,5%, embora quando considerados todos os pacientes com resposta citogenética maior, este foi de 62,5%. Por outro lado,

uma porcentagem significativamente maior (25%) de pacientes não responderam citogeneticamente ao tratamento.

Tabela 8. Resultado da análise citogenética dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), pré e pós-tratamento ao *Glivec*.

Resposta Citogenética		% Ph	Pré-tratamento		6 Meses		12 Meses		18 Meses		24 Meses		28 Meses	
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Maior	Completa	0	0	0,0	8	26,7	10	33,3	10	52,6	7	53,8	3	37,5
	Parcial	1 - 34	1	2,5	11	36,7	12	40,0	3	15,8	2	15,4	2	25,0
Menor		35 - 90	6	15,0	8	26,7	7	23,3	5	26,3	2	15,4	1	12,5
Nenhuma		91 - 100	33	82,5	3	10,0	1	3,3	1	5,3	2	15,4	2	25,0
<b>Total</b>			<b>40</b>	<b>100,0</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	<b>19</b>	<b>100,0</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo relata a casuística de um Centro de Tratamento de Doenças Hematológicas no DF, o Núcleo de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base do Distrito Federal. Devido ao tempo disponível para realização desse projeto, a incidência da LMC e a disponibilidade do *Glivec*, foi possível a formação de um grupo de estudo composto por 48 pacientes.

A idade dos pacientes quando diagnosticados apresentou variação muito ampla (de 21 a 68 anos de vida), como também descrevem LLOYD *et al.*, (2002). SELVIN *et al.*, (1983), em estudo epidemiológico realizado de 1966 a 1977, descrevem que apenas 10% dos casos de LMC foram diagnosticados até a segunda década de vida. Sendo assim, a grande maioria dos casos corresponde às décadas posteriores.

No presente estudo, a faixa etária com maior frequência de pacientes foi entre os cinquenta anos de vida (31,3%). Entre as décadas de quarenta e cinquenta anos, concentrou-se mais da metade (52,1%) dos pacientes diagnosticados. JONTE *et al.*

(1993) corroboram esse dado, pois descrevem essa neoplasia como sendo mais freqüente em indivíduos de meia idade, isto é, entre a quinta e sexta década de vida. A partir dos sessenta anos de idade o percentual sofre um decréscimo significativo (6,3%), fato que pode ser compreendido pela maior taxa de mortalidade característica dessa faixa etária na população humana. Constatou-se a existência de uma relação direta entre a idade dos pacientes portadores de LMC e a incidência da doença (MENZIN *et al.*, 2004).

Os 48 pacientes estudados apresentaram distribuição homogênea com relação ao sexo. A diferença entre esses não apresentou relevância estatística (47,9% sexo feminino e 52,1% sexo masculino). Dados na literatura mostram que para esta síndrome, a freqüência apresenta-se moderadamente aumentada para o sexo masculino (SELVIN *et al.*, 1983; JONTE *et al.*, 1993). Contudo, dados sobre a predominância do sexo masculino são ainda discordantes na literatura científica (CASTRO-MALASPINA *et al.*, 1983; PRESTON *et al.*, 1994; MENZIN *et al.*, 2004), principalmente pelo fato de que, hoje em dia, as mulheres se tornaram ativas profissionalmente, sendo também expostas aos efeitos do meio ambiente, como as radiações ionizantes.

Dentre a população amostra observa-se que a grande maioria dos pacientes encontra-se com menos de 6 anos de evolução da doença (79,1%), sendo que o maior percentual desses pacientes encontra-se entre 2 a 6 anos de diagnóstico (70,8%). Os dados com relação ao tempo de diagnóstico da doença e, conseqüentemente, à sua fase de desenvolvimento tornaram-se acessíveis por fazerem parte de um estudo que já vem sendo desenvolvido há mais tempo por pesquisadores e estudantes dessa mesma instituição (UniCEUB). Pacientes com tempo superior a seis anos de diagnóstico (18,7%) preenchem o último grupo desse trabalho.

A contagem total de leucócitos no sangue periférico é um dado hematológico significativo, o qual retrata a condição imunológica de um indivíduo, considerando-se que seus valores de referência variam de 4.500 a 10.000/mm<sup>3</sup> para indivíduos saudáveis (LORENZE, 1999; ZAGO *et al.*, 2001). A contagem de leucócitos encontra-se elevada ao diagnóstico (CANELLOS, 1976; ROWE, 1983), caracterizada por leucocitose, e aumenta progressivamente em pacientes não

tratados, sendo que alguns pacientes apresentam ciclos de variação nessa contagem (INBAL *et al.*, 1983; UMEMURA *et al.*, 1986).

Os pacientes pré-tratamento do presente estudo apresentaram índices variando de 4.600 a 582.000/mm<sup>3</sup>. O maior percentual verificado foi o que compreende o intervalo de 100.001 a 200.000/mm<sup>3</sup> (25,0%), sendo que uma porcentagem significativa (56,3%) desses pacientes apresentou índices entre 50.0001 a 200.000/mm<sup>3</sup>, caracterizando um quadro de leucocitose acentuada. Pacientes pós-tratamento apresentaram índices variando de 2.400 a 19.400/mm<sup>3</sup>. O maior percentual verificado foi o que compreende o intervalo de valores de referência para normalidade (41,7%).

