



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

PEDRO AURIO MAIA FILHO

**GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE**

FORTALEZA

2017

PEDRO AURIO MAIA FILHO

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: doenças onco-hematológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Co-orientadora: Profa. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M187g Maia Filho, Pedro Aurio.
GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE
CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE / Pedro Aurio Maia Filho. – 2017.
64 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Prof. Dr. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Genotoxicidade. 3. Ensaio cometa. 4. Testes para micronúcleos. I.
Título.

CDD 571.9

PEDRO AURIO MAIA FILHO

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM INIBIDORES DE TIROSINO-QUINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: doenças onco-hematológicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade Federal do Ceará (Unifor)

Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE)

À Deus,
pela sua compaixão, graça e bondade, que
estão sempre presentes, sustentando-me nos
momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Atingir objetivos de vida não é uma tarefa fácil. Hoje eu completo mais um ciclo de vida e dou mais um passo em busca do infinito. Mas nada disso seria possível sem a contribuição de pessoas muito importantes nesse caminho trilhado.

Começo agradecendo à Deus, que em sua infinita bondade, permitiu que eu pudesse vir a mundo e desfrutar de todos os belos momentos que tenho vivido. Não acho clichê agradeço ao Pai, pois tenho fé que ele sempre está do nosso lado nos momentos mais felizes e, principalmente, nos momentos mais triste.

Agradeço à minha família, meus tios, irmãos, primos, avós (*in memoriam*), em especial, aos meus pais, Pedro e Lourdes, que sempre acreditaram em mim e nunca hesitaram em me apoiar moralmente e financeiramente, mesmo quando não podiam. Vocês são meus alicerces, meus exemplos de vida... vocês são os motivos que me levam sempre querer ir mais longe. Podem ter certeza que recompensarei cada esforço, cada incentivo, cada “vai lá, você consegue!”. Se mil vidas eu tivesse, mil vidas eu lhes daria.

Agradeço aos amigos de infância, do colégio, alguns até hoje presentes em minha vida, por todo apoio e pelos votos de sucesso.

Agradeço aos amigos que conquistei durante a faculdade, eu costumo dizer que ganhei irmãos, Tarcisio Paulo, Kamilla Rocha, Carlos Eduardo, Gabrielle Alexandre, Rozana Vieira, Mariana Leite, Jessica Ferreira e Vanessa Lemos, vocês são o mais puro exemplo que somos todos filhos do mesmo pai. Meu eterno obrigado!

À minha orientadora, Professora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, por todo incentivo, são 5 anos de convivência, de amizade, de aprendizado, de crescimento pessoal e profissional. Obrigado por acreditar nos meus sonhos e vivê-los junto comigo.

Meus agradecimentos à minha co-orientadora, Professora Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes, pelo apoio técnico e financeiro, sobretudo, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, Tarcisio Paulo, Marília Laurentino, Luana Letícia, Marilena Facundo, Maritza Cavalcante, Talyta Ellen, Alano Pedrosa, Renata Eeleutério, Diego Lima, Janilly Florêncio, Monalisa Figueiredo, Ana Thawanny e Acy Teles, meus mais sinceros agradecimentos. Cada um de vocês me encorajam a ir em frente, a entender que nem sempre as coisas acontecem do jeito que queremos, mas que o mais importante é fazermos o nosso melhor. E nós fazemos o nosso melhor. Obrigado pela convivência diária e por todo apoio.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós Graduação em Patologia, representados pelo Professor Dr. Fernando Schemelzer e pela querida Valéria, sem o suporte de vocês, nada disso seria possível.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo financeiro através da bolsa.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários do HEMOCE, em especial aos da coleta, que sempre nos apoiam na luta diária para que possamos recrutar pacientes. Sintam-se abraçados por mim.

Agradeço aos colegas de mestrado, aos laboratórios vizinhos, aos funcionários do Departamentos de Farmácia, de Análises Clínicas e Toxicológicas e de Patologia e Medicina Legal, em algum momento, todos foram importantes na execução desse trabalho.

Obrigado ao Instituto Evandro Chagas e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) pelos conhecimentos que possibilitaram a execução das metodologias executadas no presente estudo.

E por fim, agradeço a todos que direta e indiretamente deixaram sua contribuição, serei eternamente grato a todos.

“Muitos defendem a ideia de que o sucesso é algo predestinado. Prefiro acreditar que nada acontece por acaso se não houver amor, dedicação e perseverança. Hoje, encerra-se mais uma etapa da minha vida e fica a certeza de um trabalho feito com o melhor que eu podia oferecer. Se foi o bastante, não sei, mas o legado deixado é majoritariamente positivo em se tratando de aprendizado.” (Pedro Aurio Maia Filho)

RESUMO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa das células-tronco hematopoéticas, caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), originado a partir de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, formando o gene *BCR-ABL*, que codifica uma oncoproteína BCR-ABL com atividade tirosino-quinase constitutiva. O curso clínico da LMC é frequentemente dividido em três fases: crônica, acelerada e blástica. O tratamento de escolha para a fase crônica é o inibidor de tirosino-quinase (ITK) de primeira geração, mesilato de imatinibe, e para os pacientes refratários, utiliza-se os ITK de segunda geração (dasatinibe ou nilotinibe). Estudos têm demonstrado que a leucemia residual pode persistir mesmo nos melhores respondedores aos ITK, uma vez que a terapia não é curativa. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade dos ITK em pacientes com LMC acompanhados no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Trata-se de um estudo transversal com 44 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC. Os pacientes foram estratificados em três grupos: ao diagnóstico (LMC D) (n=5), em uso de ITK de primeira geração (LMC G1) (n=31) e em uso de ITK de segunda geração (LMC G2) (n=8). O grupo controle (GC) foi composto por indivíduos aparentemente saudáveis. A genotoxicidade e mutagenicidade foram analisadas através do ensaio cometa e teste de micronúcleos. A análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism 6.0 utilizando-se os testes de Kruskal–Wallis ou ANOVA, Mann Whitney ou T-student, dependendo da normalidade dos dados e o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Pacientes com LMC apresentaram índice de dano (ID) no DNA estatisticamente mais elevado em comparação ao GC ($p < 0,0001$). Quando os pacientes foram estratificados, foi verificado um aumento progressivo do ID no DNA nos grupos: LMC D, LMC G1 e LMC G2, respectivamente, em relação ao GC ($p < 0,05$). Pacientes com LMC apresentaram índice de micronúcleos (IMN), índice de pontes nucleoplasmáticas (IPN) e índice de *buds* nucleares (IBN) estatisticamente mais elevados em comparação com o GC ($p < 0,05$). Ao se estratificar os pacientes com LMC, foi verificado que pacientes dos grupos LMC G1 e G2 apresentaram IMN e IPN estatisticamente mais elevados em comparação ao GC ($p < 0,001$). O IMN também foi elevado no grupo LMC G2 em relação aos pacientes do grupo LMC D ($p < 0,01$). O índice de *bud* nuclear (IBN) não apresentou diferença estatística nas análises realizadas após a estratificação dos grupos. Os ITK revolucionaram a terapia da LMC, melhorando a sobrevivência dos pacientes. No entanto esses resultados alertam para a relevância de estudos que avaliem os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos dessa terapia a longo prazo. Os mecanismos envolvidos devem ser elucidados com a finalidade de aprimorar o tratamento, bem como avaliar o impacto clínico que esse dano pode causar.

Palavras-chave: Leucemia mieloide crônica. Genotoxicidade. Ensaio cometa. Testes para micronúcleos.

ABSTRACT

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a myeloproliferative disease of hematopoietic stem cells, characterized by the presence of the Philadelphia (Ph) chromosome, originating from a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22, forming the gene *BCR-ABL*, which encodes a BCR-ABL oncoprotein with constitutive tyrosine kinase activity. The clinical course of CML is often divided into three phases: chronic, accelerated, and blast. The treatment of choice for the chronic phase is the first-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI), imatinib mesylate, and for refractory patients, second-generation TKIs (dasatinib or nilotinib) are used. Studies have shown that residual leukemia may persist even in the best responders to TKI, since therapy is not curative. In this context, the present study aimed to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of TKI in patients with CML followed at the hematology clinic of the Walter Cantídio University Hospital (HUWC). It is a cross-sectional study with 44 patients with clinical and molecular diagnosis of CML. Patients were stratified into three groups: diagnosis (CML D) (n = 5), use of first generation TKI (CML) (n = 31) and use of second generation TKI (CML) (n = 8). The control group (CG) consisted of apparently healthy individuals. Genotoxicity and mutagenicity were analyzed by the comet assay and micronucleus test. Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism 6.0 program using the Kruskal-Wallis or ANOVA, Mann Whitney or T-student tests, depending on the normality of the data and the level of significance was 5% ($p < 0.05$). Patients with CML had a statistically higher ADN damage index (DI) compared to CG ($p < 0.0001$). When the patients were stratified, a progressive increase of the DNA ID was verified in the groups: CML D, CML G1 and CML G2, respectively, relative to GC ($p < 0.05$). Patients with CML had a statistically higher micronucleus index (NMI), nucleoplasmic bridge index (NPI) and nuclear bud index (NBI) compared to the CG ($p < 0.05$). By stratifying patients with CML, it was found that patients in the G1 and G2 CML groups had statistically higher NMI and NPI compared to CG ($p < 0.001$). NMI was also elevated in the CML G2 group in relation to the patients in the CML D group ($p < 0.01$). The nuclear bud index (NBI) did not present statistical difference in the analyzes performed after the stratification of the groups. The TKI revolutionized CML therapy, improving patient survival. However, these results point to the relevance of studies that evaluate the possible genotoxic and mutagenic effects of this therapy in the long term. The mechanisms involved should be elucidated for the purpose of improving treatment as well as assessing the clinical impact this harm may cause.

Keywords: Chronic myeloid leukemia. Genotoxicity. Comet test. Tests for micronuclei.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O desenvolvimento da LMC	20
Figura 2 – Aparência microscópica do sangue, visto por J. H. Bennett, Edimburgo	22
Figura 3 – Prevalência estimada de portadores de LMC nos EUA por ano.....	23
Figura 4 – Eventos moleculares que levam a expressão fenotípica da LMC	27
Figura 5 – Desenvolvimento de terapias para a LMC.....	28
Figura 6 – Mecanismo de ação da proteína BCR-ABL e do mesilato de imatinibe na patogênese da LMC.....	30
Figura 7 – Estratégia terapêutica para tratamento de pacientes com LMC	32
Figura 8 – Ilustração dos possíveis danos genéticos em linfócitos expostos a um agente genotóxico/mutagênico pelo ensaio de MN	39
Figura 9 – Fluxograma do estudo	42
Figura 10 – Eletroforese sob condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um indivíduo do GC (Figura A) classificado como cometa classe 0 (sem dano) e um paciente do grupo LMC G2 com cometa classificados como 1, 2, 3 e 4 (dano máximo) (Figura B).....	48
Figura 11 – Células binucleadas encontradas nas culturas de linfócitos humanos de pacientes com LMC no TMN	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recomendações para o monitoramento citogenético e molecular	36
Tabela 2 – Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular.....	37
Tabela 3 – Comparação do ID no DNA entre os grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	47
Tabela 4 – Comparação de médias \pm desvio padrão do IMN, IPN e IBN entre os pacientes com LMC e GC.....	49
Tabela 5 – Comparação de médias \pm desvio padrão do IMN, IPN e IBN nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – ID no DNA de pacientes com LMC e GC	46
Gráfico 2 – ID no DNA nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	47
Gráfico 3 – IMN encontrados em cultura de linfócitos nos pacientes com LMC e GC....	48
Gráfico 4 – IPN encontrados em cultura de linfócitos nos pacientes com LMC e GC.....	48
Gráfico 5 – IBN encontrados em cultura de linfócitos nos pacientes com LMC e GC.....	48
Gráfico 6 – IMN encontrados em culturas de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	49
Gráfico 7 – IPN encontrados em culturas de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	49
Gráfico 8 – IMN encontrados em culturas de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ -BCR	Região micro do gene <i>BCR</i>
AC	Aberrações cromossômicas
ACC	Anormalidade cromossômica clonal
Alo-TCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas
AMBC	Análise de metáfases com bandeamento cromossômico
C2	Concentração plasmática após 2 horas
CPGM	Células progenitoras de granulócitos/macrófagos
CPL	Células progenitoras linfoides
COM	Células precursoras mieloides
CPME	Células progenitoras de megacariócitos e eritrócitos
CTHs	Células tronco hematopoiéticas
EUA	Estados Unidos da América
EUTOS	<i>European Treatment and Outcome Study</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
GC	Grupo controle
HU	Hidroxiuréia
IBN	Índice de <i>buds</i> nucleares
ID	Índice de dano
IFN- α	Interferon-alfa
IMN	Índice de micronúcleos
IPN	Índice de pontes nucleoplasmáticas
IRIS	Estudo Internacional Randomizado do Interferon e STI571
ITK	Trifosfato de adenosina
LB	Linfócitos B
LMC	Leucemia mieloide crônica
LMC D	Paciente com LMC ao diagnóstico
LMC G1	Paciente com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores de tirosinoquinase de primeira geração
LMC G2	Paciente com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores de tirosinoquinase de segunda geração

LMC-FB	Fase blástica da LMC
LMC-FC	Fase crônica da LMC
LT	Linfócitos T
<i>m-bcr</i>	Região menor do gene <i>BCR</i>
<i>M-bcr</i>	Região maior do gene <i>BCR</i>
MN	Micronúcleos
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
Ph	Filadélfia
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RHC	Remissão hematológica completa
SH1	<i>SRC – Kinase Homology</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMN	Teste de micronúcleos
TMO	Transplante de medula óssea
UGT1A1	Uridina difosfato glucoronosiltransferase 1A1
UGT1A1-BM	Baixa metabolização de uridina difosfato glucoronosiltransferase 1A1
UGT1A1-EM	Elevada metabolização de uridina difosfato glucoronosiltransferase 1A1

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
≥	Maior ou igual a
>	Maior que
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanograma
-	Negativo ou deleção
n°	Número
%	Porcentagem
+	Positivo
pH	Potencial hidrogeniônico
KDa	Kilodalton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Considerações gerais.....	19
1.2	Histórico da LMC.....	21
1.3	Epidemiologia da LMC.....	23
1.4	Curso clínico da LMC.....	24
1.5	Diagnóstico da LMC.....	25
1.6	Fisiopatologia da LMC	26
1.7	Tratamento da LMC,.....	27
1.8	ITK de primeira e segunda geração	30
<i>1.8.1</i>	<i>Mesilato de imatinibe.....</i>	<i>30</i>
<i>1.8.2</i>	<i>Nilotinibe.....</i>	<i>32</i>
<i>1.8.3</i>	<i>Dasatinibe.....</i>	<i>33</i>
<i>1.8.4</i>	<i>Efeitos adversos da terapia com ITK.....</i>	<i>34</i>
1.9	Monitoramento da LMC.....	35
1.10	Genética toxicológica e testes para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade.....	38
<i>1.10.1</i>	<i>Ensaio cometa.....</i>	<i>38</i>
<i>1.10.2</i>	<i>Teste de micronúcleos.....</i>	<i>39</i>
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3	MÉTODOS.....	42
3.1	Casuística.....	42
3.2	Local do estudo.....	42
3.3	Seleção da amostra.....	43
3.4	Coleta de amostras e dados.....	43
3.5	Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade.....	43
<i>3.5.1</i>	<i>Ensaio cometa.....</i>	<i>43</i>
<i>3.5.2</i>	<i>Teste de micronúcleos.....</i>	<i>44</i>
3.6	Aspectos éticos.....	45
3.7	Análise estatística.....	45

4	RESULTADOS.....	46
4.1	Efeito genotóxico da exposição <i>in vivo</i> dos ITK em linfócitos de pacientes com LMC e grupo controle utilizando o ensaio cometa.....	46
4.2	Efeito mutagênico da exposição <i>in vivo</i> dos ITK em linfócitos de pacientes com LMC e grupo controle utilizando o TMN.....	48
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES.....	56
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida e tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. A medula é o local de formação das células sanguíneas e ocupa a cavidade dos ossos. Nela são encontradas as células que dão origem aos glóbulos brancos, aos glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e às plaquetas (KAUSHAL *et al.*, 2001).

