



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PEDRO AURIO MAIA FILHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
REPARO DE DANOS EM FITA DUPLA NO DNA DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA COM E SEM USO DE INIBIDORES DE
TIROSINO-QUINASE**

FORTALEZA

2023

PEDRO AURIO MAIA FILHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
REPARO DE DANOS EM FITA DUPLA NO DNA DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA COM E SEM USO DE INIBIDORES DE TIROSINO-
QUINASE

Trabalho apresentado para o Exame de Defesa, visando obter o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: doenças onco-hematológicas. Linha de pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Santária, Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. Fortaleza, 31 de janeiro de 2023.

FORTALEZA

2023

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

M187a Maia Filho, Pedro Aurio.

Avaliação da expressão de genes relacionados ao reparo de danos em fita dupla no DNA de pacientes com leucemia mieloide crônica com e sem uso de inibidores de tirosino-quinase / Pedro Aurio Maia Filho. – 2023.

83 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Reparo de DNA. 3. Junção de Extremidades de DNA não Homólogo. I. Título.

CDD 615

PEDRO AURIO MAIA FILHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
REPARO DE DANOS EM FITA DUPLA NO DNA DE PACIENTES COM
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA COM E SEM USO DE INIBIDORES DE TIROSINO-
QUINASE

Trabalho apresentado para o Exame de
Qualificação visando obter o grau de Doutor em
Ciências Farmacêuticas. Área de concentração:
doenças onco-hematológicas. Linha de
pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância
Sanitária.

Aprovado em: 31/01/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Renata Mirian Nunes Eleutério
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

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 agradecer ao Pai, pois tenho fé que ele sempre está do nosso lado nos momentos mais felizes e, principalmente, nos momentos mais tristes.

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 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, Kamilla, Dudu, Gabi, Rozana, Mariana, Jessica e Vanessa, 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 10 anos de convivência, de amizade, de aprendizado, de crescimento pessoal e profissional. Obrigado por acreditar nos meus sonhos e vivê-los junto comigo.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, Tarcisio, Marília, Luana, Marilena, Maritza, Talyta, Alano, Renata, Diego, Janilly, Monalisa, Thawanny, Laís, Acy e Suzzy, meus mais sinceros agradecimentos. Cada um de vocês me encorajou 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 por todo apoio.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, representado pelo Professor Dr. Ramon Pessoa e pelos queridos Wiliian e Juliana, sem o suporte de vocês, nada disso seria possível.

Agradeço à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo incentivo financeiro através da bolsa, por um período, e editais de fomento.

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 doutorado, aos laboratórios vizinhos, aos funcionários dos Departamentos de Farmácia e de Análises Clínicas e Toxicológicas, em algum momento, todos foram importantes na execução desse trabalho.

Sou grato à Profa. Cristiani Lopes Capistrano Gonçalves de Oliveira, diretora da Farmácia Escola da UFC, pela sua sensibilidade ao me autorizar a me afastar parcialmente das atividades de farmacêutico para que eu pudesse realizar esse sonho.

Obrigado aos professores presentes na banca de defesa, Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior, Profa. Dra. Rosângela Pinheiro Machado, Profa. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes e Profa. Dra. Renata Mirian Nunes Eleutério pela atenção, disponibilidade e pelas considerações que enriquecerão o trabalho. Sintam-se abraçados como forma de gratidão.

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 mieloide crônica (LMC) origina-se a partir de um distúrbio clonal onde ocorre expansão maciça das células neoplásicas da linhagem mieloide. 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. O tratamento de escolha para pacientes na fase crônica da doença são os inibidores de tirosina-quinase. O reparo de lesão do DNA é indispensável para garantir a integridade do genoma. Sabe-se que os danos de fita dupla (DFD) são mais lesivos ao DNA, podendo desencadear um quadro de instabilidade genômica e predisposição ao câncer. Nos mamíferos, a principal via de reparo de DFDs é a junção de extremidades não homóloga (JENH). Nesse contexto, nos propomos a avaliar a expressão de genes relacionados ao reparo de DFD no DNA (*ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*) dos pacientes com LMC, através da via de JENH, e a influência do uso crônico dos ITK sobre a expressão desses genes. Trata-se de um estudo transversal com 91 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC, sendo 59 (64,8 %) em uso de ITK de primeira geração (LMC G1), 26 (28,6 %) em uso dos inibidores de segunda geração (LMC G2) e 6 (6,6 %) ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D). O grupo controle (GC) de indivíduos saudáveis foi composto por 20 doadores de sangue. A análise de expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Análise estatística foi realizada através do Programa GraphPad Prism 6.0, os testes realizados foram determinados de acordo com a normalidade dos dados. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha \leq 0,05$). As comparações da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC e GC apresentaram valores estatisticamente mais elevados dos genes *XRCC5* e *XRCC6* no grupo de pacientes com LMC. As comparações dos genes *ATM* e *LIG4* (LMC *versus* GC) não apresentaram diferenças estatísticas. Ao estratificar os pacientes em três grupos (LMC D, LMC G1 e LMC G2), foi verificado que o grupo de pacientes com LMC ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) apresentou níveis de expressão do gene *ATM* mais elevados em comparação com os demais grupos. Foi verificada diferença estatística nas seguintes comparações: LMC D *versus* LMC GC, LMC D *versus* LMC G1 e LMC D *versus* LMC G2. Ao analisarmos a expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* nos grupos do presente estudo, os resultados encontrados foram semelhantes para ambos os genes. No caso do gene *XRCC5*, houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão em pacientes dos grupos LMC G1 e LMC G2 em relação aos pacientes ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) e GC. Os resultados para o *XRCC6* diferem apenas na comparação: LMC G2 *versus* GC e LMC G2 *versus* LMC D, que não houve diferença estatística, mesmo os níveis de expressão do gene *XRCC6* apresentando-se bem elevados em relação aos grupos LMC D e GC. Não foi verificada diferença estatística na comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos do presente estudo. Na comparação quanto ao nível de resposta molecular (RM) em pacientes com LMC em uso de imatinibe, foi verificada uma expressão aumentada dos genes *XRCC5* e *XRCC6* no grupo COM RM em relação aos grupos SEM RM e GC. As comparações da expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* com os riscos dos escores Sokal, Hasford, Eutos e ELTS não apresentaram diferenças estatísticas. Esses achados sugerem que *ATM* está aumentado nos estágios iniciais da doença, *XRCC5* e *XRCC6* são marcadores desfavoráveis de prognóstico e que *LIG4* não exerce um papel como potencial marcador de prognóstico em pacientes com LMC. Ademais, o imatinibe provavelmente aumenta a expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* nos pacientes com LMC, mas parece não exercer influência sobre a expressão dos genes *ATM* e *LIG4*.

Palavras-chave: Leucemia Mieloide Crônica; Reparo de DNA; Junção de Extremidades de DNA não Homólogo.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) originates from a clonal disorder where massive expansion of neoplastic cells of the myeloid lineage occurs. The characteristic genetic alteration of CML is the Philadelphia chromosome (Ph), which results from a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22, generating a BCR-ABL oncoprotein with constitutively activated tyrosine kinase activity. The treatment of choice for patients in the chronic phase of the disease are tyrosine kinase inhibitors. DNA damage repair is essential to ensure genome integrity. It is known that double-stranded damage (DSB) is more damaging to DNA, and may trigger genomic instability and predisposition to cancer. In mammals, the major repair pathway for DSBs is non-homologous end joining (NHEJ). In this context, we propose to evaluate the expression of genes related to DSB repair in the DNA (ATM, XRCC5, XRCC6 and LIG4) of patients with CML, through the NHEJ pathway, and the influence of the chronic use of TKIs on the expression of these genes. This is a cross-sectional study with 91 patients with a clinical and molecular diagnosis of CML, 59 (64.8%) using first-generation ITK (G1 CML), 26 (28.6%) using second generation (G2 CML) and 6 (6.6%) at diagnosis/without treatment (D CML). The control group (CG) of healthy individuals was composed of 20 blood donors. Gene expression analysis was performed by real-time polymerase chain reaction. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 program, the tests performed were determined according to the normality of the data. The significance level used was 5% ($\alpha \leq 0.05$). Comparisons of gene expression related to DNA repair in patients with CML and CG showed statistically higher values of genes XRCC5 and XRCC6 in the group of patients with CML. Comparisons of ATM and LIG4 genes (CML versus CG) showed no statistical differences. By stratifying the patients into three groups (D CML, G1 CML and G2 CML), it was found that the group of patients with CML at diagnosis/without treatment (D CML) had higher levels of ATM gene expression compared to the others groups. Statistical differences were verified in the following comparisons: D CML versus CG CML, D CML versus G1 CML and D CML versus G2 CML. When analyzing the expression of the XRCC5 and XRCC6 genes in the groups of the present study, the results found were similar for both genes. In the case of the XRCC5 gene, there was a statistically significant increase in expression levels in patients from the G1 CML and G2 CML groups in relation to patients at diagnosis/without treatment (D CML D) and CG. The results for XRCC6 differ only in the comparison: G2 CML versus CG and G2 CML versus D CML, where there was no statistical difference, even the expression levels of the XRCC6 gene being very high in relation to the D CML and CG groups. There was no statistical difference when comparing the expression of the LIG4 gene in the groups of the present study. Comparing the level of molecular response (MR) in patients with CML using imatinib, an increased expression of the XRCC5 and XRCC6 genes was observed in the group WITH MR compared to the groups WITHOUT MR and CG. Comparisons of the expression of the ATM, XRCC5, XRCC6 and LIG4 genes with the risks of the Sokal, Hasford, Eutos and ELTS scores did not show statistical differences. These findings suggest that ATM is increased in the early stages of the disease, XRCC5 and XRCC6 are unfavorable prognostic markers, and that LIG4 does not play a role as a potential prognostic marker in patients with CML. Furthermore, imatinib probably increases the expression of the XRCC5 and XRCC6 genes in patients with CML, but does not seem to influence the expression of the ATM and LIG4 genes.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia; DNA repair; Non-Homologous DNA End Junction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– O desenvolvimento da LMC na fase crônica e a evolução para a fase blástica, após o surgimento de mutações genéticas adicionais.....	20
Figura 2	– Ilustrações das células do sangue de um paciente com leucemia. Aparência microscópica do sangue, vista por J. H. Bennett, Edimburgo	22
Figura 3	– Prevalência estimada de portadores de LMC nos EUA por ano.....	24
Figura 4	– Eventos moleculares que levam à expressão fenotípica maligna da LMC Surgimento do cromossomo Ph e codificação da oncoproteína p^{210} BCR-ABL	28
Figura 5	– Desenvolvimento de terapias para a LMC. As setas mostram os tratamentos ao longo do tempo	29
Figura 6	– Mecanismo de ação da proteína p^{210} BCR-ABL e do medicamento mesilato de imatinibe na patogênese da LMC.....	31
Figura 7	– Estratégia terapêutica para tratamento de pacientes com LMC	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Recomendações para o monitoramento citogenético e molecular em pacientes com LMC	37
Tabela 2	– Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular em pacientes com LMC.....	38
Tabela 3	– Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	46
Tabela 4	– Características sociodemográficas (idade, sexo e ocupação) dos pacientes com LMC.....	49
Tabela 5	– Determinação dos scores de risco dos pacientes com LMC: Sokal, Hasford, Eutos e ELTS nos pacientes com LMC.....	49
Tabela 6	– Comparação da expressão do gene <i>ATM</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	52
Tabela 7	– Comparação da expressão do gene <i>XRCC5</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	53
Tabela 8	– Comparação da expressão do gene <i>XRCC6</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	55
Tabela 9	– Comparação da expressão do gene <i>LIG4</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	56
Tabela 10	– Expressão dos genes <i>ATM</i> , <i>XRCC5</i> , <i>XRCC6</i> e <i>LIG4</i> de acordo com o risco (baixo, intermediário e alto) dos scores Sokal, Hasford, Eutos e ELTS.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Nível de expressão do gene <i>ATM</i> em pacientes com LMC e GC	50
Gráfico 2	– Nível de expressão do gene <i>XRCC5</i> em pacientes com LMC e GC	50
Gráfico 3	– Nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> em pacientes com LMC e GC	51
Gráfico 4	– Nível de expressão do gene <i>LIG4</i> em pacientes com LMC e GC	51
Gráfico 5	– Nível de expressão do gene <i>ATM</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	53
Gráfico 6	– Nível de expressão do gene <i>XRCC5</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	54
Gráfico 7	– Nível de expressão do gene <i>XRCC6</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	55
Gráfico 8	– Nível de expressão do gene <i>LIG4</i> nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.....	56
Gráfico 9	– Comparação da expressão do gene <i>ATM</i> em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM.....	57
Gráfico 10	– Comparação da expressão do gene <i>XRCC5</i> em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM.....	58
Gráfico 11	– Comparação da expressão do gene <i>XRCC6</i> em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM.....	58
Gráfico 12	– Comparação da expressão do gene <i>LIG4</i> em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBC	Análise de metáfases com bandeamento cromossômico
μ -BCR	Região micro do gene <i>BCR</i>
Alo-TCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoéticas
C2	Concentração plasmática após 2 horas
COM RM	Com remissão molecular
CPGM	Células progenitoras de granulócitos/macrófagos
CPL	Células progenitoras linfóides
CPM	Células precursoras mielóides
CPME	Células progenitoras de megacariócitos e eritrócitos
CTHs	Células-tronco hematopoiéticas
EUA	Estados Unidos da América
ELTS	<i>Score de sobrevivência a longo prazo Eutos</i>
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
ID	Índice de dano
IFN- α	Interferon-alfa
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 tirosino-quinase de primeira geração
LMC G2	Paciente com leucemia mieloide crônica em uso de inibidores de tirosino-quinase de segunda geração
LMC-FB	Fase blástica da LMC
LMC-FC	Fase crônica da LMC
LT	Linfócitos T

m- <i>bcr</i>	Região menor do gene <i>BCR</i>
M- <i>bcr</i>	Região maior do gene <i>BCR</i>
PCR-RT	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
Ph	Filadélfia
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RHC	Remissão hematológica completa
RM	Remissão molecular
SH1	SRC – <i>Kinase Homology</i>
SEM RM	Sem remissão molecular
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMO	Transplante de medula óssea
UGT1A1	Uridina difosfato glucuronosiltransferase 1A1
UGT1A1-BM	Baixa metabolização de uridina difosfato glucuronosiltransferase 1A1
UGT1A1-EM	Elevada metabolização de uridina difosfato glucuronosiltransferase 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	Quilodalton

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.....	25
1.5	Diagnóstico da LMC.....	25
1.6	Fisiopatologia da LMC	27
1.7	Tratamento da LMC,.....	28
1.8	ITK de primeira e segunda geração	30
1.8.1	<i>Mesilato de imatinibe</i>	30
1.8.2	<i>Nilotinibe</i>	33
1.8.3	<i>Dasatinibe</i>	34
1.8.4	<i>Remissão molecular sem tratamento</i>	35
1.8.5	<i>Efeitos adversos da terapia com ITK</i>	36
1.9	Monitoramento da LMC.....	36
1.10	Genética toxicológica e lesões no DNA.....	39
1.11	Sensoriamento das lesões e mecanismos de reparo do DNA.....	40
1.12	LMC e os mecanismos de reparo do dano de fita dupla no DNA.....	41
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	Objetivo geral.....	43
2.2	Objetivos específicos.....	43
3	MÉTODOS.....	44
3.1	Casuística.....	44
3.2	Local do estudo.....	44
3.3	Seleção da amostra.....	44
3.4	Coleta de amostras e dados.....	45
3.5	Análise da expressão de genes de reparo do DNA.....	45
3.5.1	<i>Extração do RNA total</i>	45
3.5.2	<i>Quantificação de RNA</i>	45
3.5.3	<i>Reação da polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR)</i>	46
3.5.4	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	46

3.6	Aspectos éticos.....	47
3.7	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS PARCIAIS.....	49
4.1	Características sociodemográficas (idade e sexo) e escores de risco dos pacientes com LMC: Sokal, Hasford, Eutos e ELTS.....	49
4.2	Expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC e grupo controle utilizando qPCR.....	50
4.3	Expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes dos grupos LMC D, LMC G1, LMC G2 e GC, utilizando qPCR.....	52
4.4	Comparação da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA quanto ao nível de resposta molecular em pacientes com LMC em uso de imatinibe e grupo controle.....	57
4.5	Comparação da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC com o risco (baixo, intermediário e elevado) dos scores de risco (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS).....	60
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÃO.....	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
	APÊNDICES.....	78

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 presente em praticamente todas as células dos pacientes com LMC (DRUKER *et al.*, 2001).