O fenômeno da coagulação é resultado de um conjunto de eventos que envolvem as plaquetas, fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos. Os valores de referência para indivíduos saudáveis variam de 150.000 a 450.000/mm<sup>3</sup>. As plaquetas apresentam uma vida média muito curta. Sendo assim, elas são constantemente renovadas para a garantia da integridade vascular. Pacientes portadores de LMC demonstram índices aumentados de plaquetas, acompanhando o aumento proporcional dos leucócitos, já que ambos originam-se do mesmo precursor mielóide. Em contrapartida, a eritropoiese encontra-se sensivelmente diminuída devido ao aumento exacerbado da contagem de leucócitos (DOSEK *et al.*, 1972). MASON *et al.* (1974), relatam uma contagem de plaquetas elevada em 50% dos casos ao diagnóstico. FADERL *et al.* (1999) relatam em seu trabalho que as características clínicas, a resposta ao tratamento e o prognóstico da LMC são similares, independentemente de qual região do gene *BCR* (cromossomo 22) ocorresse à quebra, com exceção para a contagem de plaquetas. No presente estudo, 35,4% dos pacientes pré-tratamento apresentaram índices superiores a 450.001, com a máxima de 1.685.000/mm<sup>3</sup>. Após tratamento com Glivec esses índices apresentaram-se muito modificados, com 35,4% dos pacientes apresentando valores dentro da normalidade para as plaquetas. Apenas 2 pacientes (4,2%) mantiveram altas contagens de plaquetas. Não foi possível a obtenção dos dados hematológicos de todos os pacientes participantes desse estudo, o que pode ter interferido nesses valores percentuais. Contudo, ficou claro o comportamento distinto entre as contagens de leucócitos e plaquetas dos pacientes em estudo.

Cerca de 95% dos casos de LMC apresentam a translocação cromossômica recíproca entre dois cromossomos, o 9 e o 22, resultando no cromossomo Filadélfia (Ph). O cromossomo Ph clássico, t(9;22)(q34;q11), origina um gene quimérico ativo para a síntese de uma proteína anormal, a p210, a qual desregula a divisão celular, potencializando-a (SAGLIO et al., 2004). Todos os pacientes pré-tratamento apresentavam o cromossomo Ph na análise citogenética, sendo que 82,5% apresentavam essa alteração cromossômica em 100% de suas células analisadas da medula óssea, caracterizando o quadro completo de leucemia mielóide crônica.

A conduta terapêutica, após o diagnóstico de LMC, é a administração de quimioterápicos com o intuito principal de reduzir, a níveis normais, a contagem de leucócitos. Conseqüentemente, espera-se uma regressão do quadro clínico com diminuição de volume do baço e fígado. Dentre a população amostra, todos os pacientes já haviam sido diagnosticados por critérios clínicos, hematológicos e citogenéticos, como portadores da leucemia mielóide crônica. Como mencionado anteriormente, o tempo de diagnóstico concentrou-se entre 2 a 6 anos. Desta forma, todos os pacientes em estudo já haviam sido previamente submetidos a alguma quimioterapia, especificamente hidroxiuréia e/ou interferon  $\alpha$ .

A hidroxiuréia é um inibidor de ribonucleases que atua interferindo na síntese de DNA impedindo a divisão e proliferação celular. Dados da literatura demonstram que esta medicação é considerada paliativa, pois quando administrada promove apenas uma leucorredução, minimizando os sintomas clínicos e hematológicos. Desta forma, embora a resposta hematológica tenha sido observada em mais de 90% dos pacientes, a resposta citogenética não é evidenciada (SAWYERS, 1999; FADERL et al., 1999).

Resposta citogenética completa com interferon- $\alpha$  tem sido relatada em aproximadamente 8 a 38% dos pacientes com LMC em fase crônica recém diagnosticada (SAWYERS, 1999; GUILHOT et al., 1997; OHNISHI et al., 1995). O Interferon  $\alpha$  em pacientes que se encontram na fase acelerada ou blástica da LMC tem atividade modesta. A resposta hematológica pode ser obtida, mas a resposta citogenética torna-se pouco freqüente e transitória. Além disso, reações adversas são muito freqüentes na terapêutica com interferon  $\alpha$ . Mais de 90% dos pacientes apresentam sintomas gripais, fadiga, perda de peso, depressão, insônia, disfunção renal e pancitopenia, devido a sua toxicidade. Aproximadamente 25% dos pacientes

necessitam interromper temporariamente ou definitivamente devido à intolerância a droga (GUILHOT *et al.*, 1997; HEHLMANN, *et al.*, 1994).