A leucemia mieloide crônica (LMC) origina-se a partir de um distúrbio clonal onde ocorre expansão maciça das células da linhagem mieloide. A doença progride através de fases distintas: crônica, acelerada e blástica, onde o clone leucêmico vai perdendo progressivamente a capacidade de diferenciação. A alteração genética característica da LMC é o cromossomo Filadélfia (Ph) que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, gerando uma oncoproteína BCR-ABL com atividade tirosina quinase ativada constitutivamente nas células dos pacientes com LMC (DRUKER *et al.*, 2001).

A referida translocação produz dois novos genes, o *ABL-BCR* no cromossomo 9q+ e *BCR-ABL* no cromossomo 22q-, sendo este último o cromossomo Ph (BARBOZA *et al.*, 2000). O ponto de quebra para o gene *ABL*, ocorre geralmente entre os éxons a1 e a2 e para o gene *BCR*, essa quebra pode ocorrer em três regiões, a região menor (*m-bcr*), a região maior (*M-bcr*) ou ainda na região micro (*μ-bcr*), no entanto, para os casos clássicos de LMC, essa quebra ocorre na região *M-bcr*, que engloba os éxons 12 a 16 (*b₁* a *b₅*) (MELO; DEININGER, 2004; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Os RNAm transcritos a partir do gene de fusão *BCR-ABL* geralmente contêm uma das duas junções, e13a2 (*b_{2a2}*) e e14a2 (*b_{3a2}*), e codificam a proteína p210^{BCR-ABL} (GOLDMAN; MELO, 2003).

A LMC é uma doença de curso trifásico, iniciada pela expressão do produto do gene de fusão *BCR-ABL*, em células tronco hematopoiéticas (CTHs). As CTHs podem diferenciar-se em células progenitoras mieloides (CPM), que então se diferenciam em células progenitoras de granulócitos/macrófagos (CPGM) e células progenitoras de megacariócitos e eritrócitos (CPME). As CTHs também podem se diferenciar em células progenitoras linfoides (CPLs), que são os progenitores de linfócitos tais como células T (LT) e células B (LB). O início da fase crônica da LMC (LMC-FC) caracteriza-se por uma enorme expansão de células da série granulocítica (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

basófilos, eosinófilos e o número de plaquetas. Essas informações identificam subgrupos de pacientes em fase crônica da LMC com diferentes níveis de resposta às diversas estratégias terapêuticas, e podem ser de utilidade para a escolha da melhor opção de tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013; HASFORD *et al.*, 2011).

Até cerca de uma década atrás, a terapia medicamentosa para a LMC era limitada a agentes inespecíficos como busulfan, hidroxiuréia (HU) e interferon-alfa (IFN- α). O IFN- α levava à regressão da doença e sobrevivência melhorada, mas seu uso era dificultado pela sua baixa eficácia e uma série de reações adversas. O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (alo-TCTH) é o único tratamento curativo, mas possui riscos de morbi e mortalidade. Além disso, alo-SCT é uma opção apenas para os pacientes com bom estado físico e clínico e que tenha um doador de células-tronco apropriado. A terapêutica da LMC mudou drasticamente com o desenvolvimento dos ITK que potencialmente interferem com a interação entre a oncoproteína BCR-ABL e trifosfato de adenosina (ATP), bloqueando a proliferação celular do clone maligno. Esta abordagem alvo alterou a história natural da LMC, melhorando a sobrevida global em 10 anos de aproximadamente 20% para 80-90% (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

A etiologia da LMC é desconhecida. Estudos mostram que descendentes de indivíduos com LMC não têm uma incidência mais elevada da doença do que a população geral. Também não há correlação em gêmeos monozigóticos, sugerindo que LMC é uma doença adquirida (CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996).

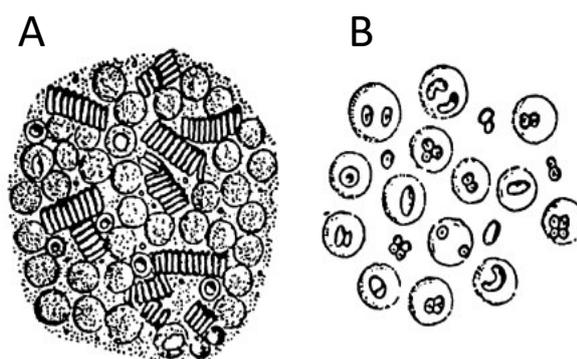
1.2 Histórico da LMC

A LMC foi inicialmente descrita no ano de 1845, em Edinburg, por John Hughes Bennett, que relatou um “Caso de hipertrofia do baço e do fígado em que a morte decorreu de supuração do sangue” no *Edinburgh Medical Journal* (BENNETT, 1845).

Bennett afirmou que a sua observação no sangue foi totalmente contrária a tudo que era até então conhecido de pus e inflamação. Ele concluiu que a alteração do sangue era independente da inflamação e que toda a massa de sangue tinha sido afetada. Ao exame microscópico, ele observou corpúsculos redondos de vários tamanhos e quando aplicou ácido acético nas células, o núcleo apareceu. Ele escreveu: “Este núcleo é geralmente composto por um grande grânulo e mais dois ou três grânulos menores”. Os desenhos dessas células foram publicados e foram as primeiras ilustrações das células do sangue de um paciente com leucemia (FIGURA 2). Os sintomas descritos na clínica e observado juntamente com o relatório extenso *post mortem* seria hoje diagnosticado como LMC (BENNETT, 1852).

O pesquisador Rudof Virchow publicou um caso semelhante em Berlim, onde relatou ter encontrado em todos os lugares dos vasos sanguíneos uma massa bem semelhante a pús e núcleos de células também relatadas em várias formas. Ele acrescentou que as proporções entre cor e corpúsculos sanguíneos incolores foram aproximadamente o inverso daqueles no sangue normal (VIRCHOW, 1845).

Figura 2 – Aparência microscópica do sangue, visto por J. H. Bennett, Edimburgo.



Nota: A: aparência de uma gota de sangue; B: imagem anterior após a adição de ácido acético. Fonte: BENNETT (1852).

Houve uma semelhança entre os achados de Virchow e de Bennett. Embora o relatório do último fosse mais detalhado, um ano depois, Virchow alterou a sua primeira descrição de sangue branco para explicar que as células incolores foram de tamanho variável e forma, como já tinha sido apontado por Bennett. Virchow, em 1847, relatou um caso semelhante e pela primeira vez usou o nome *leukhemia* (glóbulos brancos), que apesar de não ser um nome novo, pois já havia sido descrito por Lower (Lowthorp, 1749), foi a primeira vez que se utilizou esse termo para descrever esta nova doença observada (PILLER, 2001).

Esses, provavelmente representam os primeiros relatos da até então desconhecida patologia, que mais tarde seria chamada de LMC.

Em meados dos anos 60, um cromossomo com anormalidade foi associado com uma forma de leucemia humana, a LMC. Esta alteração, o cromossomo Ph, foi nomeado com o nome da cidade em que foi descoberto, e sua existência foi posteriormente confirmada por pesquisadores em vários países. Janet Rowley reconheceu que o Ph era o produto de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (NOWELL, 1962; ROWLEY, 1973).

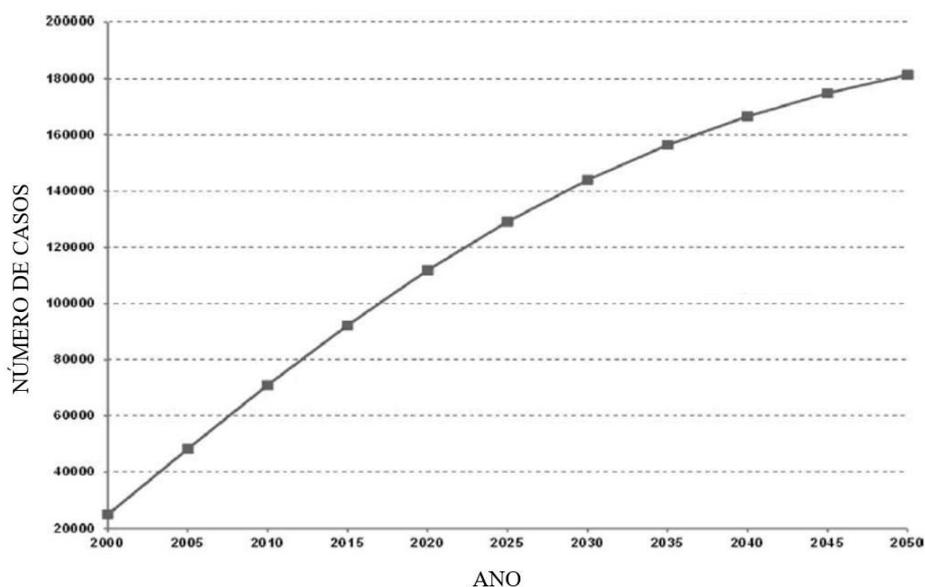
A partir de então, a LMC tornou-se o primeiro exemplo de neoplasia maligna humana a estar associada a uma anormalidade cromossômica específica. Na década de 1980, as partes envolvidas neste fenômeno foram identificadas como translocação entre *BCR* e *ABL*,

seguido pela descoberta de que a atividade não controlada da tirosino-quinase é essencial para a capacidade do gene *BCR-ABL* em transformar as células normais em leucêmicas (BARTRAM *et al.*, 1983; BEN-NERIAH *et al.*, 1986).

1.3 Epidemiologia da LMC

A LMC apresenta uma incidência de um a dois casos por 100.000 adultos e é responsável por cerca de 15% dos novos casos diagnosticados de leucemia em adultos. No ano de 2015, estima-se que cerca de 7.000 novos casos de LMC foram diagnosticados nos Estados Unidos da América (EUA) e cerca de 1.100 pacientes morreram de LMC. Desde 2000, ano de início da terapia com mesilato de imatinibe, a mortalidade anual na LMC diminuiu de 10-20% para 1-2% (Cancer Facts and Figures, 2015). Logo, a prevalência da LMC nos EUA, estimada em cerca de 25-30.000 em 2000, aumentou para cerca de 80-100.000 em 2015, e atingirá cerca de 150.000 casos em 2030 (FIGURA 3) (HUANG; CORTES; KANTARJIAN, 2012).

Figura 3 - Prevalência estimada de portadores de LMC nos EUA por ano.



Fonte: HUANG; CORTES; KANTARJIAN (2012).

Com o desenvolvimento dos ITK, o cenário terapêutico da LMC mudou drasticamente. Os ITK potencialmente comprometem a interação entre a oncoproteína BCR-ABL1 e adenosina trifosfato (ATP), bloqueando a proliferação celular do clone maligno. Esta terapia alvo alterou a história natural da LMC, melhorando a taxa de sobrevivência de 10 anos

de aproximadamente 20% para 80-90% (DEININGER *et al.*, 2009; DRUKER *et al.*, 2001).

A LMC surge predominantemente entre a quinta e sexta décadas de vida, sendo rara em crianças (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007; PERROTTI *et al.*, 2010). No Brasil e em alguns países emergentes, os levantamentos apontam para uma diminuição na idade de incidência da LMC (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008). Em nosso país, houve uma diminuição do número de pacientes com idade superior a 60 anos, provavelmente devido a pesquisas científicas que normalmente excluem a população idosa e por conta de métodos que permitem o diagnóstico de forma mais precoce. Casuísticas nacionais mostram uma mediana de idade cerca de dez anos menor que a encontrada na literatura internacional (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008). No estado do Ceará, estudos recentes têm reportado a mediana de idade variando de 41 a 44 anos (CID *et al.*, 2013; PETROLA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013).

Existe uma discreta predominância da doença em indivíduos do sexo masculino, sendo a proporção de 1,2 a 2,1 casos em homens para um caso em mulheres (A LEITNER; HOCHHAUS; C MULLER, 2011; SHARMA *et al.*, 2010).

1.4 Curso clínico da LMC

O curso clínico da LMC é frequentemente dividido em três fases. A fase crônica é caracterizada pelo aumento de precursores mielóides comprometidos, porém com capacidade funcional e de diferenciação razoavelmente normais. A fase acelerada é caracterizada por um decréscimo na diferenciação mieloide e linfóide, na ausência de tratamento adequado. A perda da diferenciação, invariavelmente, culmina na crise blástica, caracterizada por mau prognóstico e baixa resposta terapêutica (SHTEPER; BEN-YEHUDA, 2001).

Cerca de 50% dos pacientes com LMC diagnosticados nos Estados Unidos são assintomáticos. A doença é diagnosticada muitas vezes depois de uma rotina de exames de sangue ou testes físicos. A maioria (90-95%) dos pacientes encontra-se na fase crônica. Os sinais e sintomas comuns da fase crônica, quando presentes, são anemia, esplenomegalia, fadiga, perda de peso, mal-estar, saciedade fácil e dor. Manifestações raras incluem sangramento (associado com uma baixa contagem ou disfunção das plaquetas), trombose (associada à trombocitose ou leucocitose), gota (a partir de níveis elevados de ácido úrico), priapismo (geralmente com leucocitose acentuada ou trombocitose), hemorragias retinianas, ulceração no trato gastrointestinal superior e sangramentos (elevação dos níveis de histamina, devido à basofilia) (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

A esplenomegalia é o sinal físico mais consistente detectado em 40-50% dos casos.

A hepatomegalia é menos comum (menos de 10%). Linfadenopatia e a infiltração da pele ou outros tecidos são raras. A maioria dos pacientes evoluem para a fase blástica prévia à fase acelerada, mas 20% destes, evoluem sem sinais de fase acelerada. A fase acelerada pode ser silenciosa ou evidente, com o agravamento da anemia, esplenomegalia e infiltração de órgãos; a fase blástica apresenta-se como uma leucemia aguda (mielóide em 60%, linfóide em 30%, megacariocítica ou indiferenciado em 10%) com o agravamento dos sintomas constitucionais, sangramento, febre e infecções (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

1.5 Diagnóstico da LMC

O diagnóstico da LMC consiste em identificar, no cenário de uma leucocitose inexplicável persistente (ou ocasionalmente trombocitose), a presença de uma anormalidade cromossômica, o cromossomo Ph+, t (9; 22) (q34; q11), através de análise citogenética, ou anormalidades moleculares (*BCR-ABL*) relacionadas com o cromossomo Ph+, por meio de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e análise molecular (JABBOUR; CORTES; KANTARJIAN, 2008; KANTARJIAN *et al.*, 2008; SCHOCH *et al.*, 2002).