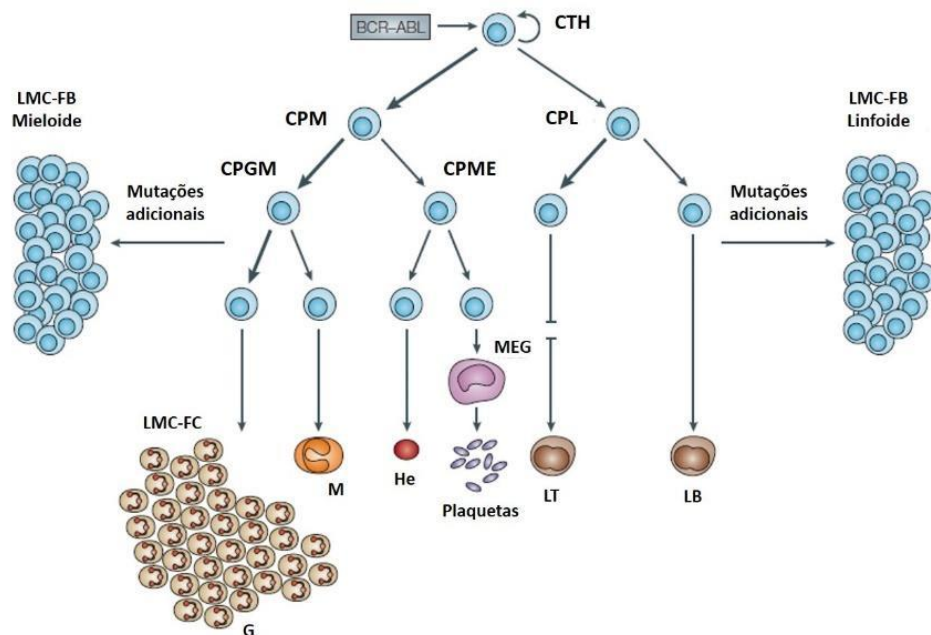
A referida translocação produz dois novos genes, o *ABL-BCR* no cromossomo 9q+ e *BCR-ABL* no cromossomo 22q-, sendo este último o cromossomo Ph (BARBOZA *et al.*, 2000). O ponto de quebra para o gene *ABL*, ocorre geralmente entre os éxons a1 e a2 e para o gene *BCR*, essa quebra pode ocorrer em três 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 (b₂a₂) e e14a2 (b₃a₂), 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).

A aquisição de mutações genéticas adicionais, além expressão do *BCR-ABL*, provoca a progressão da LMC-FC para a fase blástica (LMC-FB), caracterizada por um acúmulo de células blásticas mieloides (em cerca de dois terços dos pacientes) ou células blásticas linfoides (em um terço dos pacientes). Embora a CTH da LMC seja pluripotente, a produção de LB a partir do clone neoplásico ocorre apenas em níveis baixos e os precursores de LT raramente podem ser detectados. Isto indica que a linfopoiese, em particular o desenvolvimento de LT, é comprometido pela expressão do *BCR-ABL* (FIGURA 1) (TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Figura 1 – O desenvolvimento da LMC na fase crônica e a evolução para a fase blástica, após o surgimento de mutações genéticas adicionais.



Nota: CTH: célula tronco hematopoética; CPM: célula progenitora mielóide; CPMG: célula progenitora de granulócito/macrófago; CPME: célula progenitora de megacariócito e eritrócito; M: monócito; He: hemácia; MEG: megacariócito; CPL: célula progenitora linfóide; LT: célula T; LB: célula B; LMC-FC: fase crônica da LMC; LMC-FB: fase blástica da LMC. Fonte: TAKAHASHI *et al.*, 1998, **modificado**.

O prognóstico dos pacientes pode variar de acordo com as fases evolutiva da doença. Na fase crônica, há índices que visam individualizar grupos de risco baixo, médio, e alto. Os índices mais utilizados são o escore proposto por Sokal *et al.* em pacientes que usavam Hidroxiureia ou Bussulfan, e o proposto por Hasford *et al.* em pacientes que usavam interferon- α (BACCARANI *et al.*, 2013).

O escore Eutos (*European Treatment and Outcome Study, 2011*) foi proposto em pacientes em uso de inibidores de tirosino-quinase (ITK). Esses índices levam em conta características como idade, grau de esplenomegalia, porcentagem de blastos, 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. Atualmente, a avaliação de risco do paciente ao diagnóstico deve ser avaliada com o novo Eutos de sobrevivência a longo prazo (ELTS). Útil para pacientes em uso de ITK, o ELTS utiliza os mesmos dados hematológicos simples, tamanho do baço e idade, assim como o score Sokal, no entanto tem menos impacto em pacientes tratados com ITK (ELTS) do que em pacientes tratados com quimioterapia convencional (Sokal). O escore Sokal divide mais pacientes para os grupos intermediários e de alto risco do que o ELTS, especialmente entre os pacientes mais velhos (BACCARANI *et al.*, 2013; HASFORD *et al.*, 2011).

Há pouco mais 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 eficácia modesta e uma multiplicidade de eventos tóxicos. O transplante alogênico de células tronco hematopoéticas (alo-TCTH) é o único tratamento curativo, mas traz riscos de morbi e mortalidade. Além disso, alo-TCTH 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, melhorou a taxa de sobrevivência de 10 anos de aproximadamente 20% para 80-90% (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

A etiologia da LMC é incerta. 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

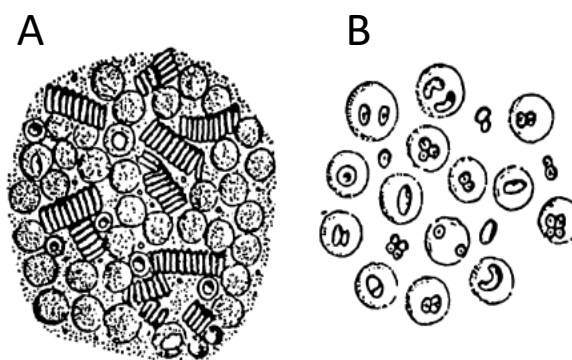
A LMC foi inicialmente descrita no ano de 1845, em Edinburg, por John Hughes

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 o que ele observou no sangue foi totalmente contrário 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 – Ilustrações das células do sangue de um paciente com leucemia. Aparência microscópica do sangue, vista 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).

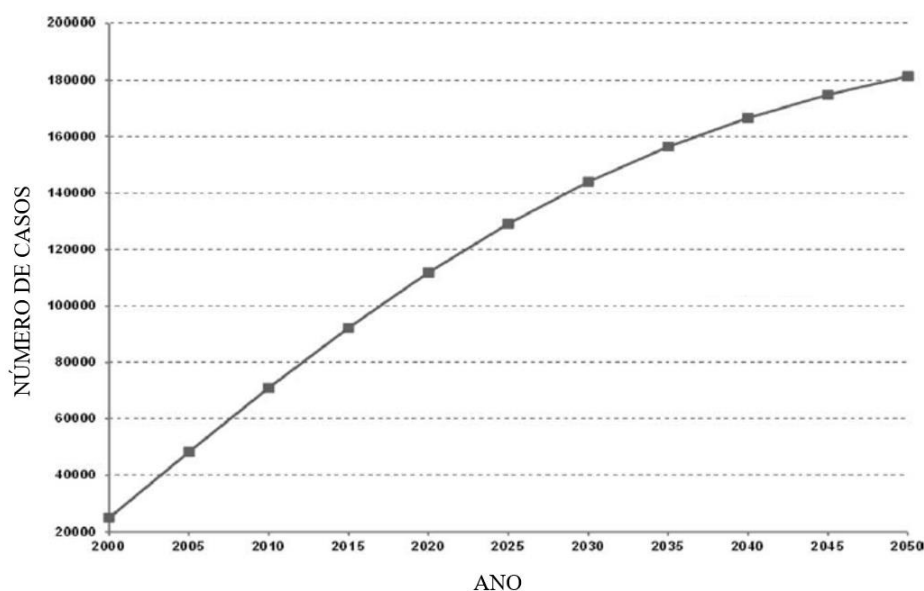
A partir de então, a LMC tornou-se o primeiro exemplo de neoplasia maligna humana a estar associada a uma anormalidade cromossômica específica. Na década de 1980, as partes envolvidas neste fenômeno foram identificadas como translocação entre *BCR* e *ABL*, seguido pela descoberta de que a atividade não controlada da tirosino-quinase é essencial para a capacidade do *BCR-ABL* de 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. A idade mediana do início da doença é de 57 anos; no entanto, a LMC ocorre em todas as faixas etárias. Pacientes com mais de 70 anos representam cerca de 20% dos acometidos e crianças e adolescentes <5%. Em 2020, cerca de 8.400 pessoas foram diagnosticadas com LMC nos Estados Unidos da América e, aproximadamente, 1.100 pessoas morreram da doença (DEININGER *et al.*, 2020; HOCHHAUS *et al.*, 2020). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, para cada ano do triênio 2020/2022, sejam diagnosticados, no Brasil, 10.810 novos casos de leucemia (INCA, 2020).

Desde 2000, ano de início da terapia com mesilato de imatinibe, a mortalidade anual na LMC diminuiu de 10-20% para 1-2%. 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 um patamar de 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 abordagem 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 manifesta-se predominantemente por volta da sexta década 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 por conta das 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 47 anos (CID *et al.*, 2013; PETROLA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013; MAIA-FILHO *et al.*, 2018).

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 (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 mieloides comprometidos, porém com capacidade funcional e de diferenciação razoavelmente normais. A fase acelerada é caracterizada por um decréscimo na diferenciação mielóide 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, resultam em anemia e esplenomegalia, incluem também 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

A avaliação inicial deve consistir em histórico e exame físico, incluindo palpação de baço, hemograma com contagem diferencial e painel de hepatite B. Pode ser solicitado um

aspirado de medula óssea e biópsia para avaliação morfológica e citogenética, bem como para a realização da reação quantitativa em cadeia de transcrição reversa (RT-PCR) para estabelecer a presença de transcritos quantificáveis *BCR-ABL1* mRNA ao diagnóstico (DEININGER *et al.*, 2020).

Portanto, 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 periférico 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 RNA de baixa qualidade ou falha da reação; os segundos podem ser devido a contaminação (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/mm³, 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

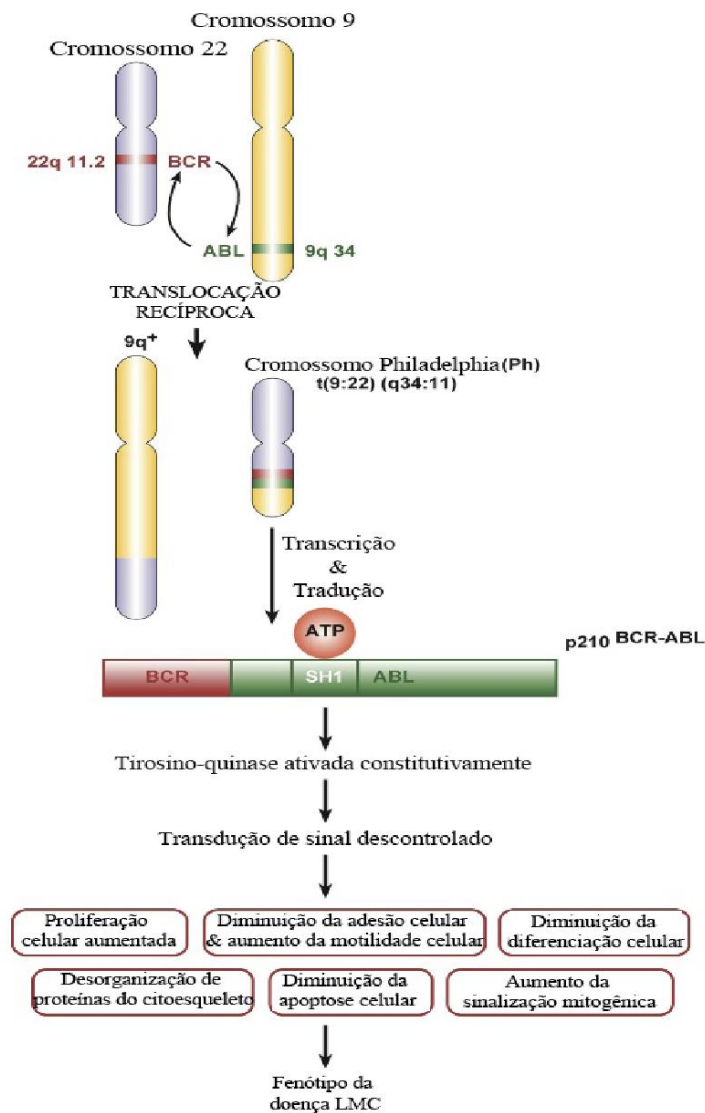
O *ABL* é um gene que é expresso na maioria dos tecidos. Nas células, a proteína ABL é distribuída tanto no núcleo quanto no citoplasma e é responsável pela transdução de sinais do fator de crescimento de superfície celular e receptores de adesão para regular a estrutura do citoesqueleto. BCR é também 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 à expressão fenotípica maligna da LMC. Surgimento do cromossomo Ph e codificação da oncoproteína p^{210} BCR-ABL.