O *Glivec* é um inibidor da transdução do sinal celular que inativa potentemente a tirosina cinase *BCR-ABL* a nível celular, *in vitro* e *in vivo* (BUCHDUNGER *et al.*, 1996). O composto inibe seletivamente a proliferação e induz apoptose nas linhagens celulares *BCR-ABL* positivas para o cromossomo Filadélfia. Em modelos animais, utilizando células tumorais *BCR-ABL* positivas, o composto mostra atividade anti-tumoral quando utilizado como um agente único. Linhagens celulares *BCR-ABL* negativas não sofrem a ação do *Glivec*, o que sugere que sua atividade é específica para o clone de células mutado (DRUKER *et al.*, 1996; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997).

Foram realizados, em média, 3 cariótipos com aproximadamente 30 células analisadas para cada paciente em culturas direta e de 24 horas. É importante ressaltar que este quantitativo de células analisadas é significativo. Em alguns casos houve a necessidade de repetição da amostra, pois o crescimento das células foi insuficiente para análise, devido à ação da droga bem como ao comportamento das células em cultura.

O tempo de tratamento com o STI571 - *Glivec*, concentra-se no intervalo de 2 a 3 anos com mais da metade desses pacientes (54,2%). Nota-se, porém, que a grande maioria (83,4%) encontra-se entre 1 a 3 anos de uso da droga. O critério para a utilização do *Glivec* foi o desenvolvimento de resistência às drogas empregadas anteriormente, ou por acúmulo de efeitos colaterais aos mesmos (DEININGER *et al.*, 2005).

O resultado da análise citogenética demonstrou a eficácia dessa medicação. A análise citogenética pós-tratamento foi realizada com 6, 12, 18, 24 e 28 meses após início da medicação. A partir de seis meses de uso, 90% dos pacientes responderam de alguma forma a esse tratamento. Resposta maior foi verificada em 63,4% dos pacientes sendo que, para cerca de 30% dos pacientes, a negatificação do clone de células mutado foi total nesse primeiro semestre de tratamento, caracterizando uma resposta completa do ponto de vista clínico, hematológico e citogenético. Outros 26,7% dos pacientes demonstraram uma resposta menor, isto é, o cromossomo Ph mantém-se visível em torno de 35 a 90% das células medulares.

A resposta citogenética após 12 meses de tratamento demonstrou que o percentual de pacientes com resposta completa elevou-se para 33,3% enquanto que o percentual de pacientes que não responderam à droga sofreu um decréscimo significativo para 3,3%. Vale a pena ressaltar que 73,3% dos pacientes obtiveram resposta citogenética maior.

Após 18 e 24 meses, mais de 50% dos pacientes analisados apresentaram negatização do cromossomo Ph (resposta citogenética completa). Entretanto, foram observados percentuais maiores de pacientes que não responderam ao tratamento (5,3 e 15,4%, respectivamente).

A realização da análise citogenética após 28 meses de tratamento, só foi possível em apenas 8 pacientes. Apesar da diminuição da amostra, o percentual de pacientes com resposta completa foi de 37,5%, embora quando considerados todos os pacientes com resposta citogenética maior, este foi de 62,5%. Por outro lado, uma porcentagem significativamente maior (25%) de pacientes não responderam citogeneticamente ao tratamento.

Os pacientes que não obtiveram resposta citogenética maior durante 12 meses ou mais foram reintroduzidos ao tratamento com hidroxiuréia e/ou interferon. A ocorrência de graves efeitos colaterais como aplasia medular, edema, dores ósseas e alterações cardíacas, também levou à suspensão do tratamento de alguns pacientes. No presente estudo, seis pacientes saíram do programa sendo 4 por falta de resposta citogenética e/ou efeitos colaterais e 2 por óbito.

Apesar dos resultados positivos frente ao STI571, constatou-se uma evolução para resistência a essa medicação em alguns pacientes (DRUKER *et al.*, 2001; TALPAZ *et al.*, 2002) o que favorece a progressão da doença. A resistência hematológica ao Imatinib (Glivec) é definida como a falha da resposta hematológica completa nos pacientes com LMC na fase crônica (KANTARJIAN *et al.*, 2002), falha do retorno para fase crônica nos pacientes na fase aguda (GAMBACORTI-PASSERINI, 2003) ou falha de resposta parcial nos pacientes com LMC na crise blástica ou LLA Ph-positivo (SAWYERS *et al.*, 2002). A resistência pode ser intrínseca, sem resposta ao imatinib depois do início do tratamento; ou adquirida, isto é, a resistência desenvolve-se após o paciente ter obtido uma resposta objetiva (Friedrich, 2004).

O mecanismo mais comum do desenvolvimento de resistência ao Glivec é a reativação da proteína tirosina cinase, independente da presença do glivec, por amplificação gênica (LE COUTRE *et al.*, 2000; GORRE *et al.*, 2001) ou por mutação pontual (GORRE *et al.*, 2001; SHAH *et al.*, 2002). Mutações pontuais no domínio *ABL* cinase no gene *BCR/ABL*, são os mecanismos mais comuns de reativação da proteína híbrida (BRANFORD *et al.*, 2002; SHAH *et al.*, 2002). A resistência clínica ao Glivec (imatinib) é mais comum nos pacientes que se encontram em fases mais avançadas, e ocorre dentro de 3 a 6 meses após o início do tratamento em mais de 70% dos pacientes (SAWYERS *et al.*, 2002). Após 2 anos de tratamento, 10 % dos pacientes em fase crônica, 50% em fase acelerada e 61% em crise blástica recaem após resposta hematológica inicial. Na fase crônica, poucos pacientes tiveram recaída após resposta citogenética completa (GAMBACORTI-PASSERINI, 2003).