O FISH baseia-se na utilização de sondas específicas para o gene *BCR-ABL*. Uma comparação simultânea entre medula e amostras de sangue mostra elevada concordância entre os resultados. A análise por FISH pode ter uma gama de falsos positivos de 1-5% dependendo das sondas utilizadas (JABBOUR *et al.*, 2008; KANTARJIAN *et al.*, 2008; SCHOCH *et al.*, 2002).

A reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) amplifica a região em torno da junção *BCR* e *ABL*, sendo altamente sensível na detecção de doença residual mínima. Análise por PCR pode ser qualitativa, fornecendo informações sobre a presença do transcrito *BCR-ABL* para o diagnóstico de LMC, ou quantitativa (qPCR), avaliando a quantidade de transcritos, ideal para monitoramento de doença residual (JABBOUR *et al.*, 2008; KANTARJIAN *et al.*, 2008; SCHOCH *et al.*, 2002).

Estudos simultâneos de sangue periférico e medula através de qPCR mostram elevado nível de concordância. Resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer com PCR. Os primeiros estão normalmente relacionados com contaminação e os segundos com RNA de baixa qualidade ou falha da reação (JABBOUR *et al.*, 2008; KANTARJIAN *et al.*, 2008; SCHOCH *et al.*, 2002).

A punção da medula óssea é recomendada para todos os pacientes com suspeita de LMC, uma vez que irá confirmar o diagnóstico (por exemplo, por análise citogenética), e fornecer as informações importantes sobre o estadiamento em termos de blastos e percentual

de basófilos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

Deve-se realizar o diagnóstico diferencial da LMC de outras doenças mieloproliferativas ou síndromes mielodisplásicas. A LMC também deve ser diferenciada de reações leucemóides, que geralmente produzem contagem de glóbulos brancos inferior a $50.000/\text{mm}^3$, vacuolização granulocítica tóxica, corpúsculos de Dohle nos granulócitos, ausência de basofilia e níveis normais ou aumentados da enzima fosfatase alcalina leucocitária. A história clínica e física geralmente sugere a origem da reação leucemóide. Corticosteróides, em casos raros, podem causar extrema neutrofilia com desvio à esquerda, mas esta anormalidade é transitória e de curta duração (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

1.6 Fisiopatologia da LMC

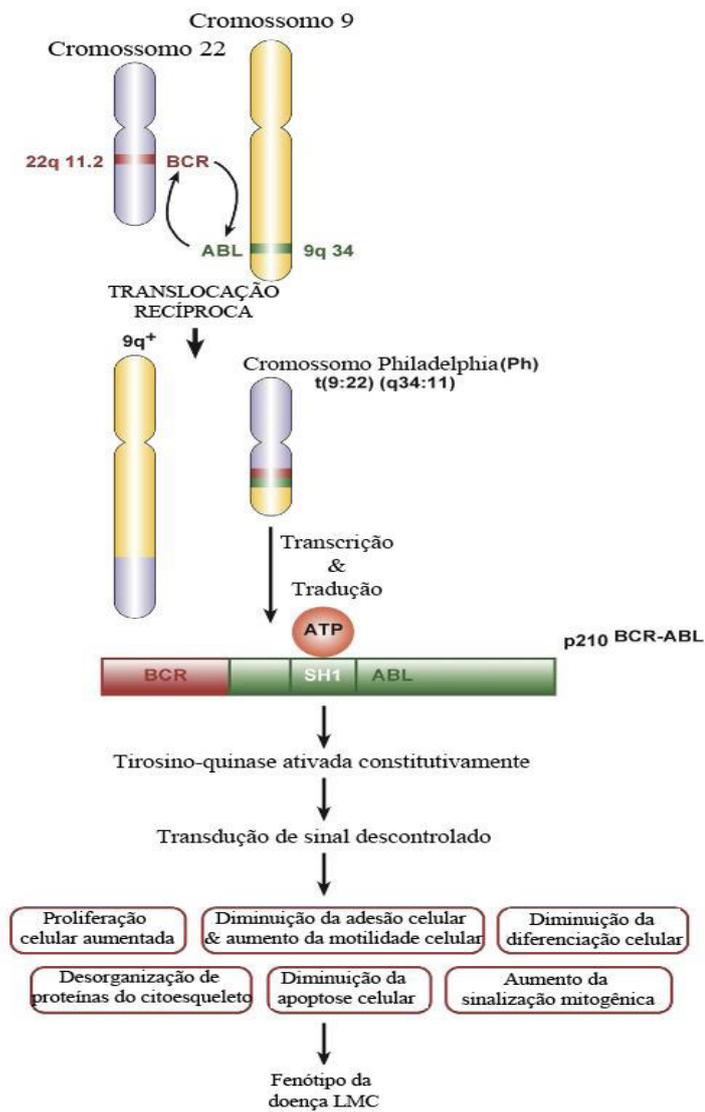
O *ABL* é um gene que é expresso na maioria dos tecidos. Nas células, a proteína *ABL* é distribuída tanto no núcleo quanto no citoplasma e é responsável pela transdução de sinais do fator de crescimento de superfície celular e receptores de adesão para regular a estrutura do citoesqueleto. *BCR* é também uma proteína de sinalização que contém vários domínios modulares. A fusão de sequências de *BCR* e *ABL* durante a translocação associada com a LMC aumenta a atividade tirosino-quinase do *ABL*. Dependendo dos pontos de interrupção na translocação e do *splicing* do mRNA, diferentes formas da proteína *BCR-ABL* com pesos moleculares diferentes podem ser geradas nos pacientes com LMC (p190 *BCR-ABL*, p210 *BCR-ABL* e p230 *BCR-ABL*) (REN, 2005). Estas variações são decorrentes do ponto de quebra do gene *BCR*, uma vez que o do *ABL* não varia. Em pacientes acometidos por LMC, a maior frequência é de p210 *BCR-ABL* (MELO *et al.*, 1996). O peso da proteína parece determinar o comportamento da doença, uma vez que a proteína de 190 kDa tem uma atividade de tirosino-quinase relativamente maior do que a proteína de 210 kDa (SAWYERS, 1999).

O gene *ABL* possui um domínio denominado SH1 (*SRC – Kinase Homology*), que codifica um não-receptor de tirosino-quinase. As proteínas denominadas quinase são enzimas que transferem grupos fosfato do ATP para substrato de proteínas, regendo assim os processos celulares como crescimento e diferenciação. Uma forte regulação da atividade tirosino-quinase é essencial, e se não for mantida, a desregulação da atividade quinase pode levar à transformação neoplásica e a malignidade (GOLDMAN; MELO, 2003).

A porção do proto-oncogene *ABL* responsável pelo controle e regulação do domínio SH1 é perdida durante a translocação recíproca, e a adição da sequência do gene *BCR* ativa constitutivamente a atividade da tirosino-quinase do domínio SH1. Sua atividade

altera as funções fisiológicas normais da proteína ABL, uma vez que ela interage com uma série de proteínas efetoras. Assim, o domínio SH1 do gene quimérico *BCR-ABL* é crucial para a transformação oncogênica característica da LMC (FIGURA 4) (DRUKER *et al.*, 2002; FRAZER; IRVINE; MCMULLIN, 2007).

Figura 4 – Eventos moleculares que levam a expressão fenotípica da LMC.



Fonte: FRAZER; IRVINE; MCMULLIN, 2007, **modificado**

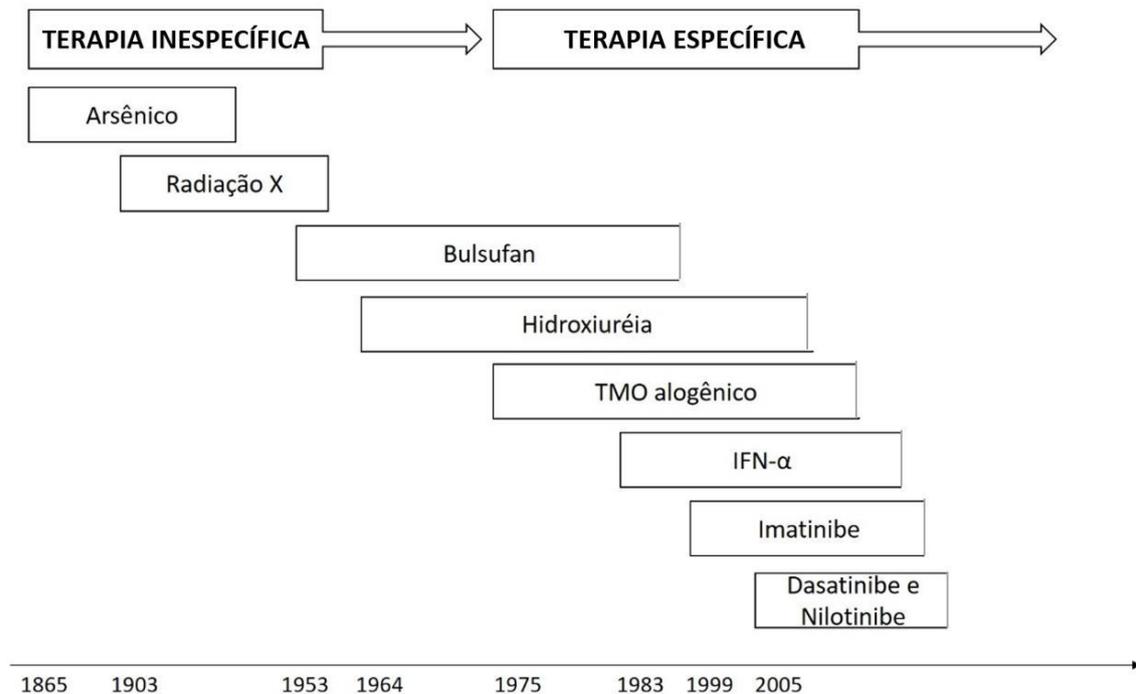
1.7 Tratamento da LMC

O desenvolvimento de terapias para a LMC ao longo do tempo está descrito na Figura 5 (HEHLMANN *et al.*, 2007).

Os primeiros tratamentos de pacientes com LMC foram realizados com arsênico, que não tem sua ação farmacológica conhecida, mas apresentava uma resposta hematológica

significativa. Apesar de ser tóxico, foi utilizado no tratamento da LMC até 1903 com a introdução da radioterapia e a partir daí em situações particulares, como em pacientes refratários à radioterapia ou com mielossupressão por esse tratamento (GEARY, 2000).

Figura 5 – Desenvolvimento de terapias para a LMC.



Fonte: HEHLMANN *et al.*, 2007, **modificado**

Em 1903, a radioterapia foi introduzida no tratamento da LMC, sua utilização diminuía o tamanho do baço e provocava uma queda acentuada na contagem de leucócitos. Os raios X impediam a replicação celular e levava às células à morte, o que explicava a diminuição no tamanho no baço. Essa resposta foi tão evidente, que foi a primeira vez que o conceito de remissão hematológica foi utilizado. Porém, esse efeito era transitório (GEARY, 2000).

O gás mostarda também foi utilizado no tratamento da LMC, no entanto, os seus efeitos tóxicos, particularmente no trato gastrointestinal, eram consideráveis, e a busca de um agente com ações mais específicas continuou. Surgiu então o bulsufan, um agente alquilante com uma ação mais ou menos seletiva sobre tecido hematopoiético e particularmente sobre a série granulocítica, embora também ensaios clínicos tenham mostrado que era profundamente tóxico para o epitélio germinal e, por vezes, os pulmões. Sua eficiência no controle das manifestações da LMC era maior do que a encontrada com a radioterapia e, apesar da grave mielossupressão ser um risco, seu uso parecia seguro. Foi utilizado como o pilar do

tratamento por cerca de 35 anos, quando se começou a utilizar agentes menos tóxicos, como a HU e o IFN- α (GEARY, 2000).

A HU é um agente quimioterápico com ação cito redutora que tem como alvo as células maduras da linhagem mieloide. Seu uso resulta em remissão hematológica completa (RHC) em 50% a 75% dos pacientes e melhora a qualidade de vida destes, porém não elimina o clone Ph⁺ (BOLIN *et al.*, 1982). A HU ainda pode ser utilizada atualmente por um curto período de tempo ou em pacientes no qual o ITK não é aconselhável (BACCARANI *et al.*, 2009).

Em 1980, o IFN- α foi introduzido no tratamento da LMC. A sua utilização era justificada pelo fato desse agente ser capaz de controlar os conhecidos estigmas clínicos da doença, bem como por induzir uma negatividade Ph, prolongando a vida dos pacientes na maioria dos casos, diferentemente da radioterapia e bulsufan (TALPAZ *et al.*, 1983). A indução da negatividade Ph parecia estar associada com uma baixa transformação blástica, logo, o IFN- α passou a ser utilizado pela maioria dos pacientes sem indicação para transplante de medula óssea (TMO) (GEARY, 2000) .

Até o início de 1970, a LMC era uma doença quase sempre fatal. A sobrevivência dos pacientes foi prolongada após o uso do bulsulfan, que acidentalmente produzia uma hipoplasia medular, com a extinção parcial do clone Ph (FINNEY *et al.*, 1972). A experiência com o uso do transplante de medula óssea (TMO) alogênico em leucemias agudas levou à adaptação desse procedimento para a realização do mesmo em pacientes com LMC. Desde então, o TMO alogênico tem sido usado no tratamento da LMC e é a única terapia curativa para a doença, porém apresenta um risco de mortalidade significativo. Alguns fatores, como: idade, estado da doença e o grau de histocompatibilidade entre doador e receptor foram identificados como influência significativa na sobrevivência a longo prazo dos pacientes (GOLDMAN; MELO, 2003; MELO; HUGHES; APPERLEY, 2003).

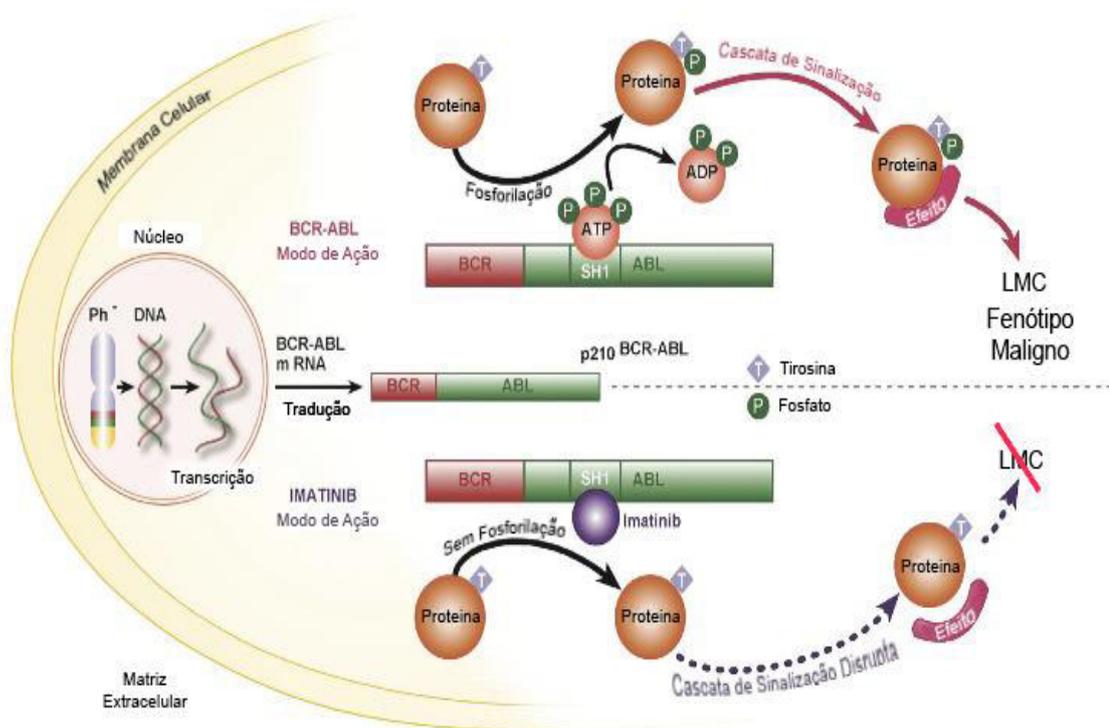
Atualmente, o tratamento de escolha para pacientes na fase crônica da doença é o ITK mesilato de imatinibe (primeira geração), e para os pacientes refratários utiliza-se o dasatinibe ou nilotinibe (segunda geração). Os ITK atuam sobre os mecanismos de regulação da proliferação celular, diminuindo a atividade mitogênica e induzindo direta ou indiretamente a morte da célula progenitora leucêmica por apoptose (MELO; BARNES, 2007).