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

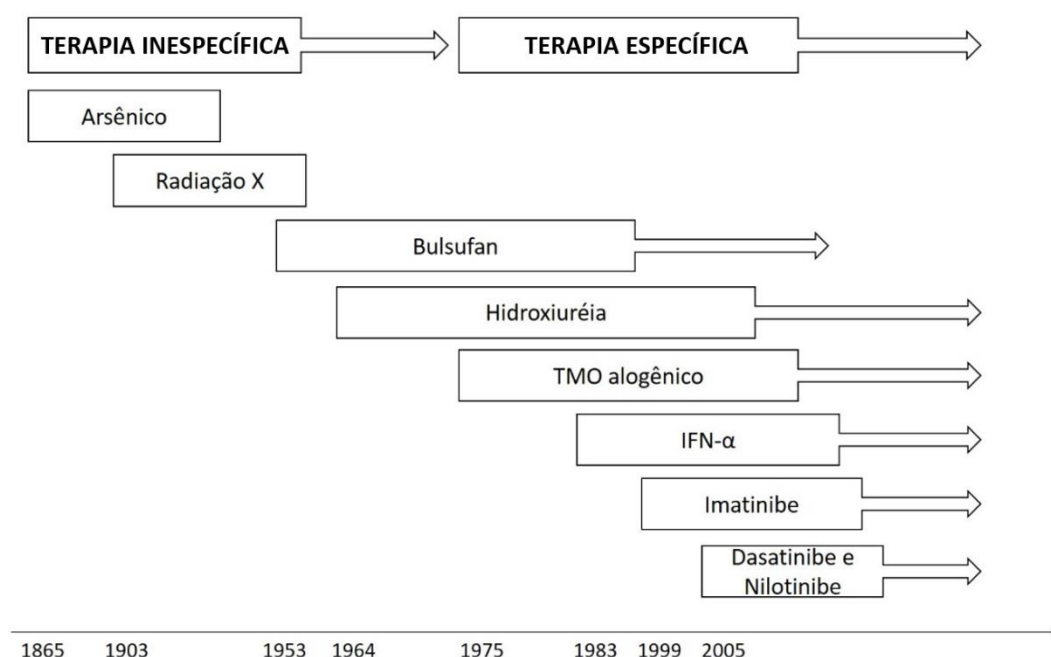
1.7 Tratamento da LMC

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. As setas mostram os tratamentos ao longo do tempo.



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 citorredutora 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).

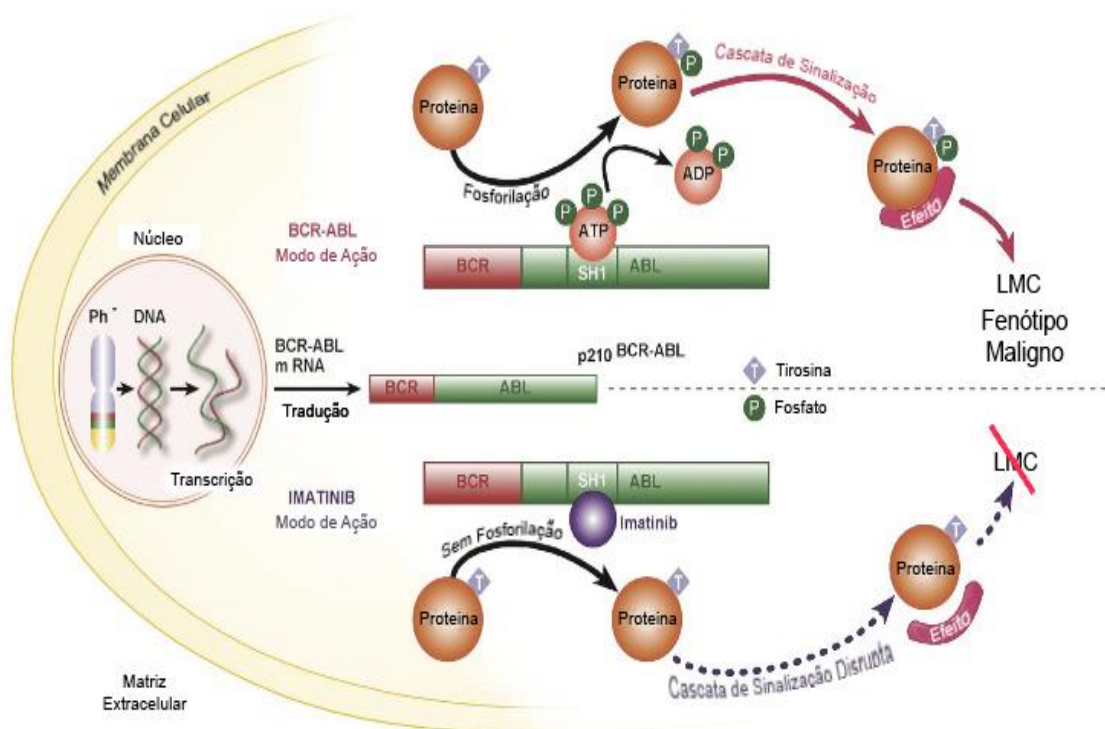
1.8 ITK de primeira e segunda geração

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 p^{210} BCR-ABL e do medicamento 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)

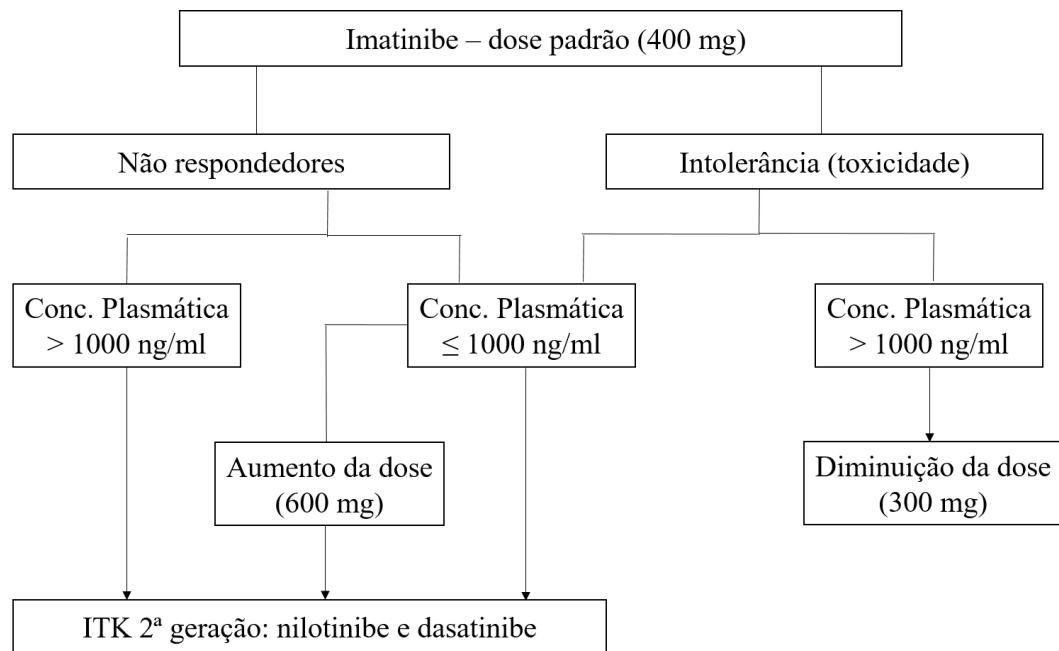
Geralmente, os eventos adversos com o uso do imatinibe são leves e raramente atingem graus 3 ou 4 segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). A toxicidade hematológica (neutropenia, trombocitopenia e anemia) é o evento adverso mais frequente, presente em 16,7% dos pacientes, seguido por elevação nos 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 tratamento de 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 nilotinib (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 glucoronosiltransferase 1A1 (UGT1A1), o que

umenta 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 nilotinibe 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 *et al.* (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 *et al.* (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, nilotinibe 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 Remissão molecular sem tratamento

Uma proporção significativa de pacientes que atinge resposta molecular profunda (RMP) estável pode ser candidata a uma tentativa de descontinuação do tratamento, se a RMP for sustentada. O primeiro estudo prospectivo para interromper o tratamento com ITK foi o Stop Imatinib 1 (STIM1), que mostrou que 38% dos pacientes mantiveram uma remissão molecular após um acompanhamento mediano de 77 meses (ETIENNE *et al.*, 2017). Os critérios de elegibilidade para a interrupção do tratamento foram em torno da RM^{4.5} sustentada

por 2 anos antes de parar. Desde então, vários ensaios foram conduzidos ou ainda estão em andamento. Ademais, a European Leukemia Net estabeleceu as recomendações para a descontinuação dos ITK (HOCHHAUS *et al.*, 2020).

1.8.5 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, como a mielossupressão. São efeitos 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, como ganho de peso, câimbras, fraqueza e diarreia. 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 superimportantes 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 e a contagem diferencial são necessários 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 em pacientes com LMC.

Ao diagnóstico

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 RMM ($BCR-ABL \leq 0,1\%$ 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 análise de metáfases com bandeamento cromossômico (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 RMM seja obtida, em seguida, a cada 3 a 6 meses (BACCARANI *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Definições de resposta hematológica, citogenética e molecular em pacientes com LMC.

Resposta	Definição
Hematológica completa (RHC)	Leucócitos < 10 x 10 ⁹ / L;
	Basófilos < 5 %;
	Ausência de mielócitos, promielíctos e mieloblastos;
	Contagem de plaquetas < 450 x 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 $BCR-ABL \leq 0,1\%$ 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 pode ser definida 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 lesões no DNA

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 exposta a uma variedade de substâncias genotóxicas tanto por fontes endógenas, como subprodutos do metabolismo humano, quanto por fontes exógenas (físicas, químicas ou biológicas), que incluem a radiação ultravioleta, a radiação ionizante, metais pesados, poluentes do ar, drogas quimioterápicas, carcinógenos químicos e respostas inflamatórias. Estima-se que diariamente sejam produzidas 100.000 lesões no DNA (ERMOLAEVA; SCHUMACHER, 2014; IYAMA e WILSON, 2013).

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, favorecer o surgimento de células neoplásicas (LOEB; HARRIS, 2008).

O reparo de lesão do DNA é indispensável para garantir a integridade do genoma. As vias de reparo removem o erro, diminuindo assim, a probabilidade de ocorrência de mutações. Alguns trabalhos na literatura trazem evidências de que reduções leves na capacidade de reparação do DNA, assumidas como consequência da variação genética comum, afetam a predisposição do câncer (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; KENYON; GERSON, 2007).

1.11 Sensoriamento das lesões e mecanismos de reparo do DNA

O DNA está constantemente exposto a agente nocivos endógenos e exógenos. Uma lesão de fita dupla no DNA é bastante prejudicial e exige uma resposta celular imediata, ativando uma rede de sinalização, para garantir que o sinal relacionado ao dano no DNA seja rapidamente transmitido com precisão para os vários processos da célula. A proteína quinase ATM (ataxia telangiectasia mutada) é a principal responsável por ativar uma resposta ao DFD no DNA. A literatura relata que membros da família de proteínas PI3K (fosfatidilinositol 3-quinases), como a ATM, são ativadas no início da resposta a lesões no DNA, podem atuar como sensores e/ou iniciadores de mecanismos de resposta ao estresse genotóxico (BENSIMON *et al.*, 2011).

Após a ocorrência do dano no DNA, o mecanismo de reparo inicia-se a partir de proteínas sensoriais, que detectam o dano e são capazes de transmitir o alarme para outras proteínas (efetoras). As proteínas efetoras participam dos diferentes mecanismos de reparo do DNA inerentes ao maquinário celular (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

Além disso, através da fosforilação da proteína p53, o gene *ATM* é o responsável por ativar a via de resposta ao dano do ciclo celular. Logo, o transdutor primário do alarme em DFDs é o *ATM*, que atua como uma proteína quinase de fosforilação de serina-treonina (SHIEH *et al.*, 1997; SILICIANO *et al.*, 1997). A ativação de *ATM* pode conduzir as células a um bloqueio do ciclo celular, que pode ocorrer nas fases G1, S ou G2 (MYERS; CORTEZ, 2006; JAZAYERI *et al.*, 2006).

Os mecanismos de reparo do DNA são geralmente divididos de acordo com o tipo de lesão que causam no DNA. Nos danos em fita simples do DNA, tem-se os mecanismos de

Reparação de Erros de Emparelhamento de Bases do DNA (MMR), Reparação por Excisão de Bases (BER) e Reparação por Excisão de Nucleotídeos (NER). Nos danos de fita dupla (DFD), tem-se como mecanismos para reparação destas lesões a Recombinação Homóloga (RH) e a Junção de Extremidades Não Homólogas (JENH) (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; IYAMA e WILSON, 2013). Sabe-se que os DFD são mais lesivos ao DNA, podendo desencadear um quadro de instabilidade genômica e predisposição ao câncer (BOHGAKI, BOHGAKI e HAKEM, 2010; IYAMA e WILSON, 2013).

Na RH, que ocorre predominantemente na fase S ou G2 da divisão celular, forma-se um modelo preciso a partir de uma sequência homóloga, com a cromátide irmã idêntica sendo preferida sobre a homologia em outro cromossomo. Esta troca entre cromátides irmãs restaura a sequência exata e original de DNA, resultando em um modo fiel de reparação (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003). Nos mamíferos, a principal via de reparo de DFDs é a JENH, que age na fase G1 do ciclo celular (PASTWA; BLASIAK, 2003; VALERIE; POVIRK, 2003; BELLI *et al.*, 2002; WEST *et al.*, 2003). Zhong e *et al.* (2002) ressaltam a importância da JENH para a manutenção da integridade do genoma em mamíferos. Nesse mecanismo de reparo, ocorre uma ligação que reconecta as fitas que foram quebradas. A JENH é passível de erro, uma vez que requer pouca ou nenhuma sequência de homologia (fita molde homóloga) e envolve a junção direta do DNA (IYAMA e WILSON, 2013).

O reparo de JENH é realizado por meio de complexos proteicos Ku70 e Ku80, que são codificados, respectivamente, pelos genes *XRCC6* (localizado no cromossomo 22q13.2) e *XRCC5* (localizado no cromossomo 2, na região q35). Ku70 e Ku80 funcionam como DNA helicases dependente de ATP. Esses complexos ligam-se ao local da lesão da dupla fita, nas extremidades, e são unidos pela proteína DNA Ligase IV, codificada pelo gene *LIG4* (localizado no cromossomo 13, na região q33-q34). A DNA ligase IV é responsável por finalizar o reparo, unindo os filamentos danificados em uma reação dependente de ATP (RIBEIRO-JR *et al.*, 2015).

1.12 LMC e os mecanismos de reparo do dano de fita dupla no DNA

A LMC começa com uma fase crônica e, posteriormente, progride para uma fase acelerada ou blástica. Embora se saiba que vários genes estejam envolvidos na progressão para a fase blástica, os mecanismos moleculares para a evolução em relação à crise de explosão não estão totalmente identificados. Os estímulos oncogênicos aumentam a proliferação celular, que

requer a replicação do DNA. A replicação não programada imposta por estímulos oncogênicos leva a DFD (TAKAGI *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado que variações polimórficas dos genes *XRCC5* e *XRCC6* estão relacionadas com um risco maior ou menor de desenvolvimento de câncer de mama e mieloma (RAJAEI *et al.*, 2014; HAYDEN *et al.*, 2007). Gorre e *et al.* (2014) verificaram que o número variável de polimorfismos em repetições em série (VNTR) (rs 6147172) na região promotora do gene *XRCC5* tem efeito na expressão gênica e está associado com o desenvolvimento de vários cânceres, inclusive a LMC, devido à reparação propensa a erros, levando a instabilidade genômica. Assim, os autores sugerem que o polimorfismo VNTR na região promotora do gene *XRCC5* poderia servir como marcador prognóstico importante no desenvolvimento da LMC. Porém, são escassos na literatura estudos sobre a expressão desses genes (*ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*) e o desenvolvimento da LMC.