KANTARJIAN *et al.*, (2003), afirmam que as melhores respostas, citogenética e hematológica, estão correlacionadas ao tempo de diagnóstico, a idade do paciente e a precocidade da introdução da quimioterapia adequada. Para esses pesquisadores, os pacientes respondem melhor ao *Glivec* quando iniciados com esta terapia na fase crônica precoce da LMC. Pacientes em fase crônica tardia da LMC são mais susceptíveis ao surgimento de novas mutações em regiões da proteína *BCR-ABL*, as quais impedem a ação do *Glivec*, conferindo assim, uma resistência ao medicamento (THOMAS *et al.*, 2004; GUMIREDDY *et al.*, 2005).

SAWYERS e colaboradores descobriram que, pelo menos na clínica, o principal mecanismo subjacente à resistência de doentes com LMC ao imatinib reside numa mutação do gene *BCR-ABL* que afeta a região tirosina quinase da proteína alvo e reduz a capacidade do fármaco para se ligar à proteína e bloquear a sua atividade. Até agora foram detectadas cerca de 15 mutações em duas áreas diferentes da quinase que provocam resistência ao fármaco. Um tipo de mutação altera a forma do local de ligação do fármaco, enquanto que, em outros casos as mutações parecem impedir a quinase de se dobrar da maneira necessária para a ligação do imatinib.

Outras drogas estão sendo testadas para serem utilizadas por aqueles pacientes que desenvolvem resistência ao Glivec. É o caso do Tasisa (nilotinib), uma nova droga que em cinco meses de uso demonstrou uma resposta

hematológica completa em 92% dos pacientes com LMC na fase crônica (KANTARJIN *et al.*, 2006).

Uma particularidade deste presente estudo é o caso de um dos pacientes que obteve resposta citogenética completa após seis meses de uso *Glivec*. Este paciente foi submetido a vários outros tratamentos como hidroxiuréia, interferon e transplante de medula óssea desde o seu diagnóstico. Uma vez que este não apresentou resposta citogenética completa, o paciente foi encaminhado ao tratamento com *Glivec*.

Após os primeiros 18 meses de tratamento 52,6% dos pacientes obtiveram resposta citogenética completa. Um paciente foi submetido à pesquisa do gene quimérico BCR-ABL por técnicas moleculares, as quais demonstraram ausência completa desse gene. Vale a pena ressaltar que o diagnóstico molecular ainda é um procedimento caro, tornando-se inviável para a maioria dos pacientes da rede pública de saúde.

Várias pesquisas vêm sendo realizadas em diferentes países, na tentativa de se comprovar a eficácia da droga. O Estudo 106 é um estudo randomizado de fase III (estudos experimentais em grande escala populacional) iniciado em junho de 2000 com duração prevista para seis anos, que envolve 1106 pacientes de 177 centros de tratamento em 16 países. A finalidade deste trabalho é avaliar a eficácia do *Glivec* quando comparado ao interferon associado a outro quimioterápico, a citarabina. Estudos preliminares demonstraram que os pacientes que receberam o *Glivec* como droga de primeira escolha tiveram resposta citogenética mais significativa. Esses resultados sugeriram uma mudança de protocolo para os pacientes que não obtiveram uma resposta citogenética maior após um ano de terapia convencional com o interferon associado ao Ara-C (DRUKER, 2002). Após um período mediano de 8 meses de tratamento, diante da melhoria da qualidade de vida proporcionada pelo *Glivec*, apenas 7% dos pacientes permaneceram em uso do interferon (KANTARJIAN, 2003).

Em outubro de 2001, a Portaria nº 431, publicada no Diário Oficial da União pelo Ministério da Saúde/Brasil, determinou critérios para o estadiamento da doença e normatizou o uso de quimioterápicos no tratamento de cada fase da LMC. O tratamento inicial da fase crônica da LMC é realizado com um leucorreduzidor, a hidroxiuréia. O interferon é empregado quando o uso da hidroxiuréia não apresentar

resposta hematológica. O *Glivec* é introduzido como droga de primeira escolha para o tratamento de pacientes que apresentam intolerância ao interferon. Com a conclusão dos estudos em andamento, vislumbra-se a escolha dessa nova terapêutica imediatamente ao diagnóstico da LMC.