1.8 ITK de primeira e segunda geração

1.8.1 Mesilato de imatinibe

O mesilato de imatinibe foi o primeiro ITK a receber aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de pacientes com LMC em fase crônica. A sua atuação dar-se por inibição competitiva no sítio de ligação do ATP na oncoproteína BCR-ABL (FIGURA 6), que inibe a fosforilação de proteínas envolvidas na transdução celular, além de bloquear o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (DRUKER; LYDON, 2000).

Figura 6 – Mecanismo de ação da proteína BCR-ABL e do mesilato de imatinibe na patogênese da LMC.



Fonte: FRAZER, 2007, **modificado**

Após administração oral, o imatinibe é rápido e completamente absorvido com uma biodisponibilidade de 98,3%, metabolizado no fígado e majoritariamente excretado nas fezes. Vários estudos relatam que pacientes com concentração plasmática de imatinibe menor que 1000 ng/mL têm uma taxa significativamente menor de alcançar uma remissão molecular maior (RMM). A taxa de RMM foi significativamente maior para pacientes com uma

concentração plasmática de imatinibe acima de 1000 ng/mL. Fatores como: a variabilidade da atividade de enzimas ou transportadores relacionados com a farmacocinética do imatinibe, idade, sexo, o tamanho corporal, o fígado, a função renal, interações medicamentosas e a adesão à terapêutica podem influenciar nas diferenças individuais na concentração plasmática deste medicamento (MIURA, 2015)

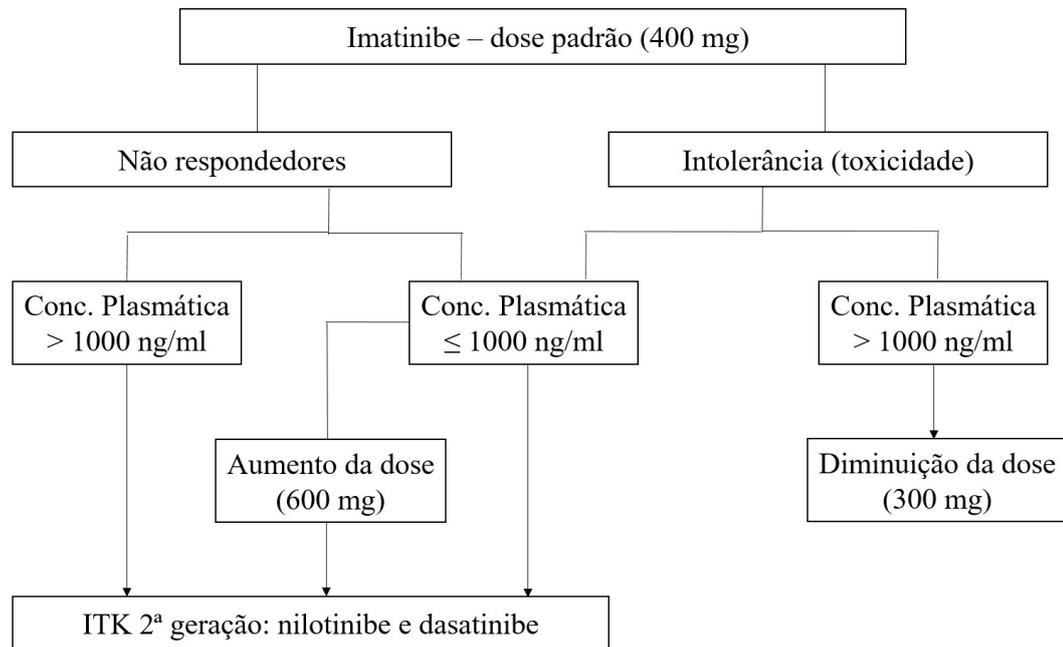
Geralmente, os eventos adversos com o uso do imatinibe são leves e raramente atingem graus 3 ou 4 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). A toxicidade hematológica (neutropenia, trombocitopenia e anemia) é o evento adverso mais frequente, presente em 16,7% dos pacientes, seguido por elevação nos níveis das enzimas hepáticas (5,3%) e edema periférico (4,5%). A hiperfosfatúria associada com baixas concentrações séricas de fosfato e alterações no metabolismo ósseo e mineral foram encontradas em 16 pacientes e atribuídas ao uso do imatinibe. Em 2006, um relato com dez pacientes com insuficiência cardíaca congestiva desenvolvida sem causa óbvia, foi, subsequentemente, associado com o uso deste medicamento. Informações sobre a possível teratogenicidade do imatinibe em seres humanos estão disponíveis, mas o próprio fabricante do medicamento recomenda o uso de método contraceptivo durante o tratamento (HEHLMANN *et al.*, 2007).

O Estudo Internacional Randomizado do Interferon e STI571 (IRIS) é considerado o primeiro ensaio clínico dos ITK (O'BRIEN *et al.*, 2003). Os 1106 pacientes com LMC em fase crônica foram distribuídos aleatoriamente para receber imatinibe (400 mg/dia) ou IFN- α associado com baixa dose de citarabina. Os resultados, após 19 meses de acompanhamento, foram significativamente melhores nos pacientes tratados com imatinibe do que naqueles tratados com IFN- α e citarabina, com remissão citogenética completa (RCC) (74% *versus* 9%) e sobrevida livre de progressão para as fases acelerada ou blástica em 12 meses (99% *versus* 93%). Além disso, o imatinibe apresentou uma resposta duradoura, a taxa de sobrevida livre de eventos e a taxa de sobrevida global relacionadas com mortes foram estimadas em 81% e 93%, respectivamente, em 8 anos de estudo (DEININGER *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados impressionantes do imatinibe, apenas 55% dos pacientes incluídos no estudo IRIS mantiveram-se em tratamento em 8 anos de seguimento. Surgiu-se então a necessidade de novas opções de tratamento para pacientes intolerantes ao imatinibe ou com falha terapêutica, motivo que levou o desenvolvimento dos ITK de segunda geração para pacientes em que não se é possível a continuação do tratamento com imatinibe (DEININGER *et al.*, 2009; MIURA, 2015)

A estratégia terapêutica para os pacientes com LMC a partir da terapia de primeira linha com imatinibe está descrito na Figura 7.

Figura 7 – Estratégia terapêutica para tratamento de pacientes com LMC.



Fonte: MIURA, 2015, **modificado**

1.8.2 Nilotinibe

O nilotinibe é um análogo estrutural do imatinibe com potência cerca de 25 vezes maior (SAGLIO *et al.*, 2010). É um derivado da aminopirimidina que inibe a atividade TK das formas mutadas e não mutadas do *BCR-ABL* mais potently e mais seletivamente do que imatinibe (BACCARANI *et al.*, 2009). Assim como o dasatinibe, o nilotinibe demonstrou capacidade de induzir resposta hematológica e citogenética em pacientes que falharam ao imatinibe. Um grande estudo randomizado internacional comparou o nilotinibe com o imatinibe (ENEST-nd). Nesse estudo, duas doses de nilotinibe (300 mg ou 400 mg duas vezes ao dia) foram comparadas ao imatinibe 400 mg uma vez por dia. A RMM foi estatisticamente mais elevada nas duas doses de nilotinibe quando comparada ao imatinibe (44% e 43% versus 22%). A RCC em 24 meses foi de 87% com nilotinibe 300 mg duas vezes por dia, 85% com nilotinibe 400 mg duas vezes por dia e 77% com imatinibe 400 mg por dia. A incidência de transcritos *BCR-ABL* em 72 meses (equivalente a uma redução de 4,5 log) foram de 56%, 55%, e 33%, respectivamente (SAGLIO *et al.*, 2010).

O nilotinibe é absorvido com uma biodisponibilidade de cerca de 30% e é metabolizado pelo CYP3A4. O nilotinibe é um inibidor competitivo do CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 e da uridina difosfato glucuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1), o que aumenta a concentração de substâncias que são metabolizadas por essas enzimas. A

bilirrubina é metabolizada pela UGT1A1, logo, o nilotinibe inibe o metabolismo dessa substância, aumentando assim, os seus níveis séricos (MIURA, 2015).

Entre os indivíduos, existem dois tipos de metabolizadores de acordo com o tipo de genótipo que vão determinar se a atividade da UGT1A1 na metabolização da bilirrubina será baixa (UGT1A1-BM) ou elevada (UGT1A1-EM). A concentração plasmática de 800 ng/mL é recomendada para monitoramento após a administração inicial de 600 mg/dia. Porém, em pacientes UGT1A1-BM, a incidência de hiperbilirrubinemia nessa concentração plasmática do fármaco é de aproximadamente 50%. Portanto, a administração contínua de 600 mg/dia de nilotinibe para esses pacientes deve ser evitada. Caso o nilotinibe seja a terapia de escolha para pacientes UGT1A1-BM, uma concentração de nilotinibe de 500 ng/mL (300-400 mg/dia de nilotinibe) é recomendada para equilibrar a eficácia e toxicidade. A baixa exposição ao imatinibe é considerada o principal fator para fracasso terapêutico (MIURA, 2015).

Embora a terapia com nilotinibe seja bem tolerada, houve um aumento do risco de eventos vasculares acumulados. A taxa de eventos cardiovasculares acumulados em 6 anos foi de 9,9%, 15,9% e 2,5%, entre os pacientes tratados com nilotinibe 300 mg duas vezes por dia, nilotinibe 400 mg duas vezes por dia e imatinibe 400 mg por dia, respectivamente. Outros efeitos secundários notáveis são dor de cabeça e erupções cutâneas (30%) de leve a moderada, aliviados por redução da dose, elevação da bilirrubina indireta (10%), aumento de açúcar no sangue (10-20%) e pancreatite rara (1-2%). (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; LARSON *et al.*, 2014)

1.8.3 Dasatinibe

O dasatinibe é um ITK de segunda geração cerca de 350 vezes mais potente que o imatinibe *in vitro*. Possui uma ação inibitória potente sobre a família de quinases SRC e ABL, incluindo a conformação ativa BCR-ABL (BACCARANI *et al.*, 2009; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

Um estudo randomizado de fase III denominado DASISION comparou o uso do imatinibe (400 mg/dia) com o dasatinibe (100 mg/dia) em 519 pacientes com LMC recém diagnosticados. Pacientes tratados com dasatinibe alcançaram uma melhor resposta citogenética, molecular e sobrevida livre de progressão do que àqueles tratados com imatinibe. Porém, foi evidenciada uma maior toxicidade com o uso do dasatinibe, cerca de 58% dos pacientes apresentaram eventos adversos de graus 3 e 4 segundo a OMS, principalmente toxicidade hematológica, contra 35% dos pacientes em uso de imatinibe. Os derrames pleurais ocorreram mais frequentemente com o uso do dasatinibe (19% *versus* < 1%). Outros efeitos

secundários, como a mielossupressão (20%) e hipertensão pulmonar rara (1-2%) também foram encontradas com o uso deste medicamento (BACCARANI *et al.*, 2009; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

A meia-vida de eliminação do dasatinibe é de aproximadamente 3 a 6 horas. Wang e colaboradores (2013) relataram que a resposta citogenética e o derrame pleural foram associados significativamente com a média ponderada da concentração plasmática do dasatinibe, com a taxa de risco aumentada 1,22 vezes para cada 1,0 ng/mL. Yu e colaboradores (2014) relataram que a concentração do dasatinibe não deve ser superior a 2,5 ng/ml, devido ao risco acumulado aumentado de derrame pleural. A administração de dasatinibe 100 mg uma vez por dia foi a melhor dosagem para obter uma eficácia suficiente com efeitos adversos reduzidos. Assim, em contraste com o imatinibe e nilotinibe, o principal objetivo do monitoramento do dasatinibe é a prevenção de efeitos colaterais (FRAZER *et al.*, 2007; MIURA, 2015).

As frequências para desenvolvimento da mutação T315I do *BCR-ABL* em pacientes que receberam imatinibe, nolitinibe e dasatinibe foram, respectivamente, 1,5% em 48 meses, 3,3% em 48 meses e 7,1% em 36 meses. A mutação T315I foi mais frequente durante a terapia com dasatinibe. Um estudo com pacientes com leucemia linfóide aguda Ph+ em uso somente de dasatinibe demonstrou que a concentração plasmática após 2 horas (C2) foi significativamente menor nos pacientes com a respectiva mutação. Logo, recomenda-se que a C2 do dasatinibe seja superior a 50 ng/mL para evitar um risco de desenvolvimento de mutações pontuais do gene *BCR-ABL*. Essa concentração é suficiente para inibir a proliferação *in vitro* da maior parte das linhagens celulares que expressam mutações *BCR-ABL* resistentes ao imatinibe, com a exceção da T315I (SHAH *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2012).

1.8.4 Efeitos adversos da terapia com ITK

Os ITK têm padrões de efeitos colaterais diferentes que devem ser considerados na escolha dos fármacos. Os efeitos secundários podem ser divididos em três categorias (BACCARANI *et al.*, 2013).

A primeira inclui graus 3/4, que são efeitos colaterais que normalmente ocorrem durante a primeira fase do tratamento, são administráveis, mas requerem a interrupção do tratamento temporário e a redução da dose, e podem conduzir a interrupção do tratamento em cerca de 10% dos pacientes (BACCARANI *et al.*, 2013).

A segunda categoria inclui os graus 1/2, efeitos colaterais que começam cedo

durante o tratamento e podem persistir para sempre e tornarem-se crônicos. Eles também são gerenciáveis e toleráveis, em princípio, mas afetam negativamente a qualidade de vida, o que pode levar à falha da terapia. Muitos destes efeitos secundários são comuns a todos os ITK, com algumas diferenças de frequência e gravidade, de modo que vários pacientes podem beneficiar-se da alteração do ITK (BACCARANI *et al.*, 2013).