Apesar do impacto gerado pelo tratamento com os ITK na LMC promovendo uma melhora 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 uma longa jornada de terapia medicamentosa. Nesse contexto e com base em achados encontrados por nosso grupo de pesquisa, em que o uso crônico dos ITK apresenta potencial dano ao DNA, podendo contribuir para uma evolução da LMC para as fases acelerada e aguda (MAIA-FILHO *et al.*, 2018), nos propomos a avaliar a expressão de genes relacionados ao reparo de DFD no DNA dos pacientes com LMC, através da via de JENH que é o principal mecanismo de reparo em DFD em mamíferos, e a influência do uso crônico dos ITK sobre a expressão desses genes. Enfatiza-se que há poucos relatos na literatura sobre o impacto da expressão dos respectivos genes na LMC e a associação desses com os parâmetros clínicos, laboratoriais e scores de risco. Os resultados contribuirão para um melhor entendimento sobre a evolução, bem como para o monitoramento terapêutico da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes relacionados ao reparo de danos em fita dupla no DNA em pacientes com leucemia mielóide crônica com e sem uso de inibidores de tirosino-quinase.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as características sociodemográficas (idade, sexo e ocupação) e a estratificação de risco dos escores de prognóstico (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS) dos pacientes com LMC;
- Determinar a expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* nos pacientes com LMC com e sem uso de ITK e grupo controle;
- Comparar a expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* nos pacientes com LMC com e sem uso de ITK e grupo controle;
- Comparar a expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* quanto ao nível de resposta molecular nos pacientes com LMC em uso de imatinibe e grupo controle;
- Verificar a possível associação da expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* quanto aos escores de risco (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS) dos pacientes com LMC com e sem uso de ITK.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo transversal com 91 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC, sendo 59 (64,8 %) em uso de ITK de primeira geração (LMC G1), 26 (28,6 %) em uso dos inibidores de segunda geração (LMC G2) e 6 (6,6 %) ao diagnóstico (LMC D), sem uso de terapias medicamentosas. 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 20 doadores de sangue.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), onde foram realizadas as coletas sanguíneas; e no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas Prof. Dr. Eurico Litton Pinheiro de Freitas (LACT) e Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH), ambos fazem parte da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados o processamento das amostras e a análise de expressão gênica.

3.3 Seleção da amostra

Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos, voluntários, 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 realizaram transplante de medula óssea;
- Pacientes com outras neoplasias ou submetidos a regimes de quimioterapia;
- Pacientes que estavam em uso de algum imunossupressor;
- Pacientes com sorologia positiva para Hepatite, HIV e HTLV;

Grupo controle:

- Indivíduos adultos, de ambos os sexos, declaradamente saudáveis 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 fevereiro de 2019 a julho de 2019, onde foi colhido sangue periférico em tubo (4 mL) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante para avaliação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). As informações sociodemográficas, clínicas e laboratoriais foram obtidas dos prontuários médicos, na data da coleta ou na data mais próxima. Dados ao diagnóstico foram utilizados para calcular os scores de risco Sokal, Hasford, Eutos e ELTS.

3.5 Análise da Expressão de Genes de Reparo do DNA

3.5.1 Extração do RNA Total

A extração de RNA total foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Trizol®). As amostras de sangue periférico foram submetidas à lise de eritrócitos. Em seguida, 750µl de trizol, 10µl (20ng/ml) de glicogênio e 200µl de clorofórmio foram adicionados à camada de células mononucleadas, homogeneizaram-se as amostras em vórtex e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante formado em cada amostra e transferido para novos tubos. Nestes tubos foram adicionados 400µl de isopropanol gelado para a precipitação do RNA. As amostras de sangue periférico permaneceram durante 60 minutos a -20°C para a precipitação do RNA. Após a precipitação, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o pellet ressuspensão em 20µl de água livre de RNase. Os RNAs foram quantificados e congelados em freezer a -80°C.

3.5.2 Quantificação de RNA

O RNA total obtido das amostras foi quantificado através de leitura em nanoespectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm, utilizando equivalência de

40µg/ml para 1 unidade de absorvância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8. A qualidade do RNA total foi também verificada em gel de agarose 1%.

3.5.3 Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Após extração e purificação, parte do RNA extraído (2000 ng) de cada amostra foi empregado na síntese do cDNA (20µl). A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do Kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Cat#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O cDNA por sua vez foi diluído 5 vezes para ser utilizado nas reações de qPCR. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

3.5.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

As reações foram realizadas no aparelho de qPCR Biorad CFX-96®, disponível no LACT/UFC, em placas transparentes de 96 *wells*. O volume final de cada reação foi de 10 µl, sendo 2 µl de água, 5 µl de TaqMan Universal, 0,5 µl de primer (*TaqMan Assay*) e 2,5 µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos (desnaturação) e 60° C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

Todas as amostras (casos, controles normais e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas. Uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da PCR foram incluídos na placa os NTCs (*no-templante controls*), no qual água foi adicionada no lugar do RNA.

Para análise da expressão gênica foram utilizados ensaios adquiridos (*TaqMan® Gene Expression Assay*) com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Tabela 3).

Tabela 3 – Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
Gene Normalizador	
<i>B2M</i> (β2-microglobulina)	Hs99999907_m1
Genes de estudo	

<i>ATM</i>	Hs00175892_m1
<i>XRCC5</i>	Hs00897854_m1
<i>XRCC6</i>	Hs01922652_g1
<i>LIG4</i>	Hs01866071_u1

Algumas variáveis foram controladas na análise da expressão gênica, como a quantidade de material inicial, qualidade do RNA utilizado, eficiência da transcrição reversa (RT), componentes inibitórios e diferença na atividade transicional global das células. Para a normalização dos parâmetros acima, foi utilizado um gene de referência: *Beta-2-microglobulina (B2M)* (YU *et al.*, 2017).

Os resultados foram avaliados através da obtenção dos valores de Cq (ciclo de quantificação). Ao final de cada corrida, os dados foram exportados para planilhas do software Excel® para o cálculo dos valores de ΔCq . A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

Posteriormente, os resultados dos Cq para cada gene de estudo foram normalizados para cada amostra, subtraindo o valor da média do Cq do gene de referência, obtendo o valor de ΔCq , utilizado para o cálculo de valores de expressão ($2^{\Delta Cq}$) (PFAFFL, 2001), segundo a formula abaixo:

$$2^{\Delta Cq} = \text{média do Cq do gene alvo} - \text{média do Cq do gene de referência}$$

3.6 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 3.048.193. Àqueles que concordarem em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0 e Excel 2016. As variáveis sociodemográficas foram apresentadas pelas frequências e porcentagens. A análise estatística para expressão dos genes relacionados ao reparo do DNA foi tratada como uma variável contínua (quantitativa). Para essas variáveis numéricas os testes para a comparação entre as médias foram determinados de acordo com a normalidade dos dados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Os resultados referentes às análises do nível de expressão gênica foram analisados com base no valor de cada Cq para cada amostra de cDNA (em duplicata). Para normalizar os valores de Cq, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos Cq's do gene constitutivo utilizado (Beta-2-Microglobulina) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, conseqüentemente, o valor de $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK *et al.*, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). O teste de D'Agostino-Pearson foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam distribuição normal. Após a identificação de outliers no GraphPad Prism, os valores foram retirados por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar.

A comparação entre o nível de expressão dos genes entre os grupos foi realizada utilizando-se os testes de Kruskal–Wallis ou Anova, Mann Whitney ou T-student, dependendo da normalidade dos dados e tamanho dos grupos. 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. Nas comparações múltiplas foi realizado o pós-teste de Tukey para análises no Anova e de Dunn's para o teste de Kruskal-Wallis.

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (DP), a fim de determinar a possível comparação entre o nível de expressão dos genes entre os grupos. O nível de significância estatística utilizado para todas as análises foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas, sociodemográficas (idade, sexo e profissão) e escores de risco dos pacientes com LMC (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS)

O presente estudo é composto por 91 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC e um grupo controle composto por 20 indivíduos declaradamente saudáveis. A idade dos pacientes variou de 19 a 94 anos do grupo controle de 21-67 anos. As características clínicas e sociodemográficas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características sociodemográficas (idade, sexo e ocupação) dos pacientes com LMC

Parâmetros Clínicos/ Sociodemográficos	Valores
	n (%) ou Média ± Desvio Padrão
SEXO	
Masculino	n = 48 (52,7%)
Feminino	n = 43 (47,3%)
IDADE (ANOS)	
Pacientes	47,20 ± 15,30
Grupo controle	36,36 ± 13,35
PROFISSÃO (PACIENTES)	
Agricultor	n = 20 (22,0%)
Serviços domésticos	n = 14 (15,4%)
Outras	n = 51 (56,0%)
Não informado	n = 06 (6,60%)

Pacientes com LMC (n = 91). Grupo Controle (indivíduos saudáveis) (n = 20). Outras: comerciante, professor, militar, vigilante, costureira, cozinheiro, digitador e outras, cada uma presente em menos de 5 pacientes.

A respeito dos scores de risco, dos 91 pacientes com LMC incluídos no estudo, foi possível determinar os scores de risco Sokal, Hasford, Eutos e ELTS de 79 pacientes (Tabela 5).

Tabela 5 – Determinação dos scores de risco dos pacientes com LMC: Sokal, Hasford, Eutos e ELTS nos pacientes com LMC

Risco	Sokal	Hasford	Eutos	ELTS	Média
Baixo	32 (35,2%)	42 (46,1%)	69 (75,8%)	33 (36,3%)	44 (48,3%)

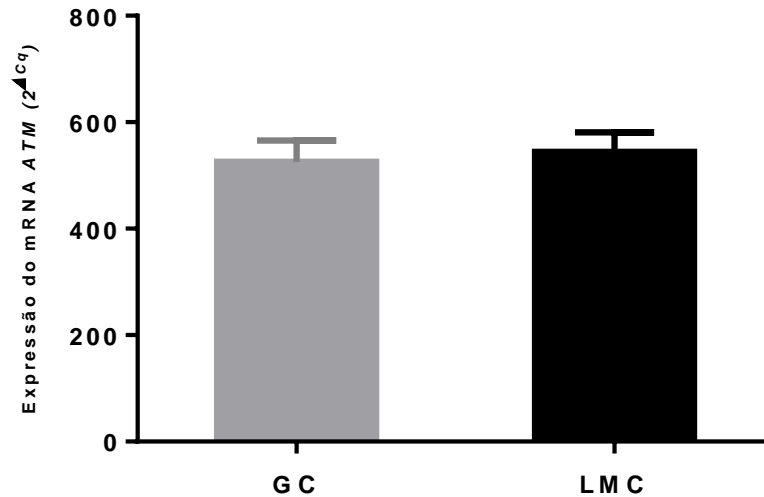
Intermediário	21 (23,0%)	27 (29,7%)	NA	24 (26,4%)	18 (19,8%)
Alto	26 (28,6%)	10 (11,0%)	10 (11,0%)	22 (24,1%)	17 (18,7%)
Sem informação	12 (13,2%)	12 (13,2%)	12 (13,2%)	12 (13,2%)	12 (13,2%)

Pacientes com LMC (n = 91). Os resultados foram expressos em n (%). NA: não se aplica.

4.2 Expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC e grupo controle utilizando qPCR

As comparações da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC e GC estão descritas nos Gráficos 1 a 4. Pacientes com LMC apresentaram níveis mais elevados da expressão do gene *ATM* em comparação ao GC, no entanto, não houve diferença estatística ($p = 0,4972$), as médias \pm desvio padrão foram $544,60 \pm 36,46$ (n = 78) e $525,80 \pm 39,93$ (n = 20), respectivamente (Gráfico 1).

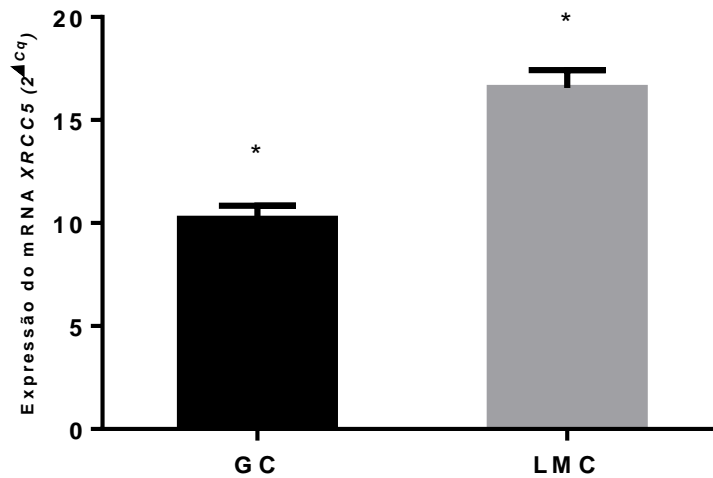
Gráfico 1 – Nível de expressão do gene *ATM* em pacientes com LMC e GC ($p = 0,4972$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC (n=78) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. * $p=0,4972$. Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene *XRCC5* nos pacientes com LMC e GC apresentou-se estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), com o grupo de pacientes ($16,56 \pm 0,8728$; n = 87) apresentando níveis mais elevados do *XRCC5* em relação ao GC ($10,20 \pm 0,6382$; n = 19) (Gráfico 2).

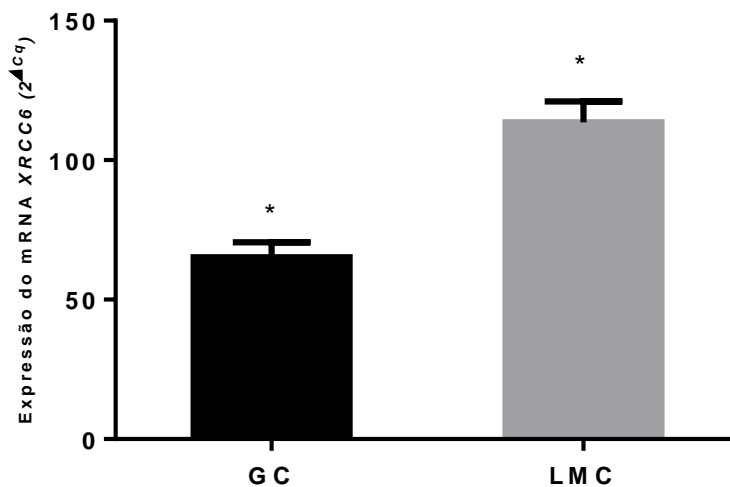
Gráfico 2 – Nível de expressão do gene *XRCC5* em pacientes com LMC e GC (* $p < 0,0001$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *XRCC5* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC (n=87) e grupo controle (GC) (n=19). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. * $p < 0,0001$. Fonte: Do próprio autor.