A realização da análise citogenética é essencial, tanto para o diagnóstico como para o prognóstico dos pacientes com determinado quadro clínico e hematológico. Por isso, estabelecer a presença do cromossomo Filadélfia nas células da medula óssea desses pacientes torna-se procedimento relevante e essencial para garantia de sobrevida maior, e mais ainda, para uma melhoria na sua qualidade de vida, ainda que curta.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais deste estudo, pode-se concluir que:

- A medula óssea é um tecido com alto índice mitótico, devido a sua especialização em renovar as células sanguíneas. Sendo assim, sua manipulação e, principalmente, seu comportamento em cultura “*in vitro*” tornou a normatização dessa técnica um procedimento exigente, trabalhoso e até artesanal na sua execução.
- A idade dos pacientes quando diagnosticados apresentou variação muito ampla, embora a faixa etária com maior frequência de pacientes foi entre as décadas de quarenta e cinquenta anos de vida.
- Os 48 pacientes apresentaram distribuição homogênea em relação ao sexo, não sendo significativa a diferença entre eles. O sexo feminino correspondeu a 47,9% dos pacientes, enquanto o masculino, 52,1%.
- Cerca de 80% dos pacientes encontra-se com até 6 anos de evolução da doença.
- A contagem total de leucócitos no sangue periférico apresentou índices bem distintos quando comparados os pacientes antes e após o tratamento com *Glivec*.

- A contagem total de plaquetas no sangue periférico também apresentou índices com padrões diferentes nos pacientes pré e pós-tratamento.
- O presente estudo constatou a eficácia da medicação através de análises citogenéticas realizadas pós-tratamento. A partir de seis meses de uso, 90% dos pacientes responderam de alguma forma a esse tratamento. Resposta maior foi verificada em 63,4% desses pacientes.
- A realização da análise citogenética após 28 meses de tratamento demonstra que 62,5% dos pacientes mantiveram resposta citogenética maior.
- Apesar dos resultados positivos frente ao STI571, constatou-se uma evolução para resistência a essa medicação em alguns pacientes.

## ANEXO 1 - PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO

Centro Universitário de Brasília-UniCEUB  
Faculdade de Ciências da Saúde

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vinhaes de Lima  
Aluno: Priscilla Lamar Matos

### Anamnese

Reg. nº..... Data e hora da coleta: ...../...../..... às ..... : .....

Nome:..... Data de nascimento: ...../...../.....

Idade:.....anos Telefones para contato:.....

Profissão:..... Grupo Sanguíneo: [ ] A [ ] B [ ] AB [ ] O Rh: .....

Diagnóstico (FAB + I FT): .....

Início da doença há: ..... Quimioterapia: [ ] não [ ] sim: [ ] recaída [ ] 2<sup>a</sup> neoplasia

HMA:.....

Adenomegalias: [ ] Cervical [ ] Mediastinal [ ] Abdominal/inguinal [ ] Esplenomegalia  
[ ] Anemia [ ] Leucopenia [ ] Trombocitopenia

Medicações dos últimos 7 dias:

.....  
.....

Exames Recentes:

Hemograma Completo (...../...../.....)

Hb	Ht	Plaq	Leuc	Baso	Eq	Mielo	Meta	Bast	Seg	Linf	Mono

Blastos: ..... Outros: .....

Mielograma: (...../...../.....):

.....  
.....

Citogenética: (...../...../.....):

.....  
.....

Citogenética: (...../...../.....):

.....  
.....

Citogenética: (...../...../.....):

.....  
.....

## **ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Centro Universitário de Brasília - UniCEUB / Faculdade de Ciências da Saúde  
Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA DE PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC) EM USO DE *GLIVEC* (STI571,CGP57148B).

Responsáveis: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Vinhaes de Lima  
Priscilla Lamar Matos

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 196/96)**

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro ter ouvido e compreendido o presente termo de consentimento, que informa o seguinte:

Estou participando de minha livre e espontânea vontade, de uma pesquisa que visa verificar a presença do cromossomo filadélfia em cultura de células da medula óssea, através de análise citogenética.

1. A pesquisa será realizada a partir de amostra de aspirado medular, previamente colhido no HBDF pelo médico responsável pelo meu tratamento. A realização desta pesquisa não compromete o meu estado de saúde e não traz riscos em sua realização.
2. Tenho garantido antes e durante o curso da pesquisa, esclarecimentos sobre o procedimento e metodologia. O diagnóstico citogenético estará sempre disponível através do médico responsável pela coleta do material. Caso seja do meu interesse, posso solicitar acompanhamento psicológico por profissionais da Rede Pública Hospitalar.
3. Tenho assegurado o direito de abandonar a participação na pesquisa a qualquer momento, se assim desejar, bastando para isso comunicar a minha decisão ao líder do projeto.
4. Os procedimentos desse projeto de pesquisa asseguram o sigilo e a privacidade de seus participantes, através da preservação da identidade e de todos os dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Além disso, está garantido a não-utilização desses dados por qualquer outro projeto de pesquisa.
5. Os dados obtidos a partir desse projeto serão utilizados em publicação científica, mantendo o sigilo dos participantes.

6. Não há previsão de ressarcimento para os participantes desse projeto, pois a coleta do material e seus devidos esclarecimentos, serão realizados durante as consultas periódicas do meu tratamento.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2005.