A terceira categoria inclui atraso, chamada complicações "fora do alvo", que podem afetar o sistema cardiovascular, o sistema respiratório, fígado, pâncreas, o sistema imune, o metabolismo do cálcio, da glicose e lipídico, além de relacionar-se com malignidades secundárias. Todos os ITK podem ser tóxicos para o coração e devem ser usados com grande precaução em doentes com insuficiência cardíaca. O nilotinibe particularmente parece estar associado com doença arterial, periférica e coronário. O dasatinibe tem sido associado particularmente com complicações pleurais e pulmonares. Estas complicações são uma potencial causa de morbimortalidade, sendo necessário monitoramento clínico contínuo de todos os pacientes (BACCARANI *et al.*, 2013).

1.9 Monitoramento da LMC

A terapia com ITK possibilitou aos pacientes com LMC um longo período de vida, logo, marcadores para monitoramento desses pacientes são super importantes para o sucesso dessa terapia. Os avanços na tecnologia possibilitaram a substituição do tradicional exame de medula óssea para a monitorização da doença, um exame invasivo que atualmente é utilizado no início do estudo, onde todos os pacientes devem ser submetidos a esse exame para o estabelecimento do diagnóstico, avaliar a percentagem de blastos e basófilos, e executar a análise citogenética para confirmar a presença do cromossomo Ph e para excluir a evolução clonal. A exceção é durante a mudança do ITK ou em situações incomuns, como na mielossupressão inesperada a fim de excluir a transformação, no desenvolvimento de síndrome mielodisplásica ou outras condições da medula (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

O monitoramento pode ser realizado utilizando qualquer teste citogenético ou molecular para determinar o nível de transcrição do BCR-ABL e para mutações no domínio quinase BCR-ABL, ou ambos, a depender da estrutura e condições de padronizações laboratoriais do local (TABELA 1). Além destes, o acompanhamento da resposta requer contagens sanguíneas e diferenciais. O hemograma é necessário com frequência durante os primeiros 3 meses até que uma RHC seja alcançada. As definições de resposta hematológica, citogenética e molecular estão descritas na Tabela 2 (BACCARANI *et al.*, 2009; BACCARANI *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Recomendações para o monitoramento citogenético e molecular.

Ao diagnóstico

A análise de metáfases com bandeamento cromossômico (AMBC) de células da medula; FISH em caso de negatividade Ph para identificar variantes, translocações; PCR qualitativo (identificação do tipo de transcrito).

Durante o tratamento

qPCR para a determinação dos níveis dos transcritos *BCR-ABL*, a ser realizada a cada 3 meses até que uma MMR ($BCR-ABL \leq 0,1\%$ seja alcançada, depois a cada 3 a 6 meses e/ou AMBC de células da medula (pelo menos 20 metáfases), a ser realizada aos 3, 6, e 12 meses, até uma RCC ser alcançada, então a cada 12 meses. Uma vez que a RCC é alcançada, o FISH em células do sangue pode ser feito. Se o monitoramento molecular adequado for assegurado, a citogenética pode ser poupada.

Falha, progressão

qPCR, análise mutacional e AMBC de células da medula; imunofenotipagem na fase blástica.

Alerta

Realização dos testes moleculares e citogenéticos com maior frequência; a AMBC de células da medula é recomendada em caso de mielodisplasia ou anormalidade cromossômica clonal (ACC) Ph- com envolvimento do cromossomo 7.

Fonte: BACCARANI *et al.*, 2013, **modificado**

A citogenética, realizada por AMBC de células de medula, é necessária aos 3, 6 e 12 meses, até a RCC ser alcançada. Em seguida, a cada 12 meses, se a monitorização molecular regular não puder ser assegurada e sempre em casos de mielodisplasia, resposta subótima ou fracasso. A AMBC pode ser substituída por FISH em células do sangue se RCC for alcançada (BACCARANI *et al.*, 2009; BACCARANI *et al.*, 2013).

A análise molecular por qPCR deve ser realizada em *pellet* de leucócitos em mais de 10 mL de sangue periférico para medir os níveis de transcritos *BCR-ABL* (%). A qPCR deverá ser realizada a cada 3 meses até que uma MMR seja obtida, em seguida, a cada 3 a 6 meses (BACCARANI *et al.*, 2013).

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

Resposta	Definição
Hematológica completa (RHC)	Leucócitos $< 10 \times 10^9 / L$;
	Basófilos $< 5 \%$;
	Ausência de mielócitos, promielíctos e mieloblastos;
	Contagem de plaquetas $< 450 \times 10^9 / L$; Baço não palpável.
Citogenética	
Completa (RCC)	Nenhuma metáfase Ph+;
Parcial (RCP)	1 a 35% de metáfases Ph+;
Menor (RCM)	36 a 65% de metáfases Ph+;
Mínima (RCM)	66 a 95% de metáfases Ph+;
Nenhuma	95% de metáfases Ph+.
Molecular	
Completa (RMC);	Transcritos do <i>BCR-ABL</i> indetectáveis por análise de qPCR em duas amostras de sangue periférico consecutivas de qualidade adequada;
Maior (RMM)	Proporção de <i>BCR-ABL</i> $\leq 0,1\%$ na escala internacional.

Fonte: BACCARANI *et al.*, 2009, **modificado**

Com base no grau de resposta hematológica, citogética e molecular e com base no tempo em que essas respostas são alcançadas, a resposta global aos ITK podem ser definidas como ótima, subótima (alerta) e falha.

Resposta ótima indica que não há nenhum indício de que uma mudança na terapia possa melhorar a sobrevida do paciente. Resposta subótima ou de alerta significa que o paciente ainda pode ter um benefício substancial a longo prazo de um tratamento específico continuado, mas as chances de um resultado ótimo são reduzidas, de modo que respondedores subótimos podem ser elegíveis para abordagens alternativas. Vale lembrar, a condição de resposta subótima é transitória por natureza. Falha significa que um resultado favorável é improvável e que o paciente deve receber um tratamento diferente sempre que disponível e aplicável (BACCARANI *et al.*, 2013).

1.10 Genética toxicológica e testes para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade

A genética toxicológica tem como finalidade o estudo e a identificação dos efeitos deletérios ao organismo, em especial ao DNA, causados por agentes físicos, químicos ou biológicos (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Os agentes genotóxicos causam alterações estruturais no DNA e alterações orgânicas ou a nível celular. Esse setor da genética ganhou grande importância devido a relação desses agentes com doenças congênitas, malformações, envelhecimento, câncer, entre outras (SILVA *et al.*, 2003)

A molécula de DNA é constantemente exposto a uma variedade de substâncias genotóxicas tanto por fontes endógenas, como subprodutos do metabolismo humano, quanto por fontes exógenas, como a radiação ultravioleta e os carcinógenos químicos (ERMOLAEVA; SCHUMACHER, 2014).

Os carcinógenos químicos podem interagir e causar alterações genéticas no DNA de células susceptíveis, o que pode causar um crescimento celular seletivo, consequente expansão clonal, tornando-as geneticamente instáveis e, por fim, o surgimento de células neoplásicas (LOEB; HARRIS, 2008).

Várias técnicas têm sido utilizadas para a detecção de danos ao DNA, como o ensaio cometa, teste de micronúcleos (TMN), detecção de mutações e de aberrações cromossômicas (AC) estruturais com a finalidade de identificar substâncias com atividade genotóxica (TICE *et al.*, 2000).

1.10.1 Ensaio cometa

É um método de análise de lesões no DNA utilizado para quantificar o dano e a genotoxicidade de substâncias químicas, como produtos farmacêuticos, agroquímicos e outros. O princípio baseia-se em células inclusas em gel de agarose sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda (SINGH *et al.*, 1988).

Nas últimas décadas, o ensaio cometa tornou-se um dos métodos padrões para avaliação de dano no DNA, sendo amplamente utilizado como teste de genotoxicidade na biomonitorização humana, epidemiologia molecular, ecogenotoxicidade, e de fundamental importância na pesquisa de danos e reparo do DNA. O ensaio é simples, sensível, versátil, rápido e econômico, sendo muito bem sucedido na demonstração do dano no DNA, o que justifica a sua utilização (COLLINS, 2004).

O ensaio cometa faz parte de uma bateria de testes usados para avaliar a segurança de novos fármacos ou outros produtos químicos, sendo ideal para investigações humanas porque não requer nenhuma pré-marcação com radioatividade ou outros procedimentos prejudiciais, podendo ser aplicado em células facilmente obtidas. Os glóbulos brancos são frequentemente utilizados por serem obtidos de forma relativamente não invasiva e não exigirem a desagregação do tecido (COLLINS, 2004).

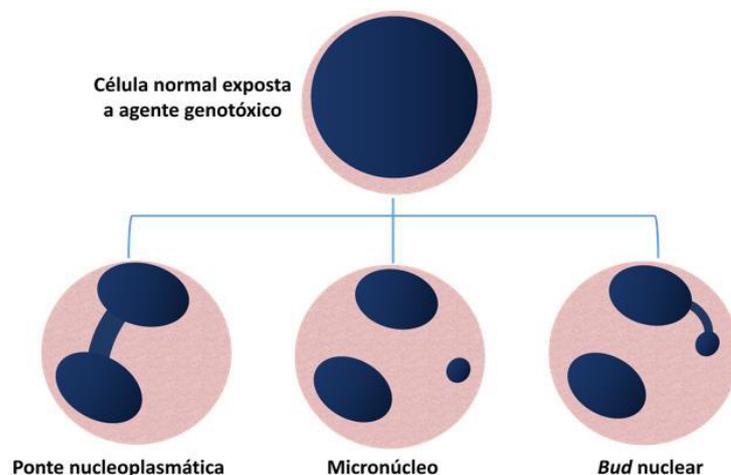
1.10.2 Teste de micronúcleos

O TMN é um método para a medição de lesões cromossômicas em linfócitos humanos estimulado por um agente mitogênico. A técnica pode ser realizada por método autorradiográfico ou por bloqueio da citocinese utilizando a substância citocalasina B. No método por bloqueio da citocinese, as células são facilmente reconhecidas pela sua binucleação, sem divisão citoplasmática (FENECH, MICHAEL; MORLEY, 1985).

Os micronúcleos (MN) são fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados nos núcleos das células em divisão. A contagem de MN em linfócitos estimulados por um agente mitogênico é um método simples e preciso para análise cariotípica e quantificação de lesões cromossômicas (FENECH, MICHAEL; MORLEY, 1985).

A Figura 8 ilustra os possíveis danos cromossômicos encontrados no ensaio de MN. Através dessa técnica, é possível avaliar a frequência de quebras cromossômicas (MN), rearranjos cromossômicos (pontes nucleoplasmáticas) e amplificação genética (*bud nuclear*) (FENECH, MICHAEL et al., 2003).

Figura 8 - Ilustração dos possíveis danos genéticos em linfócitos expostos a um agente genotóxico/mutagênico pelo ensaio de MN.



A formação dos MN está relacionada com danos genéticos ou quebras cromossômicas resultantes de várias condições, como a radiação, medicamentos, poluentes e outros. Nas malignidades, a presença de MN é sempre aumentada em relação à lesão benigna ou em relação às pessoas saudáveis (SAMANTA; DEY, 2012). A técnica para detecção de MN tem sido utilizada para estudos de agentes com potencial genotóxico, bem como para estudos da segurança no uso de fármacos (BRAMBILLA *et al.*, 2013).

Os ITK revolucionaram o tratamento da LMC, porém o seu uso precisa ser monitorado devido a ocorrência de eventos adversos. Relatos na literatura descrevem situações especiais que põem em questão a segurança do tratamento contínuo com esses medicamentos, como a ocorrência de alterações citogenéticas em subclones Ph- durante o uso do imatinibe. Tal hipótese colocaria em questão se o imatinibe exibe um potencial mutagênico semelhante aos quimioterápicos convencionais (VALENT, 2008).

Apesar do impacto gerado pelo tratamento com os ITK na LMC promovendo uma melhoria na sobrevida dos pacientes, as evidências apontam que a leucemia residual pode persistir mesmo nos melhores respondedores e que as terapias dirigidas à TK BCR-ABL não são curativas, uma vez que não conseguem erradicar as CTH, assim, esses pacientes são expostos a um longo período de terapia medicamentosa, sendo necessários estudos bem delineados para avaliar o potencial tóxico a nível de DNA com o uso crônico dos ITK na LMC. Nesse contexto, nos propomos a determinar a genotoxicidade e mutagenicidade dos ITK de primeira e segunda geração nos pacientes com LMC em tratamento com esses medicamentos. O estudo avalia a toxicidade através do índice de dano no DNA e possíveis alterações cromossômicas em pacientes com LMC em uso crônico de ITK.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com inibidores de tirosino-quinase.

2.2 Objetivos específicos

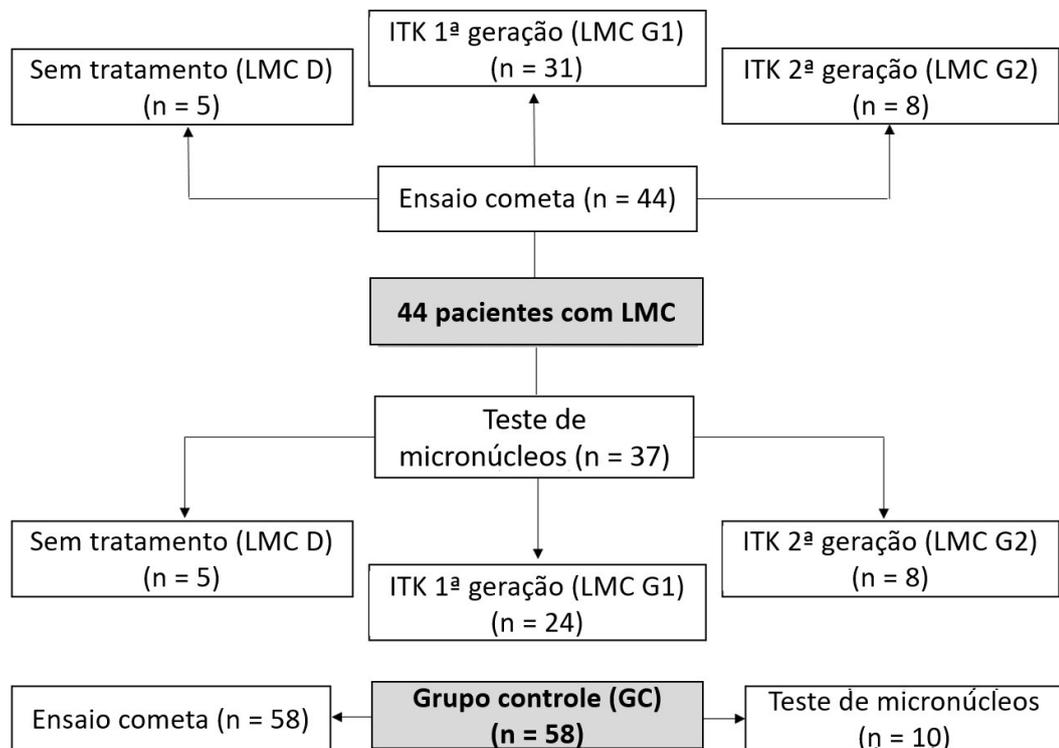
- Determinar o perfil demográfico (sexo e idade) dos pacientes com LMC;
- Avaliar o índice de dano no DNA nos pacientes com e sem uso de ITK e grupo controle;
- Avaliar a influência do tempo de tratamento com imatinibe sobre o ID no DNA dos pacientes com LMC;
- Avaliar as possíveis alterações cromossômicas nos pacientes com e sem uso de ITK e grupo controle.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo transversal com 44 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC, sendo 31 em uso de ITK de primeira geração (LMC G1), 8 em uso dos inibidores de segunda geração (LMC G2) e 5 ao diagnóstico (LMC D). Os pacientes são provenientes do ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC). O grupo controle (GC) de indivíduos saudáveis foi composto por 58 doadores de sangue. Todos os participantes da pesquisa relataram não serem fumantes e alcoólatras. O fluxograma do estudo está descrito na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma do estudo.