De forma similar ao gene *XRCC5*, a comparação da expressão do gene *XRCC6* nos pacientes com LMC e GC apresentou-se estatisticamente significativa ($p = 0,0034$), com níveis mais elevados de *XRCC6* no grupo de pacientes com LMC ($113,50 \pm 7,544$; n = 91) em relação ao GC ($65,18 \pm 5,445$; n = 20) (Gráfico 3).

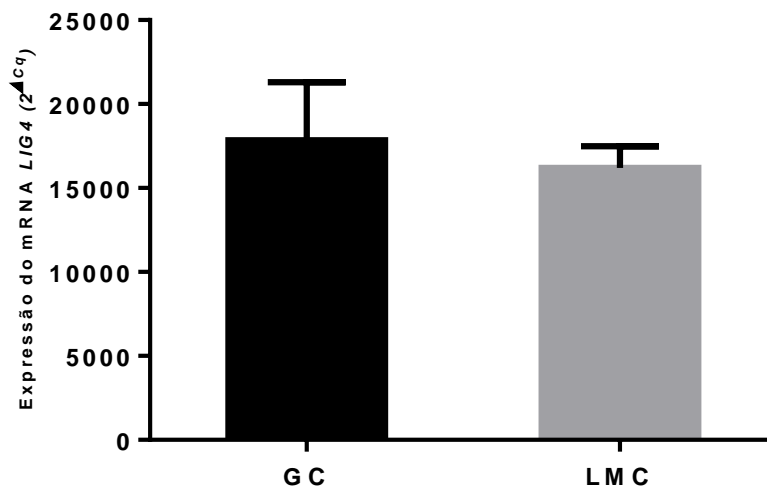
Gráfico 3 – Nível de expressão do gene *XRCC6* em pacientes com LMC e GC (* $p = 0,0034$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *XRCC6* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC (n=91) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. * $p = 0,0034$. Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene *LIG4* nos pacientes com LMC e GC não apresentou diferença estatística, no entanto pacientes com LMC apresentaram níveis mais baixos da expressão do gene *LIG4* em comparação com o GC, as médias \pm desvio padrão foram 16198 ± 1282 (n = 87) e 17843 ± 2466 (n = 20), respectivamente (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Nível de expressão do gene *LIG4* em pacientes com LMC e GC ($p = 0,9792$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *LIG4* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC (n=87) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. * $p=0,9792$. Fonte: Do próprio autor.

4.3 Expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes dos grupos LMC D, LMC G1, LMC G2 e GC, utilizando qPCR

Os pacientes com LMC foram estratificados em três grupos: LMC D (n = 6), LMC G1 (n = 59) e LMC G2 (n = 26), e comparados entre si e com o GC (n = 20). As comparações da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA entre todos os grupos estão descritas nas Tabelas 6 a 9 e ilustradas nos Gráficos 5 a 8. A Tabela 6 descreve a comparação da expressão do gene *ATM* nos referidos grupos.

Tabela 6 – Comparação da expressão do gene *ATM* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

Comparação entre os grupos	Média \pm desvio padrão	Valor de p
GC versus LMC D	525,80 \pm 39,93 versus 1459,0 \pm 633,50	* $p < 0,001$
GC versus LMC G1	525,80 \pm 39,93 versus 678,70 \pm 60,31	$p > 0,05$
GC versus LMC G2	525,80 \pm 39,93 versus 456,60 \pm 69,72	$p > 0,05$
LMC D versus LMC G1	1459,0 \pm 633,50 versus 678,70 \pm 60,31	* $p < 0,01$

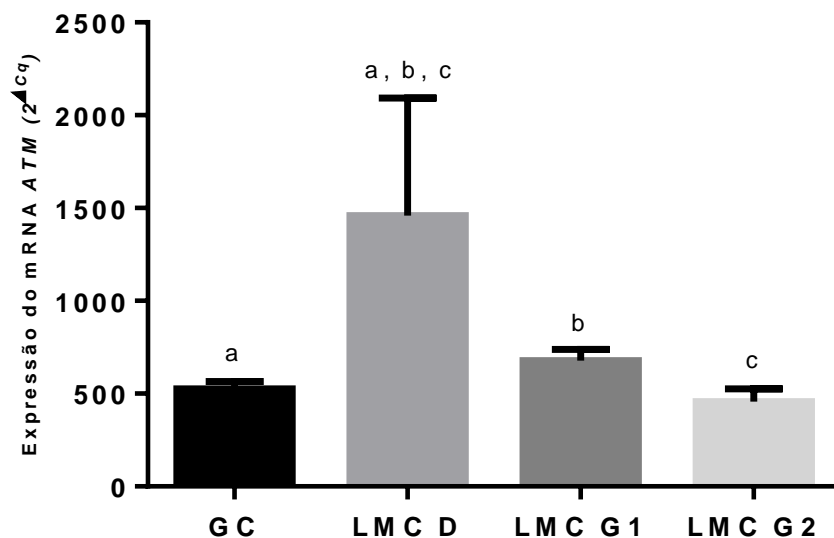
LMC D versus LMC G2	1459,0 ± 633,50 versus 456,60 ± 69,72	* $p < 0,001$
LMC G1 versus LMC G2	678,70 ± 60,31 versus 456,60 ± 69,72	$p > 0,05$

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

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

O grupo de pacientes com LMC ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) apresentou níveis de expressão do gene *ATM* mais elevados em comparação com os demais grupos. Foi verificada diferença estatística nas seguintes comparações: LMC D versus LMC GC, LMC D versus LMC G1 e LMC D versus LMC G2 (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Nível de expressão do gene *ATM* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 ($p = 0,0003$).



^a $p < 0,001$ na comparação LMC D x GC

^b $p < 0,01$ na comparação LMC D x LMC G1

^c $p < 0,001$ na comparação LMC D x LMC G2

Nota: Comparação de médias ± desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=4), tratados com ITK 1ª geração (LMC G1) (n=47), ITK 2ª geração (LMC G2) (n=19) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. ^{a,b,c} $p=0,0003$ na comparação de LMC D com todos os grupos. Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene *XRCC5* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação da expressão do gene *XRCC5* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

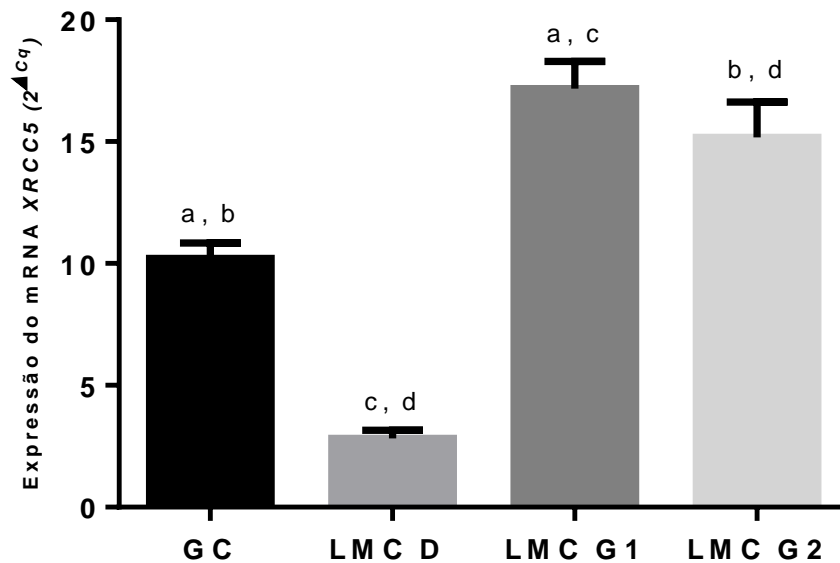
Comparação entre os grupos	Média ± desvio padrão	Valor de <i>p</i>
GC versus LMC D	10,20 ± 0,6382 versus 2,83 ± 0,3360	<i>p</i> > 0,05
GC versus LMC G1	10,20 ± 0,6382 versus 17,18 ± 1,1180	* <i>p</i> < 0,001
GC versus LMC G2	10,20 ± 0,6382 versus 15,18 ± 1,4510	* <i>p</i> < 0,05
LMC D versus LMC G1	2,83 ± 0,3360 versus 17,18 ± 1,1180	* <i>p</i> < 0,01
LMC D versus LMC G2	2,83 ± 0,3360 versus 15,18 ± 1,4510	* <i>p</i> < 0,05
LMC G1 versus LMC G2	678,70 ± 60,31 versus 15,18 ± 1,4510	<i>p</i> > 0,05

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Valor de *p* obtido através do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

Pacientes com LMC em tratamento com ITK de primeira (LMC G1) e segunda (LMC G2) geração apresentaram valores mais elevados de expressão do gene *XRCC5* quando comparados com os pacientes ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) e GC. Ambas as comparações foram estatisticamente significantes (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Nível de expressão do gene *XRCC5* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 (^{a,b,c,d}*p* < 0,05).



^a*p* < 0,001 na comparação GC x LMC G1

^b*p* < 0,05 na comparação GC x LMC G2

^c*p* < 0,01 na comparação LMC D x LMC G1

^d*p* < 0,05 na comparação LMC D x LMC G2

Nota: Comparação de médias ± desvio padrão da expressão do mRNA do gene *XRCC5* (2^{ΔCq}) de pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=3), tratados com ITK 1^a geração (LMC G1) (n=46), ITK 2^a geração (LMC G2) (n=21) e grupo controle (GC) (n=19). Valor de *p* obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. ^{a,b,c,d}*p* < 0,05. Fonte: Do próprio autor.

A Tabela 8 descreve a comparação da expressão do gene *XRCC6* nos grupos: GC, LMC

D, LMC G1 e LMC G2.

Tabela 8 – Comparação da expressão do gene *XRCC6* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

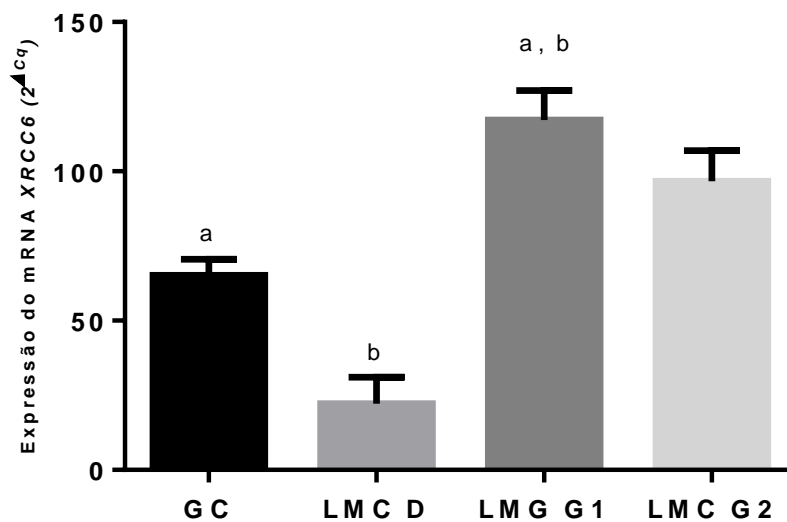
Comparação entre os grupos	Média ± desvio padrão	Valor de <i>p</i>
GC versus LMC D	65,18 ± 5,445 versus 22,18 ± 8,912	<i>p</i> > 0,05
GC versus LMC G1	65,18 ± 5,445 versus 117,20 ± 9,895	* <i>p</i> < 0,01
GC versus LMC G2	65,18 ± 5,445 versus 96,74 ± 10,15	<i>p</i> > 0,05
LMC D versus LMC G1	22,18 ± 8,912 versus 117,20 ± 9,895	* <i>p</i> < 0,05
LMC D versus LMC G2	22,18 ± 8,912 versus 96,74 ± 10,15	<i>p</i> > 0,05
LMC G1 versus LMC G2	117,20 ± 9,895 versus 96,74 ± 10,15	<i>p</i> > 0,05

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

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

Pacientes com LMC em tratamento com ITK de primeira geração (LMC G1) apresentaram valores estatisticamente mais elevados de expressão do gene *XRCC6* em relação os pacientes ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) e GC. As demais comparações não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, no entanto, assim como no *XRCC5*, pacientes do grupo LMC G2 apresentaram expressão do *XRCC6* mais elevada em relação aos grupos LMC D e GC (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Nível de expressão do gene *XRCC6* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 (^{a,b}*p* < 0,05).



^a*p* < 0,01 na comparação GC x LMC G1

^b*p* < 0,05 na comparação LMC D x LMC G1

Nota: Comparação de médias ± desvio padrão da expressão do mRNA do gene *XRCC6* (2^{ΔCq}) de pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=3), tratados com ITK 1^a geração (LMC G1) (n=49), ITK 2^a geração (LMC G2)

(n=22) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. ^{a,b} $p < 0,05$. Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 está descrita na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2.

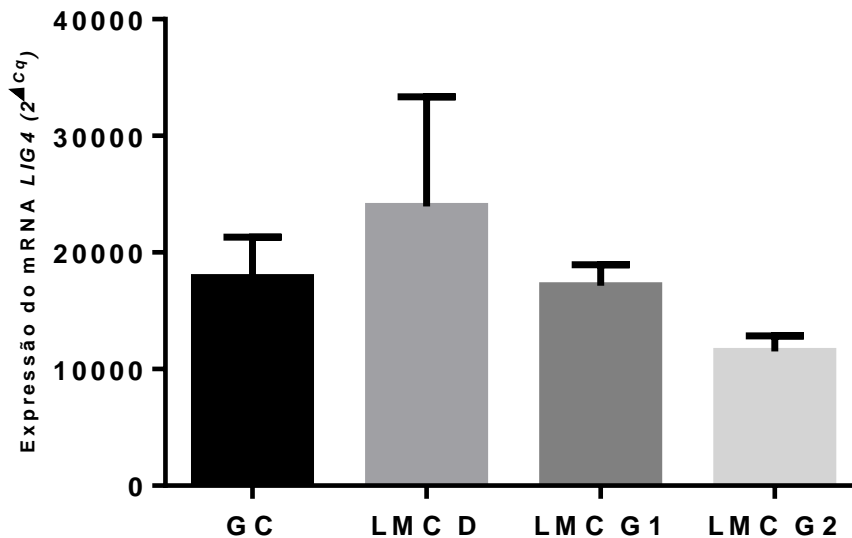
Comparação entre os grupos	Média ± desvio padrão	Valor de p
GC versus LMC D	17843 ± 3466 versus 23949 ± 9394	$p > 0,05$
GC versus LMC G1	17843 ± 3466 versus 17143 ± 1810	$p > 0,05$
GC versus LMC G2	17843 ± 3466 versus 11503 ± 1337	$p > 0,05$
LMC D versus LMC G1	23949 ± 9394 versus 17143 ± 1810	$p > 0,05$
LMC D versus LMC G2	23949 ± 9394 versus 11503 ± 1337	$p > 0,05$
LMC G1 versus LMC G2	17143 ± 1810 versus 11503 ± 1337	$p > 0,05$

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

Valor de p obtido através do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

Não foi verificada diferença estatística na comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos do presente estudo (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Nível de expressão do gene *LIG4* nos grupos: GC, LMC D, LMC G1 e LMC G2 ($p = 0,3697$).