---

Responsável

---

Pesquisador

---

Testemunha

Comitê de Bioética do UniCEUB – Centro Universitário de Brasília  
SEPN 707/907, Campus do UniCEUB, 70790-075, Brasília-DF  
Fone: (+61) 3340 1656  
[cb-uniceub@yahoogrupos.com.br](mailto:cb-uniceub@yahoogrupos.com.br)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILLET, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 92: 5258, 1995.

BAIKE, A.G.; COURT BROWN, W.M.; BUCKTON, K.E.; *et al.* A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukemia. **Nature**, 188: 1165, 1960.

BARTRAM, C.R.; DEKLEIN, A.; HAGAMEIJER, A.; *et al.* Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Filadélfia chromosome in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, 306: 277, 1983.

BARTRAM, C.R.; RAGHAVACHAR, A.; ANGER, B; *et al.* T lymphocytes lack rearrangement of the *bcr* gene in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. **Blood**, 69: 1682, 1985.

BARTRAM, C.R. Rearrangement of *bcr* and *c-abl* sequences in Ph-positive acute leukemias and Ph-negative CML – na update. **Hematol. Blood Transfus.**, 31: 160, 1987.

BEN-NERIAH, Y.; DALEY, G.Q.; MES-MASSON, A.-M.; *et al.* The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the *bcr/abl* hybrid gene. **Science**, 233: 212, 1985.

BOICE, J.D.Jr.; DAY, N.E.; ANDERSON, A.; *et al.* Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 74: 955, 1985.

BRADLEY, T.R.; METCALF, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, 44: 287, 1966.

BRANFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S.; GRIGG, A.; ARTHUR, C.; TAYLOR, K.; HERRMANN, R.; LYNCH, K.P.; HUGHES, T.P. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop Imatinib (STI571) resistance. **Blood**, 99(9): 3472, 2002.

BRASIL, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acessado em 20/04/2004.

BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; METT, H.; MEYER, T.; MULLER, M.; DRUKER, B.J.; LYDON, N.B. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. **Cancer Res.**, 56(1): 100, 1996.

CANELLOS, G.P. Chronic granulocytic leukemia. **Med. Clin. North Am.**, 60(5): 1001, 1976.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 1: 493, 2002a.

CAPDEVILLE, R.; SILBERMAN, S.; DIMITRIJEVIC, S. Imatinib: the first 3 years. **Eur. J. Cancer**, 38: 77, 2002b.

CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication n<sup>o</sup>. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mut. Res.**, 204: 379, 1988.

CASPERSSON, T.; GAHRTON, G. LINDSTEN, J.; ZECH, L. Identification of the Filadélfia chromosome as a number 22 by quinicine mustard fluorescence analysis. **Exp. Cell Res.**, 63: 238, 1970a.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C.; MODEST, E.J. Identification of human chromosome by DNA binding fluorescent agents. **Chromosoma**, 30: 215, 1970b.

CASTRO-MALASPINA, H.; SCHAISON, G.; BRIERE, J.; PASSE, S.; BRIERE, J.; PASQUIER, A.; TANZER, J.; JACQUILLAT, C.; BERNARD, J. Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia in children. Survival and prognostic factors. **Cancer**, 52(4): 721, 1983.

COHEN, M.H.; WILLIAMS, G.; JOHNSON, J.R.; DUAN, J.; GOBBURU, J.; RAHMAN, A.; BENSON, K.; LEIGHTON, J.; KIM, S.K.; WOOD, R.; ROTHMAN, M.; CHEN, G.; U, K.M.; STATEN, A.M.; PAZDUR, R. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. **Clin. Cancer Res.**, 8: 935, 2002.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B.J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, 105(7): 2640-53, 2005.

DEKLEIN, A.; VANKESSEL, A.G.; GROSVELD, G.; *et al.* A cellular oncogene is translocated to the Filadélfia chromosome in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, 300: 765, 1982.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, 66: 1192, 1981.

DOLL, R. Nature and nature: possibilities for cancer control. **Carcinogenesis**, 17: 177, 1996.

DOSEK, H.; ROSNER, F.; SAWITSKY, A. Acquires lipidoses: Gaucher-like cells and "Blue Cells" in chronic granulocytic leukemia. **Semin. Hematol.**, 9: 309, 1972.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl-positive cells. **Nat. Med.**, 2: 561, 1996.

DRUKER, B.J. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. **Eur. J. Cancer**, 38: 70, 2002.

DRUKER, B.J. Imatinib alone and in combination for chronic myeloid leukemia. **Semin. Hematol.**, 40: 50, 2003.

DUBÉ, I.; DIXON, J.; BECKETT, T.; *et al.* Location of breakpoints within the major breakpoint cluster region (*bcr*) in 33 patients with *bcr* rearrangement-positive chronic myeloid leukemia with complex or absent Filadélfia chromosomes. **Genes Chromosomes Cancer**, 1: 106, 1989.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.J.; O'BRIEN, S.M.; *et al.* Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. **Oncology**, 13: 169, 1999.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; *et al.* Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. **Ann. Intern. Med.**, 131: 207, 1999.