3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no HEMOCE, onde foram realizadas as coletas sanguíneas de rotina, e no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados todos os testes.

3.3 Seleção da amostra

Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos, de ambos os sexos, com LMC em fase crônica com e sem uso de inibidores de TK;

Critérios de Exclusão:

- Pacientes que foram submetidos a transfusão sanguínea nos últimos 6 meses;
- Pacientes que estavam em uso de algum imunossupressor;
- Pacientes com sorologia positiva para Hepatite, HIV e HTLV;
- Pacientes tabagistas, etilistas e gestantes;
- Pacientes com outras neoplasias ou doenças hematológicas.

Grupo controle:

- Indivíduos adultos, de ambos os sexos e doadores de sangue no HEMOCE.

3.4 Coleta de amostras e dados

Foram selecionados aleatoriamente os pacientes atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do HUWC no período de maio de 2016 a novembro de 2016, onde foi colhido sangue periférico em tubo (4 mL) contendo heparina como anticoagulante para avaliação do índice de lesão do DNA pela técnica do cometa e das possíveis alterações cromossômicas pelo teste do micronúcleo, ambas realizadas no dia da coleta. As informações sobre o uso dos ITK foram obtidas dos prontuários médicos.

3.5 Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade

3.5.1 Ensaio do cometa

O protocolo foi utilizado conforme relatado por Singh e colaboradores. (1988). A técnica foi realizada em conformidade com as orientações gerais para utilização in vivo do cometa (HARTMANN *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 1988; TICE *et al.*, 2000).

As amostras de sangue periférico foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão e distribuídas em lâminas de vidro revestidas com agarose de ponto de fusão normal. Após as amostras solidificadas, as lâminas foram embebidas por uma solução de lise refrigerada (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,2), sendo adicionados 1% de

Triton X-100 e 10% de DMSO, ficando de 1 a 2 dias sob refrigeração. As lâminas foram neutralizadas e em seguida expostas à solução alcalina por 20 minutos afim de permitir a quebra da fita de DNA e logo após foram transferidas para uma cuba de eletroforese em solução alcalina (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH> 13). A eletroforese foi realizada durante 20 minutos (25 V, 300 mA, 0,9 V/cm). Todas as etapas do ensaio, a partir do armazenamento do sangue até o final da eletroforese foram conduzidas sob luz fraca.

O material foi fixado de acordo com o protocolo de Nadin, Vargas-Roig e Ciocca (2001). Para a avaliação da lesão no DNA as lâminas foram coradas com brometo de etídio e analisadas 100 células em um microscópio de fluorescência. As células analisadas receberam notas de 0 (nenhuma migração, sem dano) a 4 (migração ou dano máximo) de acordo com a intensidade da cauda (tamanho e forma). A pontuação total (índice de dano ou ID) de 100 células varia de 0 (todas as células sem migração) a 400 (todas as células com migração máxima) (MALUF; ERDTMANN, 2000). O cálculo do ID está descrito a seguir:

$$\text{ID} = \text{n}^\circ \text{ células D0x0} + \text{n}^\circ \text{ células D1x1} + \text{n}^\circ \text{ células D2x2} + \text{n}^\circ \text{ células D3x3} + \text{n}^\circ \text{ células D4x4}$$

3.5.2 Teste de micronúcleos

Para o TMN foi utilizado a metodologia do bloqueio da citocinese celular utilizando citocalasina B em cultura de linfócitos a partir de sangue total, de acordo com o preconizado por Fenech (2000). Ao sangue periférico previamente colhido em heparina, de forma estéril, foi adicionado (aproximadamente 1mL) a dois frascos contendo 4mL de meio RPMI (pH 7,0), 1mL de soro fetal bovino e 100µL de fitohemaglutinina. Este material foi cultivado por 48 h horas em estufa a 37°C. Após esse prazo, foi adicionado 6 µL de citocalasina B/mL de cultura e conservado novamente em estufa por mais 24 horas. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de Carnoy, ácido acético e metanol na proporção de 3:1, por 4 vezes. Para a confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e deixado para secagem ao ar e, logo após, coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos.

Foram analisados mil linfócitos binucleados por microscopia óptica para avaliação da incidência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e amplificação gênica (*buds*) utilizando o sistema de escore desenvolvido pelo projeto HUMN (Human Micronucleus) (FENECH, MICHAEL *et al.*, 2003). Os resultados foram expressos em frequência ou índice de micronúcleos (IMN), índice de pontes nucleoplasmáticas (IPN) e índice de *buds* nucleares (IBN) (FENECH, MICHAEL, 2000).

3.6 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 1.533.784. Àqueles que concordarem em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism 6.0 utilizando-se os testes de Kruskal–Wallis ou Anova, Mann Whitney ou T-student, dependendo da normalidade dos dados. O teste de Kruskal–Wallis ou Anova foi utilizado para comparação entre três ou mais grupos e o teste de Mann Withney ou T-student foi utilizado para a comparação entre dois grupos. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

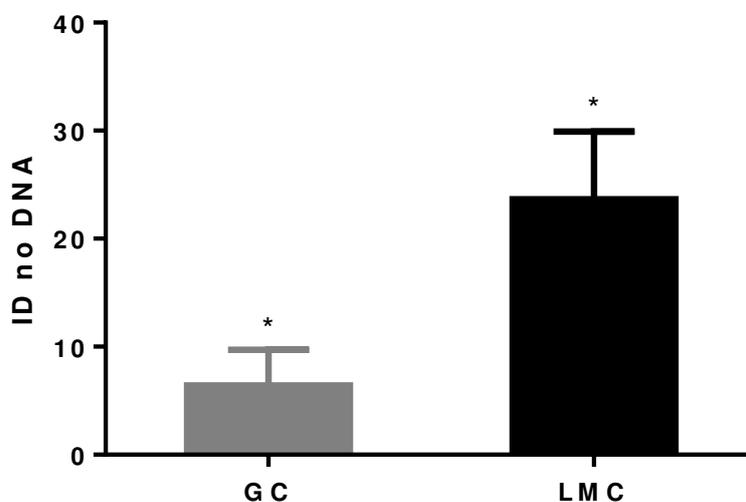
4 RESULTADOS

Dos 44 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC incluídos no estudo, 18 são do sexo feminino (41 %) e 26 do sexo masculino (59 %). A idade variou de 19 a 78 anos com média \pm desvio padrão ($47,20 \pm 2,192$). O grupo controle foi composto por 58 indivíduos aparentemente saudáveis, com 20-78 anos e média \pm desvio padrão $49,94 \pm 8,89$.

4.1 Efeito genotóxico da exposição *in vivo* dos ITK em linfócitos de pacientes com LMC e grupo controle utilizando o ensaio cometa

O ID no DNA de pacientes com LMC e GC está descrito no Gráfico 1. Pacientes com LMC apresentaram ID estatisticamente mais elevado em comparação ao GC ($p < 0,0001$), as médias \pm desvio padrão foram $23,63 \pm 0,9458$ ($n = 44$) e $6,428 \pm 0,4332$ ($n = 58$), respectivamente.

Gráfico 1 – ID no DNA de pacientes com LMC e GC (* $p < 0,0001$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão do ID no DNA de pacientes com LMC ($n=44$) e grupo controle (GC) ($n=58$). Valor de p obtido através do teste T. * $p < 0,0001$. Fonte: Do próprio autor.

Os pacientes com LMC foram estratificados em três grupos: LMC G1 ($n = 31$), LMC G2 ($n = 8$) e LMC D ($n = 5$), e comparados entre si e com o GC ($n = 58$). A comparação do ID no DNA entre todos os grupos está descrita na Tabela 3 e ilustrada no Gráfico 2.

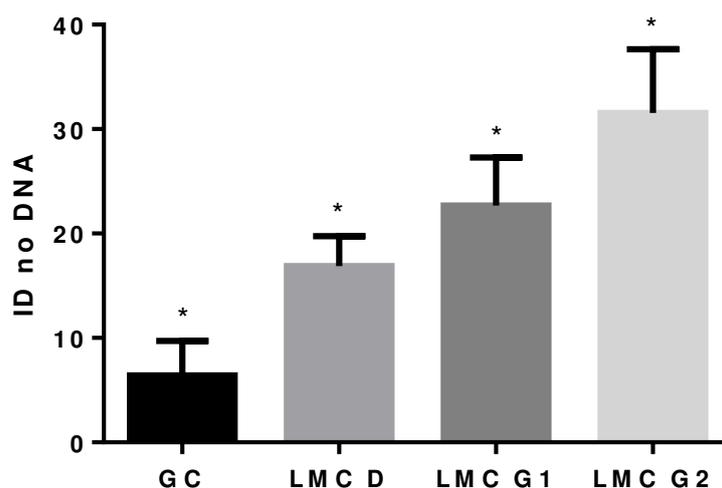
Tabela 3 – Comparação do ID no DNA entre os grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

Comparação entre os grupos	Média ± desvio padrão	Valor de <i>p</i>
GC versus LMC D	6,428 ± 0,4332 versus 16,90 ± 1,279	<i>p</i> < 0,0001
GC versus LMC G1	6,428 ± 0,4332 versus 22,67 ± 0,8303	<i>p</i> < 0,0001
GC versus LMC G2	6,428 ± 0,4332 versus 31,56 ± 2,156	<i>p</i> < 0,0001
LMC D versus LMC G1	16,90 ± 1,279 versus 22,67 ± 0,8303	<i>p</i> < 0,05
LMC D versus LMC G2	16,90 ± 1,279 versus 31,56 ± 2,156	<i>p</i> < 0,0001
LMC G1 versus LMC G2	22,67 ± 0,8303 versus 31,56 ± 2,156	<i>p</i> < 0,0001

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Valor de *p* obtido através do teste One-way ANOVA e pós teste de Tukey.

Foi verificado um aumento progressivo do ID no DNA nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2, respectivamente. Esse resultado foi estatisticamente significativo entre todos os grupos.

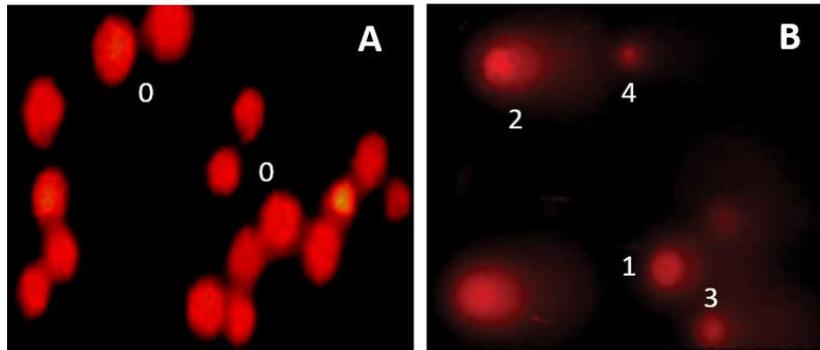
Gráfico 2 – ID no DNA nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 (**p* < 0,05).

Nota: Comparação de médias ± desvio padrão do ID no DNA de pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=5), tratados com ITK 1ª geração (LMC G1) (n=31), ITK 2ª geração (LMC G2) (n=8) e grupo controle (GC) (n=58). Valor de *p* obtido através do teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. **p*<0,05 na comparação entre todos os grupos. Fonte: Do próprio autor.

Foi realizada a análise da influência do tempo de tratamento com imatinibe sobre o ID no DNA. Os pacientes com LMC em uso de imatinibe 400 mg/dia (n = 31) foram divididos em dois grupos de acordo com a mediana do tempo de tratamento (27,03 meses). A duração do tratamento com imatinibe não exerceu influência sobre o ID no DNA (*p* = 0,9581). Pacientes com tempo de tratamento maiores e menores que 27,03 meses apresentaram os seguintes ID (médias ± desvio padrão) 22,60 ± 1,318 e 22,69 ± 1,047, respectivamente.

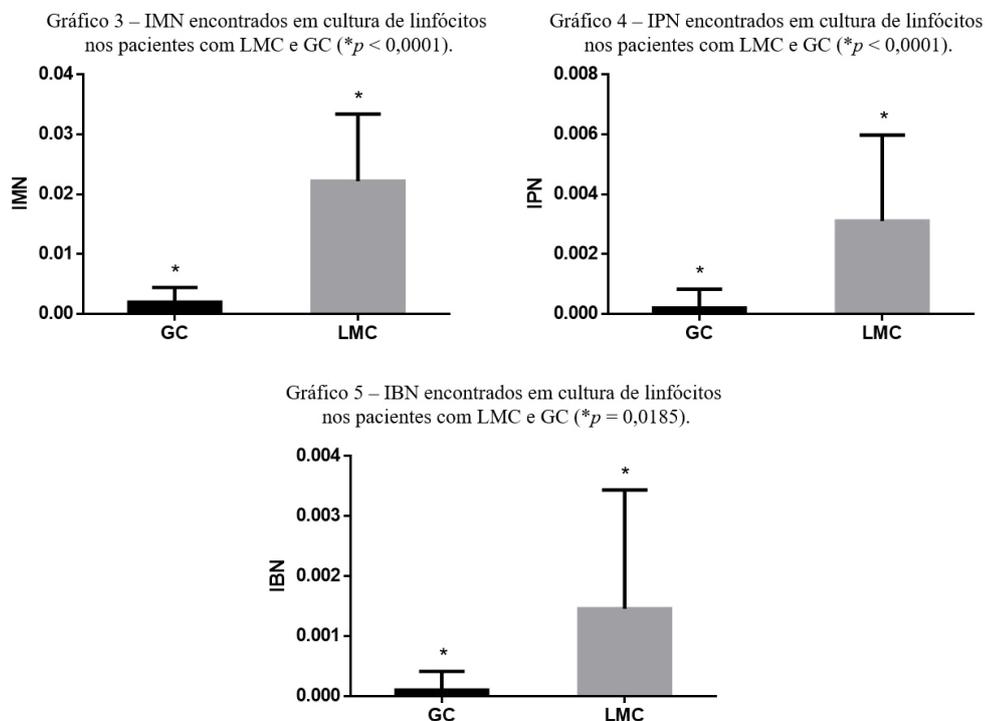
Os resultados do ensaio cometa (ID no DNA) em um paciente do grupo LMC G2 e GC estão ilustrados na Figura 10.

Figura 10 – Eletroforese sob condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um indivíduo do GC (FIGURA A) classificado como cometa classe 0 (sem dano) e um paciente do grupo LMC G2 com cometa classificados como 1, 2, 3 e 4 (dano máximo) (FIGURA B).



4.2 Efeito mutagênico da exposição *in vivo* dos ITK em linfócitos de pacientes com LMC e grupo controle utilizando o TMN

O IMN, IPN e IBN em pacientes com LMC (n=37) e GC (n=10) estão descritos nos Gráficos 3, 4 e 5, respectivamente.