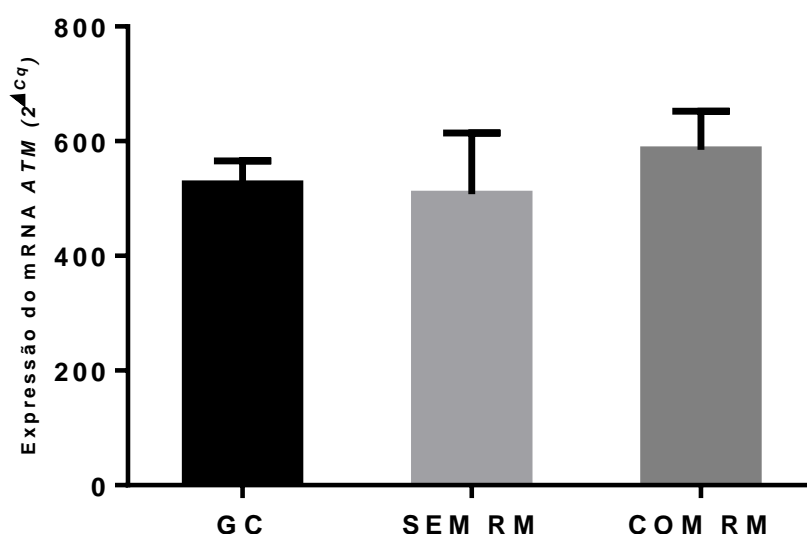
Nota: Comparação de médias ± desvio padrão da expressão do mRNA do gene *LIG4* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC sem tratamento (LMC D) (n=4), tratados com ITK 1ª geração (LMC G1) (n=48), ITK 2ª geração (LMC G2) (n=19) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de p obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. $p=0,3697$. Fonte: Do próprio autor.

4.4 Comparação da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA quanto ao nível de resposta molecular em pacientes com LMC em uso de imatinibe e grupo controle

Os pacientes com LMC em uso de imatinibe foram estratificados em dois grupos quanto ao nível de resposta molecular (RM) e comparados com o GC. Àqueles que obtiveram RM maior e RM profunda foram incluídos no grupo COM RM, os que não atingiram RM foram incluídos no grupo SEM RM.

O Gráfico 9 apresenta a comparação da expressão do gene *ATM* nos grupos: GC, SEM RM e COM RM. Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações realizadas ($p = 0,7096$). Os valores de média \pm desvio padrão foram, respectivamente, $525,80 \pm 39,93$ ($n = 20$), $508,0 \pm 106,50$ ($n = 12$) e $584,90 \pm 67,78$ ($n = 27$).

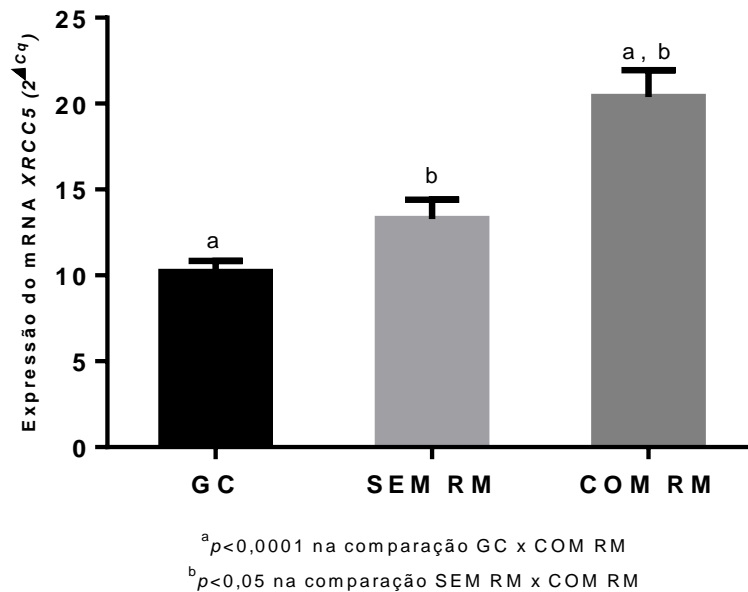
Gráfico 9 – Comparação da expressão do gene *ATM* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM ($p = 0,7096$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* ($2^{-\Delta Cq}$) de pacientes com LMC em uso de imatinibe sem remissão molecular (SEM RM) ($n=12$), com remissão molecular (COM RM) ($n=27$) e grupo controle (GC) ($n=20$). Valor de p obtido através do teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. $p=0,7096$. Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene *XRCC5* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM está ilustrada no Gráfico 10. Pacientes do grupo COM RM ($20,38 \pm 1,567$; $n = 24$) apresentaram valores estatisticamente mais elevados em relação aos pacientes dos grupos GC ($10,20 \pm 0,6382$; $n = 20$) e SEM RM ($13,28 \pm 1,127$; $n = 11$).

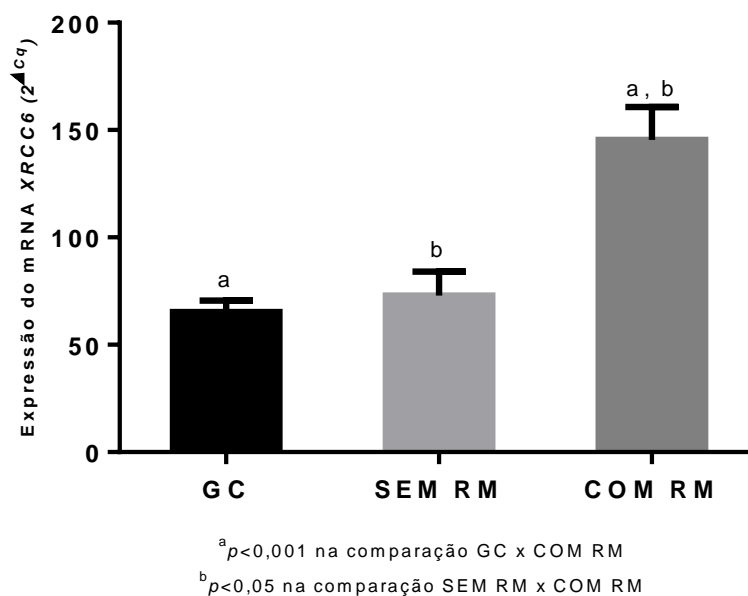
Gráfico 10 – Comparação da expressão do gene *XRCC5* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM (^{a,b} $p < 0,0001$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* (2^{ΔCq}) de pacientes com LMC em uso de imatinibe sem remissão molecular (SEM RM) (n=11), com remissão molecular (COM RM) (n=24) e grupo controle (GC) (n=19). Valor de p obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. $p=0,3697$. Fonte: Do próprio autor. $p < 0,0001$. Fonte: Do próprio autor.

O Gráfico 11 ilustra a comparação da expressão do gene *XRCC6* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM.

Gráfico 11 – Comparação da expressão do gene *XRCC6* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM (^{a,b} $p < 0,0001$).

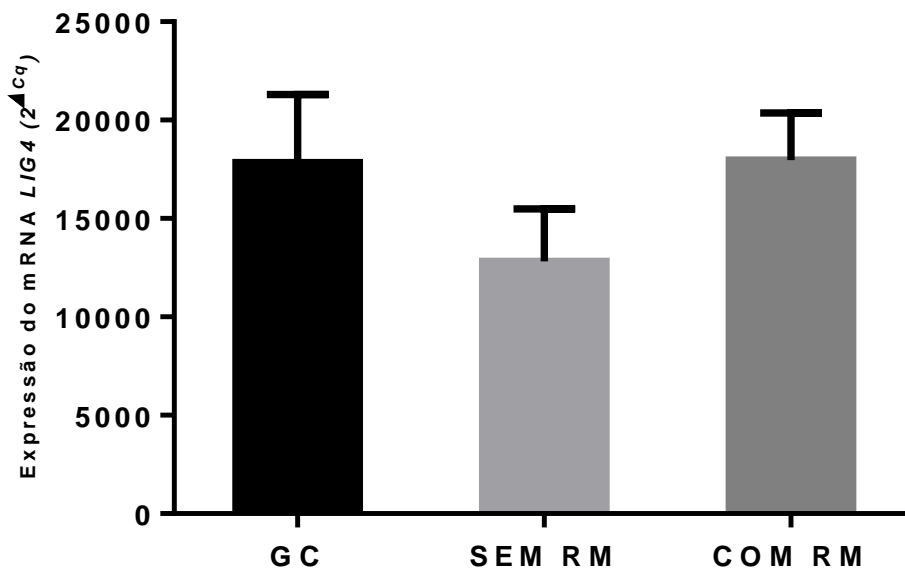


Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC em uso de imatinibe sem remissão molecular (SEM RM) (n=11), com remissão molecular (COM RM) (n=28) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de *p* obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. $p < 0,0001$. Fonte: Do próprio autor.

Similarmente aos resultados da expressão do gene *XRCC5*, pacientes do grupo COM RM ($145,40 \pm 15,40$; $n = 28$) apresentaram valores mais elevados do gene *XRCC6* em relação aos pacientes dos grupos GC ($65,18 \pm 5,445$; $n = 20$) e SEM RM ($72,99 \pm 11,08$; $n = 11$). Esses resultados foram estatisticamente significantes.

O Gráfico 12 apresenta a comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos: GC, SEM RM e COM RM. Não houve diferença estatisticamente significativa nas comparações realizadas ($p = 0,5928$). Os valores de média \pm desvio padrão foram, respectivamente, 17843 ± 3466 ($n = 20$), 12813 ± 2683 ($n = 10$) e 17977 ± 2395 ($n = 28$).

Gráfico 12 – Comparação da expressão do gene *LIG4* em pacientes com LMC em uso de imatinibe nos grupos: GC, SEM RM e COM RM ($p = 0,5928$).



Nota: Comparação de médias \pm desvio padrão da expressão do mRNA do gene *ATM* ($2^{\Delta Cq}$) de pacientes com LMC em uso de imatinibe sem remissão molecular (SEM RM) (n=10), com remissão molecular (COM RM) (n=28) e grupo controle (GC) (n=20). Valor de *p* obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. $p = 0,5928$. Fonte: Do próprio autor.

4.5 Comparação da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA em pacientes com LMC com o risco (baixo, intermediário e elevado) dos scores de risco (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS)

A comparação da expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* com o risco (baixo, intermediário e alto) dos scores de risco foi realizada, no entanto não foram encontrados resultados estatisticamente significantes nas comparações realizadas. A Tabela 10 apresenta as médias \pm desvio padrão da expressão de genes relacionados ao reparo do DNA entre os grupos analisados e o valor de *p*.

Tabela 10 – Expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* de acordo com o risco (baixo, intermediário e alto) dos scores Sokal, Hasford, Eutos e ELTS.

Genes/ Scores de Risco	RISCO			Valor de <i>p</i>	
	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO		
<i>ATM</i>	Sokal	564,20 \pm 76,61	585,40 \pm 88,95	501,90 \pm 69,73	<i>p</i> > 0,05
	Hasford	600,40 \pm 68,18	374,00 \pm 41,04	607,60 \pm 99,29	
	Eutos	501,90 \pm 42,71	Não se aplica	520,20 \pm 53,61	
	ELTS	379,20 \pm 51,26	581,90 \pm 68,04	486,40 \pm 34,15	
<i>XRCC5</i>	Sokal	18,32 \pm 2,14	14,87 \pm 1,14	14,26 \pm 1,46	<i>p</i> > 0,05
	Hasford	15,92 \pm 1,32	16,44 \pm 1,68	12,46 \pm 2,07	
	Eutos	14,93 \pm 0,86	Não se aplica	14,94 \pm 2,71	
	ELTS	14,38 \pm 1,18	16,29 \pm 1,64	15,18 \pm 1,79	
<i>XRCC6</i>	Sokal	135,50 \pm 18,37	103,40 \pm 14,25	99,82 \pm 11,23	<i>p</i> > 0,05
	Hasford	106,50 \pm 12,34	119,80 \pm 13,31	86,90 \pm 14,65	
	Eutos	105,80 \pm 8,66	Não se aplica	128,60 \pm 23,76	
	ELTS	103,00 \pm 13,36	128,70 \pm 18,87	104,60 \pm 12,08	
<i>LIG4</i>	Sokal	18329 \pm 1980	12819 \pm 2546	13209 \pm 2079	<i>p</i> > 0,05
	Hasford	14720 \pm 1802	16637 \pm 2752	17623 \pm 2899	
	Eutos	16062 \pm 1560	Não se aplica	12777 \pm 1534	
	ELTS	15656 \pm 1996	17261 \pm 2855	13785 \pm 2325	

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. 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, de acordo com a normalidade dos dados. Nas comparações múltiplas foi realizado o pós-teste de Tukey para análises no Anova e de Dunn's para o teste de Kruskal–Wallis. *p*>0,05. Fonte: Do próprio autor.

5 DISCUSSÃO

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa que se manifesta 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).

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 por conta das 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 têm reportado a mediana de idade variando de 41 a 47 anos (CID *et al.*, 2013; PETROLA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013; MAIA-FILHO *et al.*, 2018).

Quando se avaliou a ocupação dos pacientes com LMC do presente estudo, verificou-se uma maior frequência da realização de atividades agrícolas (22,0%), seguida de atividades domésticas (15,4%). Trabalhos na literatura sugerem que a exposição a pesticidas relaciona-se com efeitos adversos à saúde, uma vez que ocorre aumento de estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumento de lesões no DNA (ALLEVA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2007; KOURETAS, TSATSAKIS, 2013). Desse modo, as espécies reativas de oxigênio podem desempenhar um importante papel na patogênese de disfunções neurológicas, endocrinológicas e outras disfunções metabólicas, danificando a defesa dos antioxidantes, podendo ser um fator de risco para câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (LEDDA, *et al.*, 2021; LEDDA *et al.*, 2017; ABDOLLAHI *et al.*, 2004). Ademais, o acúmulo de estresse oxidativo pode danificar macromoléculas biológicas, como RNA, DNA, proteínas de reparo e outras proteínas (TSITSIMPIKOU *et al.*, 2013; ZEPEDA-ARCE *et al.*, 2017).

Sobre a ocupação dos pacientes com atividades domésticas, a literatura reforça que a exposição crônica a agentes químicos é fator de risco para o desenvolvimento de lesões no DNA e o surgimento de doenças. O hipoclorito de sódio (água clorada), por exemplo, pode causar lesões diretas ao DNA e tem sido associado à carcinogênese (OHNISHI; MURATA; KAWANISHI, 2002).