FRIEDRICH, M. J. Cientistas exploram a resistência da célula cancerosa. Conhecimentos recentes podem ajudar a desenvolver novos fármacos. **Jama**. V. 2 n° 5, 2004.

GAMBACORTI, P.C.; IE, C.P.; MOLOGNI, L.; *et al.* Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells Mol Dis.**, 23: 380, 1997.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.B.; GUNBY, E. H.; PIAZZA, R.; GALIETTA, A.; ROSTAGNO, R. & SCAPOZZA, L. Molecular mechanisms of resistance to Imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leucemias. **The Lancet Oncology**, v.4 (2), p. 75-85, 2003.

GAO, L.-M.; GOLDMAN, J. Long-range mapping of the normal *BCR* gene. **Leukemia**, 5: 555, 1991.

GREER, J.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B.; **Wintrobe's Clinical Hematology**. Filadélfia (USA): Lippicott Williams&Wilkins. 11<sup>a</sup> ed. Vol. 2, 2004.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia. **Curr. Opin. Hematol.**, 22: 380, 1997.

GORRE, M.E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N.; SAWYERS, C.L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, 293(5531): 876, 2001.

GUILHOT, F.; CHASTANG, C.; MICHALLET, M.; for the French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. Interferon alpha-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med.**, 337: 223, 1997.

GUMIREDDY, K.; BAKER, S.J.; COSENZA, S.C.; JOHN, P.; KANG, A.D.; ROBELL, K.A.; REDDY, M.V.; REDDY, E.P. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 102(6): 1992-7, 2005.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; and the German CML Study Group. Randomized comparison of interferon- $\alpha$  with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, 84: 4064, 1994.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BERGER, U. *et al.* Current trends in the management of chronic myelogenous leukemia. **Ann. Hematol.**, 79: 345, 2000.

HEISTERKAMP, N.; STEPHENSON, J.R.; GROFFEN, J.; *et al.* Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, 306: 239, 1983.

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

HERNANDEZ-BOLUDA, J.C.; CERVANTES, F. Imatinib mesylate (Gleevec, Glivec): a new therapy for chronic myeloid leukemia and other malignancies. **Drugs Today**, 38: 601, 2002.

ICHIMARU, M.; ICHIMARU, T.; BELSKY, J.L. Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950-1971. **J. Radiat. Res.**, 19: 262, 1978.

INBAL, A.; AKSTEIN, E.; BARAK, I.; MEYTES, D.; MANY, A. Cyclic leukocytosis and long survival in chronic myeloid leukemia. **Acta Haematol.**, 69(5): 353, 1978.

JONTE, F.; RAYÓN, C.; MEDINA, J.; GARCIA GALA, J.; GARCIA JALÓN, A.; FANJUL, E.; MORANTE, C.; FRESNO, M.; COMA, A.; ARRIBAS, M. Epidemiological data on chronic myeloid leukemia in Asturias, 1972-1986. **Sangre**, 38(1): 1-4, 1993.

KADAM, P.R.; NANJANGUD, G.J.; ADVANI, S.H.; NAIR, C.; BANAVALI, S.; GOPAL, R.; SAIKIA T. Chromosomal characteristics of chronic and blastic phase of chronic myeloid leukemia. A study of 100 patients in India. **Cancer Genet. Cytogenet.**, 51(2): 167-81, 1991.

KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.J.; O'BRIEN, S.M.; *et al.* Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, 12: 31, 1998.

KANTARJIAN, H.M.; *et al.* High rates of early major and complete cytogenetic responses with imatinib mesylate therapy given at 400mg or 800mg orally daily in patients newly diagnosed Philadelphia-positive chromosome chronic myeloid leukemia in chronic phase [abstract 1043]. **Proceedings of the 38th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology**, 2002.

KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.J.; O'BRIEN, S.M.; *et al.* Imatinib Mesylate improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic

myelogenous leukemia in the chronic phase. **American Cancer Society** ., 12: 98, 2003.

KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.; WUNDERLE, L. Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL. **The New England Journal of Medicine**., v. 354:2542-2551, 2006.

KEARNEY, L.; ORCHARD, K.H.; HIBBIN, J.A.; GOLDMAN, J.M. T-cell cytogenetics in chronic granulocytic leukaemia. **Lancet**, 1: 858, 1981.

KENNEDY, B.J. The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. **Semin. Oncol.**, 19 (suppl. 9): 21, 1992.

KNUDSON, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, 68: 820, 1971.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res.**, 45: 1437, 1985.

KONOPKA, J.B.; WITTE, O.N. Activation of the *abl* oncogene in murine and human leukemias. **Biochem. Biophys. Acta**, 823: 1, 1985.

KURZROCK, R.; BLICK, M.B.; TALPAZ, M.; *et al.* Rearrangement in the breakpoint cluster region and the clinical course in Filadélfia-negative chronic myelogenous leukemia. **Ann. Intern. Med.**, 105: 673, 1986.