Nota Gráfico 3: Comparação de médias \pm desvio padrão do índice de micronúcleos (IMN) nos pacientes com LMC (n=37) e grupo controle (GC) (n=10). Valor de p obtido através do teste T. * $p < 0,0001$. Nota Gráficos 4 e 5: Comparação de médias \pm desvio padrão dos índices de pontes nucleoplasmáticas (IPN) e de *buds* nucleares (IBN) nos pacientes com LMC (n=37) e grupo controle (GC) (n=10). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. Fonte: Do próprio autor.

Pacientes com LMC apresentaram IMN, IPN e IBN estatisticamente mais elevados em relação ao GC. As médias \pm desvio padrão estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação de médias \pm desvio padrão do IMN, IPN e IBN entre os pacientes com LMC e GC.

	LMC	GC	Valor de p
IMN	0,02222 \pm 0,01119	0,002000 \pm 0,002449	$p < 0,0001$
IPN	0,0020 \pm 0,001789	0,00020 \pm 0,0006325	$p < 0,0001$
IBN	0,001459 \pm 0,001980	0,0001 \pm 0,0003162	$p = 0,0185$

A razão IPN/IMN, que permite distinguir propriedades dos agentes genotóxicos, foi realizada em nosso estudo e encontramos o valor de 0,1.

Os pacientes com LMC foram estratificados em três grupos: LMC G1 (n = 24), LMC G2 (n = 8) e LMC D (n = 5), e comparados entre si e com o GC (n = 10). A comparação do IMN, IPN e IBN em todos os grupos está descrita na tabela 5 e ilustrada nos gráficos 6, 7 e 8.

Gráfico 6 – IMN encontrados em cultura de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC 2.

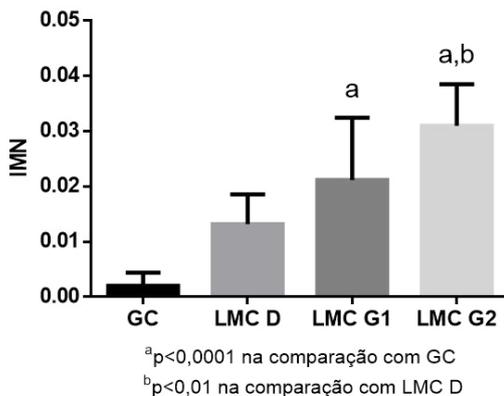


Gráfico 7 – IPN encontrados em cultura de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC 2.

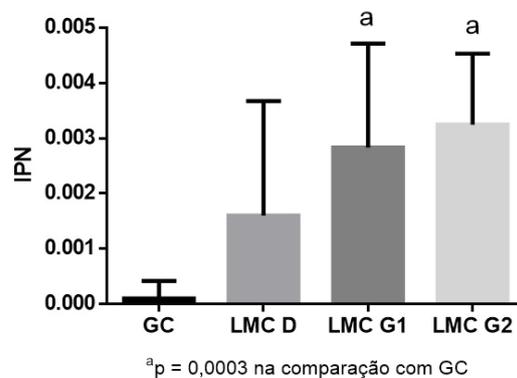
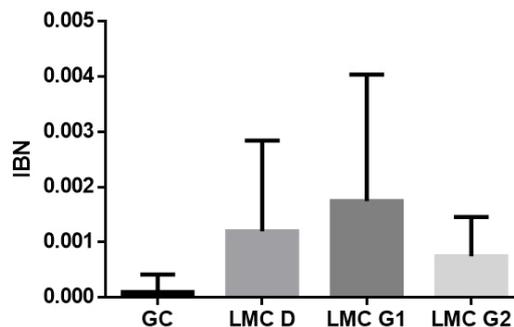


Gráfico 8 – IBN encontrados em cultura de linfócitos nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC 2.



Nota Gráficos 6, 7 e 8: Comparação de médias \pm desvio padrão dos índices de micronúcleos (IMN), de pontes nucleoplasmáticas (IPN) e buds nucleares (IBN) nos pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=5), tratados com ITK 1ª geração (LMC G1) (n=24), ITK 2ª geração (LMC G2) (n=8) e grupo controle (GC) (n=10). Valor de p obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. * $p < 0,05$. Fonte: Do próprio autor.

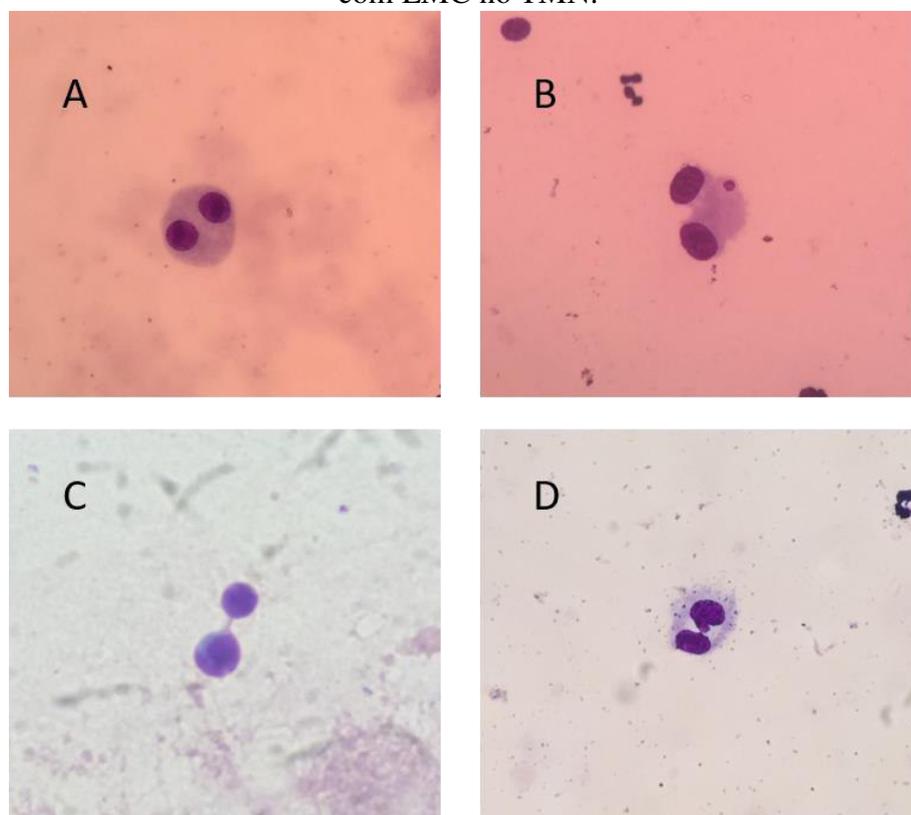
Pacientes dos grupos LMC G1 e G2 apresentaram IMN e IPN estatisticamente mais elevados em comparação com o GC. Pacientes em uso de ITK de 2ª geração apresentaram IMN mais elevados em relação aos pacientes ao diagnóstico, sem tratamento ($p < 0,01$). O IBN não apresentou diferença estatística na comparação entre os grupos.

Tabela 5 – Comparação de médias \pm desvio padrão do IMN, IPN e IBN nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

	GC	LMC D	LMC G1	LMC G2	Valor de p
IMN	0,0020 \pm 0,002449	0,0132 \pm 0,005404	0,02117 \pm 0,01131	0,0310 \pm 0,007521	$p < 0,05$ LMC G1 e G2 <i>versus</i> GC LMC G2 <i>versus</i> LMC D
IPN	0,0001 \pm 0,0003162	0,0016 \pm 0,002074	0,002833 \pm 0,001880	0,00325 \pm 0,001282	$p < 0,05$ LMC G1 e G2 <i>versus</i> GC
IBN	0,0001 \pm 0,0003162	0,0012 \pm 0,001643	0,00175 \pm 0,002289	0,00075 \pm 0,0007071	$p > 0,05$

As alterações cromossômicas (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e *buds* nucleares) encontradas no TMN estão ilustradas na figura 11.

Figura 11 – Células binucleadas encontradas nas culturas de linfócitos humanos de pacientes com LMC no TMN.



Nota: A: célula binucleada; B: célula binucleada com a presença de um micronúcleo; C: ponte internuclear; D: *bud* nuclear. Coloração: Giemsa 5%. Tamanho: aumento 400x. Fonte: Do próprio autor.

5 DISCUSSÃO

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa que manifesta-se predominantemente a partir da quinta década de vida, sendo um evento raro em crianças. Existe uma discreta predominância da doença em indivíduos do sexo masculino, sendo a proporção de 1,2–2,1 casos em homens para um caso em mulheres. Nossos achados corroboram com os dados da literatura (A LEITNER *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2010).

Os linfócitos são células amplamente utilizadas para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, pois essas células são de fácil obtenção, circulam por todo organismo e possuem uma longa vida útil, possivelmente acumulando danos genéticos à medida que passam através dos tecidos-alvos específicos (SUSPIRO; PRISTA, 2011).

Danos genéticos em linfócitos do sangue periférico cultivados *in vitro* foram observados nos testes de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, ensaio de micronúcleos e ensaio do cometa. Essas técnicas têm sido utilizadas há anos como biomarcadores de exposição genotóxica, em especial, para a detecção dos efeitos iniciais de agentes carcinogênicos (ALBERTINI *et al.*, 2000; NORPPA, 2004; SUSPIRO; PRISTA, 2011).

O ensaio cometa é um método rápido, simples visual e sensível para medição do dano ao DNA em células de mamíferos (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993). Este ensaio apresenta algumas vantagens em comparação a outros ensaios de genotoxicidade, como: a sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA; a necessidade de um pequeno número de células por amostra; flexibilidade; baixos custos; facilidade de aplicação e o período de tempo relativamente curto necessário para completar a análise. Durante os últimos anos, o ensaio cometa desenvolveu-se como uma ferramenta básica para uso nas áreas de pesquisa em humanos, biomonitoramento ambiental e nos processos de reparo do DNA (TICE *et al.*, 2000).

Na toxicologia genética, o ensaio cometa tem sido utilizado como parte de uma bateria de ensaios *in vitro/in vivo*. Em estudos *in vivo* é utilizado para distinguir agentes genotóxicos e não-genotóxicos. Como um teste de genotoxicidade, o ensaio cometa pode ser utilizados para identificar possíveis agentes mutagênicos e carcinogênicos (TICE *et al.*, 2000).

O TMN em linfócitos humanos é um método viável e preciso para avaliação de danos cromossômicos. A versatilidade e simplicidade desse ensaio, asseguram a sua aplicação bem sucedida na monitorização de populações expostas a agentes mutagênicos, bem como na identificação de indivíduos mutagênicos-sensíveis dentro de uma população (FENECH,

MICHAEL, 1993).

Estudos de danos no DNA a níveis cromossômicos são um ponto essencial na toxicologia genética, pois as alterações cromossômicas são um evento importante na carcinogênese. O TMN tem emergido como um dos principais métodos de escolha para avaliar os danos cromossômicos porque permite mensurar a perda e/ou quebra cromossômica. O método é aplicado a vários tipos de células para monitoramento populacional de dano genético e rastreio de produtos químicos com potencial genotóxico. Em sua forma básica atual, o TMN com bloqueio da citocinese pode fornecer, usando critérios morfológicos simples, medidas de genotoxicidade e mutagenicidade. (FENECH, MICHAEL, 2000).

No presente estudo foi evidenciado um aumento estatisticamente significativo do ID no DNA de pacientes com LMC em relação ao grupo controle. As causas do dano no DNA são multifatoriais e o dano oxidativo à essa molécula tem sido atribuído à terapia medicamentosa em outras doenças (GULEN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017).

Um estudo reportou que a instabilidade genômica resulta de alterações celulares em resposta ao dano no DNA e que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma das principais causas desse dano. Esse mesmo estudo relatou que células da LMC apresentam altos níveis de EROs e mecanismos de reparo do DNA ineficientes (BOLTON-GILLESPIE *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa com a mesma população de pacientes do presente trabalho, teve a finalidade de avaliar a associação do estresse oxidativo com o uso dos ITK de primeira e segunda geração, o mesmo demonstrou que os ITKs de 2ª geração apresentam um quadro de estresse oxidativo mais acentuado quando comparados aos ITK de 1ª geração (PETROLA *et al.*, 2012).

No presente estudo ao se estratificar os pacientes com LMC em três grupos: D, G1 e G2, e compará-los entre si e com o GC, evidenciamos um aumento progressivo do ID no DNA de pacientes com LMC D, G1 e G2, respectivamente, em relação ao GC. Resultado esse que corrobora com a hipótese de que os ITK de 2ª geração apresentam maior dano provavelmente pelo maior acúmulo de estresse oxidativo. Além disso, a LMC, por se tratar de uma doença que tem uma alteração genética determinada, apresenta, naturalmente, um quadro de instabilidade genômica (KANG *et al.*, 2016), que pode justificar um maior dano no DNA desses pacientes em relação aos indivíduos saudáveis e que pode ser potencializado pelo uso dos ITK, em especial os de 2ª geração.

O tempo de tratamento com imatinibe não exerceu influência sobre o ID no DNA dos pacientes com LMC, demonstrando que não existe um acúmulo de dano no DNA na

terapia crônica com esse medicamento. Provavelmente os mecanismos fisiológicos de reparo impedem a perpetuação desse dano.

Os resultados do nosso estudo demonstraram que pacientes com LMC apresentam IMN, IPN e IBN estatisticamente mais elevados em comparação com o GC. O IMN e IPN foram mais elevados nos pacientes com LMC em uso de ITK de primeira e segunda geração. Além disso, o IMN foi estatisticamente mais elevado nos pacientes em uso de ITK de segunda geração em relação aos pacientes ao diagnóstico (sem tratamento), sugerindo que estes medicamentos potencializam o dano cromossômico nas células dos pacientes com LMC. Quanto aos ITK de primeira geração, apesar de não apresentar diferença estatística na comparação com os pacientes ao diagnóstico, foi evidenciado um aumento do IMN, IPN e IBN nesse grupo em relação aos pacientes sem tratamento.

Um estudo recente *in vitro* evidenciou o aumento de alterações cromossômicas (micronúcleos, pontes nucleoplasmática e *buds* nucleares) em cultura de linfócitos humanos durante a terapia com imatinibe (NOVAK *et al.*, 2016). Esses resultados concordam com os nossos achados *in vivo*, uma vez que o imatinibe aumentou a frequência dessas alterações cromossômicas nos pacientes com LMC em relação ao grupo GC.

Micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e *buds* nucleares são parâmetros frequentemente observados nas neoplasias malignas e são indicativos de instabilidade cromossômica (CARUSO *et al.*, 2008). Dessa forma, a técnica de detecção de micronúcleos já tem sido aplicada para o estudo de diversos agentes genotóxicos, assim como para o estudo da segurança no uso de fármacos em diversos trabalhos (BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2010; BRAMBILLA *et al.*, 2012;2013). Essa instabilidade cromossômica pode culminar com alteração gênica, escape dos mecanismos de controle homeostático e potencialmente podem evoluir para uma mutação (FENECH, M *et al.*, 2011).