Nesse contexto, a presente investigação hipotetiza que a exposição a substâncias utilizadas nas atividades agrícolas e domésticas poderiam contribuir para a gênese da LMC nos pacientes, uma vez a literatura sugere que a LMC é uma doença adquirida (CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996). No entanto, não se sabe a real parcela de contribuição da exposição a essas substâncias no surgimento da LMC, uma vez que o grau de dano gerado depende da toxicidade intrínseca das substâncias, estado de saúde e sensibilidade individuais (MACHADO; MARTINS, 2018).

O controle do ciclo celular apresenta diversos mecanismos regulatórios envolvidos, entre eles, um dos principais são os chamados pontos de verificação, que freiam o processo de duplicação anormal do DNA. A ocorrência do estresse genotóxico ativa os chamados pontos de verificação, que bloqueiam o ciclo celular, permitindo assim, a correção dos erros durante a replicação e o reparo do DNA. Após a correção dos erros, ocorre uma atenuação dos pontos de verificação e o reinício do ciclo celular. No entanto, caso o dano ao DNA não seja reparado, pode ocorrer senescência ou apoptose ou, ainda, as células poderiam continuar se dividindo, mesmo com o DNA alterado. Logo, os mecanismos envolvidos nos pontos de verificação são cruciais para manter a integridade genética (WANG *et al.*, 2015; SHILOH, 2003)

Os pontos de verificação de danos ao DNA apresentam sensores, transdutores e efetores. A ataxia telangiectasia-mutada (*ATM*), ataxia telangiectasia e Rad3-related (*ATR*) e DNA-PK são considerados transdutores ou mediadores, e seus principais transdutores a jusante envolvidas no controle do ciclo celular são as quinases de pontos de verificação (*Chk1* e *Chk2*) e *p53*, que regulam vários efetores de substrato e propagam o sinal do ponto de verificação. Sabe-se que *ATM* responde, principalmente, à DFDs ao DNA (BARTEK; LUKAS, 2007; FALCK; COATES; JACKSON, 2005).

Ao avaliarmos a expressão do gene *ATM* nos pacientes com LMC e GC não verificamos diferença estatística, no entanto ao se estratificar o grupo de pacientes com LMC em LMC D, LMC G1 e LMC G2, verificamos um aumento estatisticamente significativo de *ATM* em pacientes ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) em comparação com os demais grupos do estudo.

Sabe-se que a *ATM* é uma quinase que controla os pontos de verificação G1/S e G2/M, e faz parte de um eixo que regula a resposta ao dano no DNA e controla a transformação maligna, eixo *ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53-p21*. Dados na literatura têm relatado que o comprometimento de componentes do eixo supracitado prejudica a resposta ao dano e facilita a tumorigênese. Além disso, a depleção de *ATM* mediada por siRNA (RNA interferente curto)

específico tem sido associada à inibição da senescência induzida por oncogene (BARTKOVA *et al.*, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015).

As vias ATM-Chk2 e ATR-Chk1 são as principais vias de pontos de verificação em resposta ao dano no DNA e estão ativadas nos estágios iniciais de vários tipos de câncer. Bartkova *et al.* (2005) relataram que no câncer de bexiga humana e nos cânceres iniciais de mama e cólon houve ativação constitutiva da via ATM-Chk2. Além disso, outro trabalho relatou uma expressão elevada de ATM e Chk2 em neoplasias intraepiteliais da próstata em comparação com próstata normal (FAN *et al.*, 2006). Esses estudos sugerem que ocorre uma elevada ativação das vias de resposta ao dano no DNA nos estágios iniciais de neoplasias malignas humanas, o que corrobora com nossos achados, ao evidenciarmos um aumento da expressão do gene *ATM* no grupo de pacientes LMC D.

A LMC apresenta como característica citogenética principal a presença do cromossomo Ph (gene *BCR-ABL*), que codifica uma oncoproteína p^{210} BCR-ABL. Acredita-se que o *ABL* tenha um papel na transmissão de sinais pró-apoptóticos de *ATM* para p53, ou seja, *ABL* desempenharia uma função no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (WANG *et al.*, 2015). A LMC apresenta uma mutação no gene *ABL* e, conseqüentemente, um quadro de instabilidade genômica (KANG *et al.*, 2016). Logo, não se sabe até que ponto o *ABL* interferiria na expressão do gene *ATM*, o que poderia estar associado ao aumento da expressão do *ATM* nos pacientes do grupo LMC D do presente estudo .

Ao analisarmos a expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* nos grupos do presente trabalho, os resultados encontrados foram semelhantes para ambos os genes. No caso do gene *XRCC5*, houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão em pacientes dos grupos LMC G1 e LMC G2 em relação aos pacientes ao diagnóstico/sem tratamento (LMC D) e GC. Os resultados para o *XRCC6* diferem apenas na comparação: LMC G2 *versus* GC e LMC G2 *versus* LMC D, que não houve diferença estatística, mesmo os níveis de expressão do gene *XRCC6* apresentando-se bem elevados em relação aos grupos LMC D e GC.

O gene *XRCC5* codifica uma proteína em humanos denominada Ku80, que junto com a proteína Ku70, codificada pelo gene *XRCC6*, conformam um heterodímero denominado proteína Ku, que se liga as extremidades da dupla fita de DNA que foi cortado, sendo requerida para o processo de recombinação não homóloga durante a reparação do DNA. Trabalhos na literatura reforçam que Ku80 apresenta um papel na manutenção da integridade do genoma por um mecanismo que envolve a supressão de rearranjos cromossômicos (DIFILIPPANTONIO *et al.*, 2000). Adicionalmente, a capacidade hiperativa de reparo do DNA da proteína Ku70

associada à JENH encontradas em células de pacientes com LMC está correlacionada com a ocorrência de aberrações cromossômicas, especialmente com a instabilidade do genoma durante a progressão da doença. Esses achados sugerem que o mecanismo de reparo JENH podem desempenhar um importante papel na evolução da LMC (CHEN *et al.*, 2007).

Um estudo recente realizado por Maia-Filho *et al.* (2018) avaliou, na mesma população do presente estudo, o índice de dano (ID) no DNA em pacientes com LMC e em um grupo controle. Ao se estratificar os pacientes com LMC em três grupos, ao diagnóstico, em uso de ITK de primeira geração e em uso de ITK de segunda geração, e compará-los entre si e com o grupo controle, evidenciou-se um aumento estatisticamente significativo do ID no DNA de pacientes em uso de ITK de primeira e segunda geração, em relação ao demais grupos. Resultado esse que, segundo o autor, corrobora com a hipótese de que os ITK apresentam maior dano, provavelmente pelo maior acúmulo de estresse oxidativo. PETROLA *et al.* (2012) demonstrou um maior estresse oxidativo no grupo de pacientes em uso de ITK de segunda geração ao comparar com o grupo de pacientes em uso de ITK de primeira geração, o que reforça o aumento das lesões no grupo em uso de nilotinibe e dasatinibe.

Nesse contexto, inferimos que o aumento no nível de expressão do gene *XRCC5* em pacientes em uso de ITK de primeira e segunda geração, corresponde, provavelmente, a um potencial marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com LMC, uma vez que o aumento da expressão deste gene pode estar relacionado a uma maior reparação do DNA mediada pelo mecanismo de reparo JENH, na tentativa de corrigir o elevado número de lesões identificadas nesse grupo de pacientes (DIFILIPPANTONIO *et al.*, 2000).

Ademais, o gene *XRCC6* apresentou resultados semelhantes aos encontrados no gene *XRCC5*, o que já era esperado, uma vez que esses genes codificam proteínas que formam o heterodímero Ku 70/80, responsável por aumentar a atividade quinase da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs). Ku e DNA-PKcs desempenham um importante papel no reparo de DFDs no DNA *in vivo* e também podem desempenhar um papel na regulação da transcrição (CHAN *et al.*, 1999). FU e *et al.* (2008) ao investigar a expressão do gene *XRCC6* em células de pacientes com LMC em diferentes estágios clínicos e revelar a correlação entre a expressão do gene *XRCC6*, da proteína Ku70 e do *BCR*, evidenciou que o gene *XRCC6* está significativamente mais elevado em pacientes com LMC quando comparado com indivíduos saudáveis. Adicionalmente, o nível de expressão na fase blástica foi marcadamente maior do que na fase crônica. Houve também uma correlação positiva entre a expressão do gene *XRCC6* e da proteína Ku70 (FU *et al.*, 2008).

A JENH depende de Ku70 e Ku80 para se ligar ao DNA e, assim, melhorar a afinidade dos componentes enzimáticos de JENH que consistem em enzimas do tipo polimerase, nuclease e ligase (complexo *XRCC4-LIG4*). O gene *LIG4*, localizado nos cromossomos humanos 13q33-34, é um componente importante do processo de reparo e atua de forma complexa com a enzima de complementação cruzada de raios X 4 (*XRCC4*), promovendo uma ligadura final no ponto de quebra da fita do DNA. Nesse contexto, a perda de *LIG4* ou *XRCC4* poderia comprometer o mecanismo de reparo JENH e contribuir para uma instabilidade genômica e tumorigênese (PANNUNZIO; WATANABE; LIEBER, 2018; LIEBER, 2010; XIE *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, não houve diferença estatística na comparação da expressão do gene *LIG4* nos grupos. São escassos na literatura os trabalhos que estudem o comportamento do gene *LIG4* na LMC. Além disso, não se tem relato sobre uma possível interferência do gene *BCR-ABL* e dos ITK na expressão do *LIG4*. Alguns trabalhos na literatura têm analisado a relação de polimorfismos do gene *LIG4* com o risco de desenvolvimento de câncer, no entanto os resultados são conflitantes. XIE *et al.* (2014) realizaram uma metanálise através de uma análise de 17 artigos obtidos de base de dados relevantes, como o PubMed, Web of Science, Ovid e Embase, com o objetivo de identificar a relevância dos polimorfismos do gene *LIG4* com a suscetibilidade ao câncer. No geral, os resultados sugeriram que não havia relevância óbvia dos polimorfismos analisados (rs1805388 e rs1805386) com o risco de desenvolvimento de câncer (XIE *et al.*, 2014).

Desse modo, a doença e o tratamento com ITK parecem não exercer influência sobre a expressão do gene *LIG4* nos pacientes. Logo, hipotetizamos que o *LIG4* parece não exercer um papel como potencial marcador de prognóstico em pacientes com LMC.

Os pacientes com LMC em uso de imatinibe foram estratificados em dois grupos quanto ao nível de resposta molecular (RM) e comparados com o GC. Realizamos a análise apenas com o imatinibe em virtude do tamanho do grupo, que permitiu a estratificação e a realização das análises estatísticas. Ademais, a maioria dos pacientes em uso de ITK de segunda geração apresenta, em virtude da maior portência desses medicamentos em comparação com o imatinibe, remissão molecular maior ou profunda, ou seja, teríamos poucos pacientes no grupo SEM RM em uso de ITK de segunda geração.

Ao compararmos a expressão dos genes relacionados ao reparo do DNA quanto à RM, os genes *ATM* e *LIG4* não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. No entanto, as comparações dos genes *XRCC5* e *XRCC6* apresentaram-se estatisticamente significantes, em ambos os grupos houve um aumento da expressão dos genes no grupo COM RM em relação

aos demais. Esses achados sugerem que o imatinibe provavelmente exerce influência sobre a expressão dos referidos genes, aumentando a expressão dos mesmos, e estão de acordo com os resultados do presente estudo citados anteriormente, o qual o grupo de pacientes em uso de imatinibe teve um aumento na expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* em relação aos pacientes ao diagnóstico e grupo controle.

O tratamento da LMC mudou desde a introdução do mesilato de imatinibe. O gene *BCR-ABL* resultante tem atividade tirosino-quinase que estimula o crescimento celular e o imatinibe atua como uma terapia alvo contra o *BCR-ABL*, inibindo sua atividade tirosino-quinase. No entanto, embora os ITK sejam terapia padrão para os pacientes com LMC em todo mundo, já se sabe que esses medicamentos apresentam diversos efeitos adversos e são potencialmente capazes de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que aumentaria as lesões no DNA e, conseqüentemente, elevaria a expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* no grupo de pacientes COM RM, que sofre ação direta do imatinibe (FUNKE *et al.*, 2005).

Adicionalmente, sabe-se que pacientes em RM apresentam níveis muito baixos ou indetectáveis do gene *BCR-ABL*. Nesse caso, no grupo de pacientes COM RM subtrai-se a influência direta da doença, uma vez que o *BCR-ABL* encontra-se suprimido, e evidencia-se de forma mais clara a influência do ITK de primeira geração (imatinibe), reforçando assim, a nossa hipótese.

Os escores de risco são sistemas de prognóstico calculados aritmeticamente a partir de dados clínicos e hematológicos simples ao diagnóstico. Sokal, Hasford e Eutos estimam o risco de sobrevida no início do tratamento, visando individualizar grupos em risco baixo, intermediário e alto. Esses escores de risco foram projetados para avaliar diferenças na sobrevida ou resposta (HOCHHAUS *et al.*, 2020).

Os índices mais utilizados são o escores proposto por Sokal *et al.* (1984) em pacientes que usavam Hidroxiuréia ou Bussulfan, e o proposto por Hasford *et al.* (1998) em paciente que usavam interferon. O escore Eutos foi proposto em pacientes que usavam o imatinibe, o primeiro ITK, e é capaz de prever a probabilidade do paciente alcançar remissão citogenética completa em 18 meses, a qual é o principal marcador de sobrevida nos pacientes com LMC. Até o momento, não há evidência de que qualquer um dos três escores de risco seja superior ou mais conveniente (BACCARANI *et al.*, 2009). Atualmente, como a maioria dos pacientes com LMC morre de outras causas além da leucemia enquanto ainda estão em remissão, foi criado um quarto escore de risco, o ELTS, que foi desenvolvido para prever a probabilidade do paciente morrer de LMC (PFIRRMANN *et al.*, 2016; GEELEN *et al.*, 2018; CASTAGNETTI

et al., 2018).

Em nosso estudo, não houve associação da expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* quanto ao risco baixo, intermediário e alto dos escores de risco (Sokal, Hasford, Eutos e ELTS) dos pacientes com LMC. Esses escores avaliam o prognóstico e a resposta ao tratamento dos pacientes, no entanto, assim como outros cálculos probabilísticos, são uma estimativa, e não consideram fatores que podem surgir após o diagnóstico, como a não adesão ao tratamento, a falta do medicamento, o surgimento de mutações adicionais e outros, o que poderia explicar a ausência de diferenças estatísticas nas comparações realizadas.

O mecanismo de reparo JENH desempenha um importante papel na evolução da doenças neoplásicas. No entanto, devido a escassez de estudos na literatura que abordem a análise desses genes na LMC, mais estudos são necessários para propor os mecanismos envolvidos e o impacto clínico da alteração na expressão desses genes nos pacientes.