LE COUTRE, P.; TASSI, E.; VARELLA-GARCIA, M.; BARNI, R.; MOLOGNI, L.; CABRITA, G.; MARCHESI, E.; SUPINO, R.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. **Blood**, 95(5): 1758, 2000.

LEVITZKI, A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, 38: 11, 2002.

LORENZE, T. **Manual de hematologia – Propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, 2 ed., 1999.

LLOYD, F.; GILMAN, E.A.; LAW, G.R.; CARTWRIGHT, R.A. Leukaemia incidence near coastal features. **J. Public. Health Med.**, 24(4): 255-60, 2002.

MARU, Y.; WITTE, O.N. The *BCR* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. **Cell**, 67: 459, 1991.

MASON, Jr J.E.; DeVITA, V.T.; CANELLOS, G.P. Thrombocytosis in Chronic Granulocytic Leukemia: Incidence and Clinical Significance. **Blood**, 44(4): 483, 1974.

MENZIN, J.; LANG, K.; EARLE, C.C.; GLENDENNING, A. Treatment patterns, outcome and costs among elderly patients with chronic myeloid leukaemia: a population based analysis. **Drugs Aging**, 21(11): 737-46, 2004.

MITELMAN, F. **ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. S. Karger Publishers, Inc., Basel, 1995.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes culture from human peripheral blood. **Exp. Cell Res.**, 20: 613, 1960.

NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **J. Natl. Cancer Inst.**, 25: 85, 1960.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression. **Science**, 194: 23, 1976.

NOWELL, P.C. Mechanisms of tumor progression. **Cancer Res.**, 46: 2203, 1986.

OHNISHI, K.; OHNO, R.; TOMONAGA, M.; KAMADA, N.; ONOZAWA, K.; KURAMOTO, A.; DOHY, H.; MIZOGUCHI, H.; MIYAWAKI, S.; TSUBAKI, K. A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. **Blood**, 86(3): 906, 1995.

PASSWEG, J.R.; ROWLINGS, P.A.; HOROWITZ, M.M. Related donor bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, 12: 81, 1998.

PLUZNIK, D.H.; SACHS, L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. **J. Cell Comp. Physiol.**, 66: 319, 1965.

PRESTON, D.L.; KUSUMI, S.; TOMONAGA, M.; IZUMI, S.; RON, E.; KURAMOTO, A.; KAMADA, N.; DOHY, H.; MATSUO, T. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma. **Radiat. Res.**, 137(2 Suppl.): S68-97, 1994.

RADFORD, I.R. Imatinib. Novartis. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, 3: 492, 2002.

ROWE, J.M. Clinical and laboratory features of the myeloid and lymphocytic leukemias. **Am. J. Med. Technol.**, 49(2): 103, 1983.

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

SAGLIO, G.; MOROTTI, A.; MATTIOLI, G.; MESSA, E.; GIUGLIANO, E.; VOLPE, G.; REGE-CAMBRIN, G.; CILLONI, D. Rational approaches to the design of therapeutics targeting molecular markers: the case of chronic myelogenous leukemia. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1028: 423-31, 2004.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, 340: 1330, 1999.

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

SELVIN, S.; LEVIN, L.I.; MERRILL, D.W.; WINKELSTEIN, W. JR. Selectes epidemiologic observations of cell-specific leukemia mortality in the United States, 1969–1977. **Am. J. Epidemiology**, 117(2): 140, 1983

SHAH, N.P.; NICOLL, J.M.; NAGAR, B.; GORRE, M.E.; PAQUETTE, R.L.; KURIYAN, J.; SAWYERS, C.L. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor Imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell**, 2(2): 117, 2002.

STAM, K.; HEISTERKAMP, N.; GROSVELD, G.; *et al.* Evidence of a new chimeric *bcr/c-abl* mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Filadélfia chromosome. **N. Engl. J. Med.**, 313: 1429, 1985.

TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H.M.; MCCREDIE, K.B.; *et al.* Clinical investigations of human alpha interferon In chronic myelogenous leukemia. **Blood**, 69: 1280, 1987.

THOMAS, J.; WANG, L.; CLARK, R.E.; PIRMOHAMED, M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. **Blood**, 104(12): 3739-45, 2004.

UMEMURA, T.; HIRATA, J.; KANEKO, S.; NISHIMURA, J.; MOTOMURA, S.; KOZURU, M.; IBAYASHI, H. Periodical appearance of erythropoietin-independent erythropoiesis in chronic myelogenous leukemia with cyclic oscillation. **Acta Haematol.**, 76(4): 230, 1986.

VOGEL, F.; MOTULSKY A.G. **Genética Humana Problemas e abordagens**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 3 ed., 2000.

WIEDMANN, L.M.; KARHI, K.; CHAN, L.C. Similar molecular alterations occur in related leukemias with and without the Philadelphia chromosome. **Hematol. Blood Transfus.**, 31: 149, 1987.

WORWOOD, M.; WAGSTAFF, M. Molecular biology and leukaemia diagnosis. **Baillieres Clin. Haematol.**, 3(4): 949-76, 1990.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2001.