A formação de pontes nucleoplasmáticas ou pontes de anáfase é o evento inicial da instabilidade cromossômica nas células e podem levar ao ciclo ruptura-fusão-ponte. Quando essas pontes se quebram, em sua maioria de forma desigual, uma das células recebe cromossomos com genes adicionais. Os cromossomos quebrados perdem os telômeros de suas extremidades, logo, tendem a se fundirem após a síntese do DNA, perpetuando o ciclo ruptura-fusão-ponte e aumentando a amplificação dos genes que estão perto do ponto de fusão. Os genes amplificados são expulsos do cromossomo aberrante através de mecanismos de recombinação formando cromossomos instantâneos que podem ser replicados ou eliminados por brotação nuclear (*bud* nuclear), transformando-se em MN antes de serem excluídos da célula (FENECH, M *et al.*, 2011).

A razão entre IPN/IMN aumenta a versatilidade do teste de micronúcleos, pois permite distinguir agentes genotóxicos semelhantes pelas diferenças na relação IPN/IMN. A razão IPN/IMN pode indicar uma substância como aneugênica se essa relação for próxima de zero ou clastogênica se essa relação for elevada (THOMAS; UMEGAKI; FENECH, 2003). Em nosso estudo, essa relação foi 0,1, o que sugere que os ITK tenham propriedades aneugênicas, que são agentes que afetam a divisão celular ou o fuso mitótico, resultando em perda ou ganho total de cromossomos.

Os nossos achados demonstram que os ITK de primeira e segunda geração são potencialmente genotóxicos e podem causar alterações cromossômicas nas células dos pacientes com LMC, por isso, o uso desses medicamentos deve ser monitorado. Os ITK revolucionaram o tratamento da LMC com melhoria na sobrevida dos pacientes, porém relatos na literatura têm descrito a ocorrência de alterações citogenéticas em subclones Ph- durante o uso do imatinibe. Alguns desses pacientes apresentaram doença secundária evidente que se assemelharam à síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda, mesmo com a supressão do subclone Ph+ (LORIAUX; DEININGER, 2014; LIN *et al.*, 2006; JABBOUR *et al.*, 2007; NAVARRO *et al.*, 2007). Esses achados são apoiados por estudos moleculares e pelo fato de que anomalias do cariótipo são as mesmas que as detectadas nos subclones Ph+ (TERRE *et al.*, 2004; JABBOUR *et al.*, 2007; NAVARRO *et al.*, 2007). Até agora, não há provas para tal hipótese, embora um relato de caso tenha sugerido que mesmo as células-tronco normais transplantadas sofreram transformação e adquiram alterações citogenéticas durante o uso do imatinibe (VALENT, 2008).

A maioria dos agentes anticancerígenos têm propriedades comuns prejudiciais ao DNA e não apenas às células-alvo tumorais, mas também a células não tumorais. A genotoxicidade desses agentes tem sido demonstrada em modelos experimentais e em pacientes com câncer (BOOS; STOPPER, 2000). Sabemos que as lesões primárias detectadas pelo ensaio cometa e teste de micronúcleos podem ser corretamente reparadas e não resultar em alterações, no entanto, caso esse reparo não ocorra ou ocorra de forma ineficiente, essas lesões podem culminar em alterações que podem levar à progressão de doenças neoplásicas (SUSPIRO; PRISTA, 2011). Em nosso estudo foi possível demonstrar um aumento do dano no DNA e alterações cromossômicas nos pacientes com LMC em uso de ITK, logo esses parâmetros podem ser considerados como uma ferramenta de avaliação de exposição no monitoramento desses pacientes.

Os resultados demonstraram que os ITK causam danos ao material genético nos pacientes com LMC, portanto, apesar do benefício que esses medicamentos trouxeram com

melhoria da sobrevida dos pacientes, os ITK apresentam um potencial genotóxico e mutagênico, por isso seu uso deve ser monitorado, principalmente em pacientes em uso de ITK de segunda geração.

6 CONCLUSÕES

- Os pacientes apresentaram uma maior prevalência do sexo masculino e a média de idade foi 47,2 anos;
- Pacientes com LMC apresentaram ID no DNA mais elevados em relação ao GC. O ID no DNA foi mais elevado nos pacientes em uso de ITK de primeira e segunda geração;
- O tempo de tratamento com mesilato de imatinibe não exerceu influência sobre o ID no DNA dos pacientes com LMC;
- Pacientes com LMC apresentaram alterações cromossômicas (micronúcleos, pontes nucleoplasmática e *buds* nucleares) mais elevadas quando comparados com o GC;
- O IMN e IPN foram maiores nos pacientes com LMC em uso de ITK de primeira e segunda geração em relação ao GC;
- O IMN foi mais elevado nos pacientes em uso de ITK de segunda geração em relação aos pacientes ao diagnóstico (sem tratamento).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ITK revolucionaram a terapia da LMC, melhorando a sobrevida dos pacientes. No entanto esses resultados alertam para a relevância de estudos que avaliem os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos dessa terapia a longo prazo. Uma vez que são escassas na literatura informações sobre o potencial genotóxico dos ITK na terapia da LMC, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos com a finalidade de aprimorar o tratamento, bem como avaliar o impacto clínico que esse dano pode causar.

REFERÊNCIAS

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

A LEITNER, A.; HOCHHAUS, A.; C MULLER, M. Current treatment concepts of CML. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 31-43, 2011.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat Res Rev Mut Res**, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.

BACCARANI, M. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 35, p. 6041-6051, 2009.

BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872-884, 2013.

BARBOZA, L. P. et al. Análise dos transcritos da translocação t (9; 22) em Leucemia Mielóide Crônica. **Rev bras hematol hemoter**, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.

BARTRAM, C. et al. Translocation of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia. **Nature**, v. 306, p. 277, 1983.

BEN-NERIAH, Y. et al. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science**, v. 233, n. 4760, p. 212-214, 1986.

BENNETT, J. H. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver: In which Death Took Place from Suppuration of the Blood. **Stark and Comp.**, 1845.

_____. Leucocythemia, or White cell blood, in relation to the physiology and pathology of the lymphatic glandular system. **Sutherland&Knox**, 1852.

BOLIN, R. W. et al. Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 50, n. 9, p. 1683-1686, 1982.

BOLTON-GILLESPIE, E. et al. Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 4175-4183, 2013.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Chronic Myeloide Leukemia: natural history and classification. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, p. 3-7, 2008.

BOOS, G., STOPPER, H. Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. **Toxicol lett**, v. 116, n. 1, p. 7-16, 2000.

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; MARTELLI, A. Genotoxic and carcinogenic effects of gastrointestinal drugs. **Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 315-326, 2010.

BRAMBILLA, G. et al. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 387-413, 2012.

_____. Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. **Basic clin pharmacol toxicol**, v. 112, n. 5, p. 302-313, 2013.

CARUSO, R. A. et al. Abnormal nuclear structures (micronuclei, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds) in a pleomorphic giant cell carcinoma of the stomach. **Ultrastruct pathol**, v. 32, n. 1, p. 11-15, 2008.

CHEN, Pin-I. et al. Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. **JCI insight**, v. 2, n. 2, 2017.

CID, D. M. C. et al. Chronic myeloid leukemia: an overview of the determinants of effectiveness and therapeutic response in the first decade of treatment with imatinib mesylate in a Brazilian hospital. **Rev bras hematol hemoter**, v. 35, n. 6, p. 389-394, 2013.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **Am J Med**, v. 100, n. 5, p. 555-570, 1996.

DEININGER, M. et al. International Randomized Study of Interferon vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. **Blood**, v. 114, n. 22, p. 1126-1126, 2009.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **J Clin Invest**, v. 105, n. 1, p. 3-7, 2000.

DRUKER, B. J. et al. Chronic myelogenous leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2002, n. 1, p. 111-135, 2002.

DRUKER, B. J. et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl j Med**, v. 2001, n. 344, p. 1031-1037, 2001.

ERMOLAEVA, M. A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. **Trends Genet**, v. 30, n. 3, p. 95-102, 2014.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat Res Rev Mut Res**, v. 285, n. 1, p. 35-44, 1993.

_____. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res Rev Mut Res**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 534, n. 1, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and

nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res Environ Mutagen Rel Subj**, v. 147, n. 1-2, p. 29-36, 1985.

FINNEY, R. et al. Chronic granulocytic leukaemia with Ph1 negative cells in bone marrow and a ten year remission after busulphan hypoplasia. **Br J Haematol**, v. 23, n. 3, p. 283-288, 1972.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. **Ulster Med J**, v. 76, n. 1, p. 8, 2007.

GEARY, C. The story of chronic myeloid leukaemia. **Br J haematol**, v. 110, n. 1, p. 2-11, 2000.

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. **N Engl J Med**, v. 349, n. 15, p. 1451-1464, 2003.

GULEN, B. et al. Oxidative Status and DNA Damage Following Analgesic Treatment in Patients with Acute Pancreatitis. **Clin Lab**, v. 62, n. 7, p. 1339-1346, 2016.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HASFORD, J. et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 686-692, 2011.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 370, n. 9584, p. 342-350, 2007.

HUANG, X.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. **Cancer**, v. 118, n. 12, p. 3123-3127, 2012.

JABBOUR, E. et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome–negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2991-2995, 2007.

JABBOUR, E.; CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 112, n. 10, p. 2112-2118, 2008.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **Am J Hematol**, v. 91, n. 2, p. 252-265, 2016.

KANG, ZJ. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chin J cancer**, v. 35, n. 1, p. 48, 2016.

KANTARJIAN, H. et al. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia

in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1774-1780, 2008.

KAUSHAL, S. et al. A study of chromosomal morphology in leukemias. **J Anat Soc India**, v. 50, n. 2, p. 112-118, 2001.

LARSON, R. A. et al. ENESTnd 5-year (y) update: Long-term outcomes of patients (pts) with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with frontline nilotinib (NIL) versus imatinib (IM). **ASCO Annual Meeting Proceedings**, 2014. p.7073.

LIN, Y. et al. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis following imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: a report of nine cases and analysis of predictive factors. **Cancer genet and cytogenet**, v. 170, n. 1, p. 16-23, 2006.

LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer res**, v. 68, n. 17, p. 6863-6872, 2008.

LORIAUX, M.; DEININGER, M. Clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. **Leuk lymphoma**, v. 45, n. 11, p. 2197-2203, 2004.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 471, n. 1, p. 21-27, 2000.

MCKELVEY-MARTIN, V. et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen**, v. 288, n. 1, p. 47-63, 1993.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 441-453, 2007.

MELO, J. V.; DEININGER, M. W. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 18, n. 3, p. 545-568, 2004.

MELO, J. V. et al. Lack of correlation between ABL - BCR expression and response to interferon - α in chronic myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v. 92, n. 3, p. 684-686, 1996.

MELO, J. V.; HUGHES, T. P.; APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukemia. **ASH Education Program Book**, v. 2003, n. 1, p. 132-152, 2003.

MIURA, M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. **Biol Pharm Bull**, v. 38, n. 5, p. 645-654, 2015.

NAVARRO, JT. et al. Monosomy 7 with severe myelodysplasia developing during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: two cases with a different outcome. **Am J hematol**, v. 82, n. 9, p. 849-851, 2007.

NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. **Toxicol lett**, v. 149, n. 1, p. 309-334, 2004.

NOVAK, M. et al. Assessment of the genotoxicity of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in cultured fish and human cells. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, 2016.

NOWELL, C. The minute chromosome (Ph 1) in chronic granulocytic leukemia. **Ann Hematol**, v. 8, n. 2, p. 65-66, 1962.

O'BRIEN, S. G. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003.

PERROTTI, D. et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. **J clin invest**, v. 120, n. 7, p. 2254-2264, 2010.

PETROLA, M. J. et al. Serum concentrations of nitrite and malondialdehyde as markers of oxidative stress in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. **Rev bras hematol hemoter**, v. 34, n. 5, p. 352-355, 2012.

PILLER, G. J. Leukaemia—a brief historical review from ancient times to 1950. **Br J haematol**, v. 112, n. 2, p. 282-292, 2001.

REIS, S. R. C. D. et al. Adherence to treatment with imatinib in chronic myeloid leukemia: a study of the first decade of responses obtained at a Brazilian hospital. **Rev bras hematol hemoter**, v. 35, n. 3, p. 174-179, 2013.

REN, R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 172-183, 2005.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. 1973.

SAGLIO, G. et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 362, n. 24, p. 2251-2259, 2010.

SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagn cytopathol**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SCHOCH, C. et al. Comparison of chromosome banding analysis, interphase-and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. **Leukemia**, v. 16, n. 1, p. 53-59, 2002.

SHAH, N. P. et al. Transient potent BCR-ABL inhibition is sufficient to commit chronic myeloid leukemia cells irreversibly to apoptosis. **Cancer cell**, v. 14, n. 6, p. 485-493, 2008.

SHARMA, P. et al. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. **Ann hematol**, v. 89, n. 3, p. 241-247, 2010.

SHTEPER, P. J.; BEN-YEHUDA, D. Molecular evolution of chronic myeloid leukaemia. **Semin cancer biol**, 2001. Elsevier. p.313-322.

SILVA, J. D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. Genética toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**, p. 422, 2003.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp cell res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SUSPIRO, A.; PRISTA, J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. **Toxicol lett**, v. 207, n. 1, p. 42-52, 2011.

TAKAHASHI, N. et al. Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. **Blood**, v. 92, n. 12, p. 4758-4763, 1998.

TAKAHASHI, N. et al. Pharmacokinetics of dasatinib for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia with acquired T315I mutation. **J hematol oncol**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

TALPAZ, M. et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 62, n. 3, p. 689-692, 1983.

TERRE, C. *et al.* Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 8, p. 1340-1346, 2004.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-194, 2003.

TICE, R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ mol mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VALENT, P. Emerging stem cell concepts for imatinib - resistant chronic myeloid leukaemia: implications for the biology, management, and therapy of the disease. **Br J haematol**, v. 142, n. 3, p. 361-378, 2008.

VIRCHOW, R. **Weisses blut**. 1845.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. Tratado de Hematologia. **São Paulo: Editora Atheneu**, 2013.

APÊNDICE A



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) como participante de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todos os procedimentos dessa pesquisa sejam esclarecidos. O projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação da expressão do gene *BCR-ABL*, do perfil mutacional, da genotoxicidade e citotoxicidade em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com inibidores de tirosino-quinase”** tem como objetivo principal avaliar a expressão do gene *BCR-ABL*, o perfil mutacional, a genotoxicidade e citotoxicidade de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica em tratamento com inibidores da tirosina-quinase, em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza-Ceará. Os resultados encontrados na pesquisa poderão contribuir para um melhor acompanhamento clínico dos pacientes com LMC e uma melhoria na qualidade de vida dos mesmos.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (dois) tubos de sangue (4 mL). A coleta de sangue será realizada em uma veia do braço de sua preferência, no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas o desconforto da dor e a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. As amostras de sangue serão processadas em nosso laboratório, onde serão realizados as análises moleculares e os testes de toxicidade. O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa, como a coleta de informações sociodemográficas (sexo e idade), clínicas (sinais e sintomas) e laboratoriais (hematologia e bioquímica) dos prontuários médicos.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Pedro Aurio Maia Filho, Laboratório de Hematologia, endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da UFC/PROPESQ- Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx) 85 3366-8344 (Horário: 8:00 às 12:00 h de segunda à sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O abaixo assinado _____, ____ anos, RG _____, declara que é de

livre e espontânea vontade a participação na pesquisa.

Caso o Senhor (a) sinta-se suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor(a) concorda em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente/ representante legal

Assinatura da testemunha

Assinatura do responsável pelo estudo