6 CONCLUSÃO

- Os pacientes com LMC apresentaram uma maior prevalência do sexo masculino, a média de idade foi $47,20 \pm 15,30$ anos e as ocupações mais frequentes foram as atividades agrícolas e domésticas; a análise dos escores de risco demonstrou uma maior frequência de pacientes com baixo risco, seguido de risco intermediário e alto risco.
- Pacientes com LMC apresentaram valores elevados de expressão dos genes *XRCC5* e *XRCC6* em relação ao grupo controle.
- O grupo de pacientes ao diagnóstico/sem tratamento apresentou valores elevados de expressão do *ATM* em relação aos demais grupos, sugerindo que *ATM* está aumentando nos estágios iniciais da doença; *XRCC5* e *XRCC6* apresentaram expressão aumentada nos grupos em uso de ITK de primeira e segunda geração, logo, esses genes parecem ser marcadores desfavoráveis de prognóstico; a expressão do *LIG4* não apresentou diferença estatística entre os grupos, o mesmo parece não exercer um papel como potencial marcador de prognóstico em pacientes com LMC.
- Pacientes com LMC em remissão molecular maior e profunda, em uso de imatinibe, apresentaram expressão aumentada dos genes *XRCC5* e *XRCC6*, esse resultado sugere que o imatinibe provavelmente exerce influência sobre a expressão desses genes.
- As comparações da expressão dos genes *ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4* com os riscos dos escores Sokal, Hasford, Eutos e ELTS não apresentaram diferenças estatísticas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mecanismo de reparo JENH desempenha um importante papel na manutenção da integridade do genoma em mamíferos e na evolução das doenças neoplásicas. No entanto, devido a escassez de estudos na literatura que abordem a análise desses genes (*ATM*, *XRCC5*, *XRCC6* e *LIG4*) na LMC, mais estudos são necessários para propor os mecanismos envolvidos e o impacto clínico da alteração na expressão desses genes nos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, Mohammad et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 6, p. 141-147, 2004.
- A LEITNER, A.; HOCHHAUS, A.; C MULLER, M. Current treatment concepts of CML. **Current cancer drug targets**, v. 11, n. 1, p. 31-43, 2011.
- ALLEVA, Renata et al. Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 4, p. 476-487, 2018.
- BACCARANI, M. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of clinical oncology**, 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.
- BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 238-245, 2007.
- 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.
- BARTKOVA, Jirina et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 864-870, 2005.
- BELLI, M.; SAPORA, O.; TABOCCHINI, M. A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. **J. Radiat. Res. (Tokyo)**, v. 43, Suppl., p. S13-19, 2002.
- 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.
- BENNETT, J. H. **Leucocythemia, or White cell blood, in relation to the physiology and pathology of the lymphatic glandular system.** Sutherland&Knox, 1852.
- BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Lett.**, v. 585, n. 11, p.1625-39, 2011.
- BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R. DNA double-strand break signaling and human disorders. **Genome Integr.**, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.

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.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Chronic Myeloide Leukemia: natural history and classification. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 3-7, 2008.

CASTAGNETTI, Fausto et al. The use of EUTOS long-term survival score instead of Sokal score is strongly advised in elderly chronic myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 132, p. 44, 2018.

CHAN, Doug W. et al. DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. **Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1819-1828, 1999.

CHEN, Pei-shuai et al. Study of NHEJ Function and Expression of Protein Ku70 in CML Patients. 2007.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

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. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 6, p. 389-394, 2013.

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.

DEININGER, M. W.; SHAH, N. P.; ALTMAN, J. K.; BERMAN, E. *et al.* Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, 18, n. 10, p. 1385-1415, 10 01 2020.

DIFILIPPANTONIO, M. J.; ZHU, J.; CHEN, H. T.; MEFFRE, E.; NUSSENZWEIG, M. C.; MAX, E. E. et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. **Nature**, v. 404, p. 510-514, 2000.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of clinical investigation**, 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 in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 95-102, 2014.

ETIENNE, Gabriel et al. Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 3, p. 298-305, 2017.

FALCK, Jacob; COATES, Julia; JACKSON, Stephen P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 605-611, 2005

FAN, Catherine et al. ATM activation is accompanied with earlier stages of prostate tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 10, p. 1090-1097, 2006.

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

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

FU, Chengcheng et al. Study of Expression of Ku70 and NHEJ in CML Cells. **Blood**, v. 112, n. 11, p. 3223, 2008.

FUNKE, Vaneuza AM et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 159-165, 2005.

GEARY, C. The story of chronic myeloid leukaemia. **British journal of haematology**, v. 110, n. 1, p. 2-11, 2000.

GEELEN, Inge GP et al. Validation of the EUTOS long-term survival score in a recent independent cohort of “real world” CML patients. **Leukemia**, v. 32, n. 10, p. 2299-2303, 2018.

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 15, p. 1451-1464, 2003.

GORRE, M.; MOHANDAS, P. E.; KAGITA, S.; ANNAMANENI, S.; DIGUMARTI, R.; SATTI, V. Association of XRCC5 VNTR polymorphism with the development of chronic myeloid leukemia. **Tumor Biology**, v. 35, n. 2, p. 923-927, 2014.

HASFORD, J. et al. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon AlfaWriting Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 11, p. 850-859, 1998.

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.

HAYDEN, P. J.; TEWARI, P.; MORRIS, D. W.; STAINES, A.; CROWLEY, D.; NIETERS, A.; COCCO, P. L. Variation in DNA repair genes XRCC3, XRCC4, XRCC5

and susceptibility to myeloma. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 24, p. 3117-3127, 2007.

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

HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M.; SILVER, R. T.; SCHIFFER, C. *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, 34, n. 4, p. 966-984, 04 2020.

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.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 8, p. 620-36, 2013.

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. **American journal of hematology**, v. 91, n. 2, p. 252-265, 2016.

JAZAYERI, A.; FALCK, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J.; SMITH, G.C.; LUKAS, J.; JACKSON, S.P. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. **Nat. Cell Biol.**, v. 8, p. 37–45, 2006.

LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 181, 2010.

KANG, ZJ. *et al.* The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese journal of 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.

KENYON, J.; GERSON, S. L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells **Nucl. Acids Res.**, v. 35, n. 22, p. 7557-7565, 2007.

KOURETAS, Demetrios; TSATSAKIS, Aristidis M. Mechanism Involved in Oxidative Stress Regulation. **Food and chemical toxicology**, v. 61, 2013.

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.

LEDDA, Caterina et al. Non-infective occupational risk factors for hepatocellular carcinoma: A review. **Molecular medicine reports**, v. 15, n. 2, p. 511-533, 2017.

LEDDA, Caterina et al. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers after exposure to pesticides. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2021.

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

LÓPEZ, Olga et al. Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. **Toxicology letters**, v. 171, n. 3, p. 146-153, 2007.

MACHADO, Simone Caetani; MARTINS, Isarita. Risk assessment of occupational pesticide exposure: Use of endpoints and surrogates. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 276-283, 2018.

MAIA FILHO, P. A. et al. Genotoxicity associated with the use of tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 59, n. 3, p. 260-262, 2018.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews 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. **Hematology/oncology clinics of North America**, 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. **British journal of haematology**, v. 92, n. 3, p. 684-686, 1996.

MELO, J. V. et al. Investigation on the role of the ATM gene in chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, v. 15, n. 9, p. 1448-1450, 2001.

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. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 645-654, 2015.

MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M.; JONES, I. M. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. **Mutat. Res.**, v. 526, p. 93-125, 2003.

MUKHERJEE, Sudeshna et al. Sequential loss of cell cycle checkpoint control contributes to malignant transformation of murine embryonic fibroblasts induced by 20-methylcholanthrene. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 1, p. 49-58, 2010.

MYERS, J.; CORTEZ, D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9346-9350, 2006.

NOWELL, C. The minute chromosome (Ph 1) in chronic granulocytic leukemia. **Annals of Hematology**, 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. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003.

OHNISHI, Shiho; MURATA, Mariko; KAWANISHI, Shosuke. DNA damage induced by hypochlorite and hypobromite with reference to inflammation-associated carcinogenesis. **Cancer letters**, v. 178, n. 1, p. 37-42, 2002.

PANNUNZIO, N. R.; WATANABE, G.; LIEBER, M. R. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10512-10523, 2018.

PASTWA, E.; BŁASIAK, J. Non-homologous DNA end joining. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 891-908, 2003.

PERROTTI, D. et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. **The Journal of clinical investigation**, 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. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 34, n. 5, p. 352-355, 2012.

PFIRRMANN, Markus et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 1, p. 48-56, 2016.

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

RAJAEI, M., SAADAT, I.; OMIDVARI, S.; SAADAT, M. Association between polymorphisms at promoters of XRCC5 and XRCC6 genes and risk of breast cancer. **Medical oncology**, v. 31, n. 4, p. 1-4, 2014.

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. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 3, p. 174-179, 2013.

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

RIBEIRO, H. L. et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of

- myelodysplastic syndrome. **Hematological oncology**, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.
- 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. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2251-2259, 2010.
- SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, 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. **Annals of hematology**, v. 89, n. 3, p. 241-247, 2010.
- SHIEH, S.Y; IKEDA, M.; TAYA, Y.; PRIVES, C. DNA damage induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by NMD2. **Cell.**, v. 91, p. 325-334, 1997.
- SHTEPER, P. J.; BEN-YEHUDA, D. Molecular evolution of chronic myeloid leukaemia. **Seminars in cancer biology**, 2001. Elsevier. p.313-322.
- SILICIANO, J.D; CANMAN, C.E.; TAYA, Y.; SAKAGUCHI, K.; APPELLA, E.; KASTAN, M.B. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. **Genes Dev.**, v. 11, p. 3471-3481, 1997.
- SILVA, J. D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. Genética toxicológica. **Porto Alegre: Alcance**, p. 422, 2003.
- SHILOH, Yosef. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 3, p. 155-168, 2003.
- SOKAL, J. E. et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 789-799, 1984.
- TAKAGI, M.; SATO, M.; PIAO, J.; MIYAMOTO, S.; ISODA, T.; KITAGAWA, M.; MIZUTANI, S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in chronic myelogenous leukemia. **DNA repair**, v. 12, n. 7, p. 500-507, 2013.
- 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. **Journal of hematology & oncology**, 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.

TSITSIMPIKOU, Christina et al. Histopathological lesions, oxidative stress and genotoxic effects in liver and kidneys following long term exposure of rabbits to diazinon and propoxur. **Toxicology**, v. 307, p. 109-114, 2013.

VALERIE, K.; POVIRK, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5792-5812, 2003.

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

WANG, X. et al. A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 1, p. 5-15, 2011.

WANG, Haiyong et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. **Experimental cell research**, v. 334, n. 2, p. 350-358, 2015.

WEST, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 435-445, 2003.

XIE, Shang et al. Relevance of LIG4 gene polymorphisms with cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

YU, S. et al. A review of the challenge in measuring and standardizing BCR-ABL1. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 55, n. 10, p. 1465-1473, 2017.

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

ZEPEDA-ARCE, Rigoberto et al. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 6, p. 1754-1764, 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA E SISTEMA IMUNE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Pesquisador: ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99558718.0.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.048.193

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de transversal com 200 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de LMC com e sem (ao diagnóstico) uso de ITKs. Os mesmos serão selecionados aleatoriamente, correspondendo a 70% dos pacientes atendidos no Serviço. O grupo controle será composto de 200 indivíduos saudáveis. Os pacientes serão provenientes do ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

Avaliar os mecanismos de reparo do DNA e o sistema imune em pacientes com leucemia mieloide crônica com e sem uso de inibidores da tirosino quinase por meio da associação da expressão de genes de resposta das células NK e de reparo no DNA, da contagem de células NK como seus receptores e co-receptores e do perfil de citocinas com características clínicas, laboratoriais, score de risco da doença, níveis de resposta ao tratamento, polimorfismo genético e sobrevida global.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos envolvidos nesse projeto são inerentes ao processo de coleta das amostras biológicas. Riscos envolvendo a coleta de medula óssea: Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma mancha arroxeadada ao redor do local de onde

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Município: FORTALEZA

CEP: 60.430-275

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.048.193

foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Riscos envolvendo a coleta de sangue periférico: É possível ocorrer dor e formação de uma mancha roxa no local da coleta.

Benefícios:

1. Melhor acompanhamento da resposta aos inibidores de tirosina quinase nos pacientes com LMC.
2. Avaliar a variabilidade genética, através do estudo de polimorfismos genéticos, afim de propor um tratamento mais personalizado e com melhor eficácia para os pacientes.
3. Obter marcadores biológicos e moleculares na resposta do tratamento com TKIs.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é interessante e relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados. Conforme solicitado refez TCLE e esclareceu metodologia.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1212267.pdf	03/11/2018 09:09:34		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_comite_de_etica_LMC.pdf	03/11/2018 09:08:13	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.pdf	03/11/2018 09:07:45	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	26/09/2018 11:52:52	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.048.193

Cronograma	cronograma.pdf	26/09/2018 11:52:38	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento.pdf	18/09/2018 10:17:28	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	carta_de_solicitacao_apreciacao.pdf	18/09/2018 10:16:58	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	declaracao_de_fiel_depositario.pdf	18/09/2018 10:16:15	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	termo_de_compromisso.pdf	18/09/2018 10:15:36	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	carta_de_anuencia.pdf	18/09/2018 10:15:03	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_concordancia.pdf	18/09/2018 10:13:43	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_da_chefia.pdf	18/09/2018 10:13:24	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	17/09/2018 16:49:58	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 30 de Novembro de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado por Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes como participante da pesquisa intitulada “Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e sistema imune em pacientes com leucemia mieloide crônica”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de leucemia mieloide crônica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento, evolução clínica, resposta ao tratamento e acompanhamento desta doença.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

As coletas das amostras serão realizadas no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea. Esta corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas. A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato e plano localizado no centro do tórax (região peitoral). A coleta para a pesquisa será realizada no momento das realizações dos exames de rotina (como mielograma e citogenética) para o diagnóstico e acompanhamento ambulatorial do participante. Serão coletadas, para a pesquisa, somente 4 mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta será realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. O procedimento para a coleta de medula óssea através da punção esternal, pode, raramente, determinar o aparecimento de uma mancha arroxeadada ao redor do local da coleta, desaparecendo em poucos dias. Poderá, também, ocorrer dor discreta e de fácil alívio e, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local e, raramente, poderá ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A recoleta deste material é necessária apenas em casos excepcionais, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Além da medula óssea, serão coletados dois tubos de 4 mL de sangue periférico contendo EDTA como anticoagulante e 1 tubo de 5 mL com gel separador para obtenção do soro. As amostras de sangue serão obtidas a partir de uma punção venosa no braço. A punção venosa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de dor e formação de uma mancha roxa devido à coleta. Caso haja um dano na sua integridade física e mental serão minimizados pela garantia de atendimento médico e psicológico.

Necessitamos, também, que o Sr.(a) autorize a coleta de dados, como: nome, idade, sexo, escolaridade, ocupação, contato, data de diagnóstico (LMC), número do prontuário e informações relacionadas ao uso de medicamentos, todas essas pertinentes à pesquisa, que serão coletadas em um único momento através da aplicação de questionário ou através de consultas ao seu prontuário.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você terá a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deverá informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nessa instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

Nome: Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Instituição: Universidade Federal Do Ceará
Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brasil.
Telefones para contato: (85) 33668264

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a 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 que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
Nome da testemunha (se o participante não souber ler)	Data	Assinatura
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura