

Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



Instituto Politécnico
de Coimbra

A IMPORTÂNCIA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS
E DO *HALVING TIME* NA AVALIAÇÃO DE RESPOSTA MOLECULAR
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA:
ESTUDO RETROSPECTIVO DE UM GRUPO DE DOENTES

MARIA JOÃO MENDES DINIS DOS SANTOS

Coimbra

2017

Instituto Politécnico de Coimbra



Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

**A IMPORTÂNCIA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS
E DO *HALVING TIME* NA AVALIAÇÃO DE RESPOSTA MOLECULAR
NA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÓNICA:
ESTUDO RETROSPECTIVO DE UM GRUPO DE DOENTES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica de Prof. Doutora Maria Letícia Ribeiro, Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e coorientação de Dra. Margarida Coucelo, Técnica Superior de Saúde, Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

JÚRI

Presidente: Doutor Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes,
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Arguente: Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão,
Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientadora: Doutora Maria Letícia Ribeiro,
Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Á Doutora Maria Letícia Ribeiro, pela dedicação e perspicácia na orientação deste trabalho.

Á Dr.^a Margarida Coucelo, coorientadora deste trabalho, pela amizade e infinita disponibilidade para me ajudar a concluir este trabalho.

Ao Eduardo, pela ajuda inestimável na análise estatística dos dados.

Ao André, pelo carinho e coragem.

Aos meus colegas de Mestrado da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e colegas do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo apoio e companheirismo.

RESUMO

Introdução: Na Leucemia Mielóide Crónica (LMC), a monitorização de resposta ao tratamento com inibidores de tirosina-cinase (TKI) baseia-se na avaliação da resposta hematológica, citogenética e molecular ao longo do tempo, estando definidos critérios de resposta óptima, sub-óptima e falência aos 3, 6 e 12 meses de tratamento. Os doentes com mais de 10% de transcrito BCR-ABL1 aos 3 meses são considerados como tendo resposta sub-óptima e pior prognóstico a longo prazo. No entanto, existe uma proporção de doentes que atingem respostas moleculares favoráveis posteriormente.

Objectivos: Num grupo de doentes com LMC, em fase crónica, sob tratamento com Imatinib (IM), avaliar as diferenças clínico-laboratoriais entre os doentes com resposta molecular óptima e resposta sub-óptima aos 3 meses de tratamento. Nos doentes com resposta sub-óptima, avaliar a capacidade do *halving time* e da redução logarítmica de prever respostas moleculares subsequentes.

Material e Métodos: Análise retrospectiva de um grupo de 24 doentes com LMC, em fase crónica, diagnosticados no nosso centro entre 1 de Janeiro de 2006 e 31 de Agosto de 2014. Revisão dos parâmetros clínico-laboratoriais e avaliação de resposta óptima, sub-óptima e falência aos 3, 6 e 12 meses de tratamento. Determinação do *halving time* e redução logarítmica da %BCR-ABL1 em doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses de Imatinib.

Resultados: Aos 3 meses de tratamento, 14 doentes tinham resposta óptima e 10 sub-óptima. Os doentes com resposta sub-óptima apresentavam um valor mais elevado de transcrito ao diagnóstico ($p < 0,05$). Neste grupo de

doentes, o *halving time* tem valor preditivo de falência de resposta (AUC=0,83; $p=0,02$) e de resposta molecular óptima aos 6 meses (AUC=0,93; $p<0,0001$). A redução logarítmica aos 3 meses foi preditiva de resposta molecular óptima aos 6 meses (AUC=0,96; $p<0,0001$) e aos 12 meses (AUC=0,83; $p=0,03$). Um valor de 22,59 dias de *halving time* e uma redução logarítmica de -1,1log aos 3 meses de tratamento, parecem ter um bom poder discriminativo dos doentes que alcançam resposta molecular óptima aos 6 meses.

Conclusão: Estes resultados sublinham a importância da quantificação de transcrito ao diagnóstico na interpretação da resposta molecular obtida aos 3 meses, assim como o contributo, numa fase precoce de tratamento, de parâmetros de cinética de decréscimo de transcrito na discriminação dos doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses que alcançarão posteriormente respostas moleculares favoráveis.

PALAVRAS-CHAVE

Leucemia Mielóide Crónica; BCR-ABL1>10%; resposta sub-óptima; *halving time*; redução logarítmica

ABSTRACT

Introduction: In Chronic Myeloid Leukaemia (CML), the response to treatment with tyrosine-kinase inhibitors is monitored based on the evaluation of hematologic, cytogenetic and molecular responses, with specific criteria defining responses as optimal, suboptimal or failure at 3, 6 and 12 months of treatment. Patients with BCR-ABL1 transcript above 10% at 3 months are considered suboptimal responders, with worse long-term outcomes. However, a proportion of these patients will still achieve a favourable molecular response.

Aims: To evaluate the clinic and laboratory differences between patients with optimal and suboptimal response at 3 months, in a group of patients with chronic-phase CML treated with Imatinib. Within suboptimal responders, to evaluate the predicting value of subsequent molecular response of the *halving time* and logarithmic reduction.

Methods: Retrospective analysis of a group of 24 patients with chronic-phase CML, diagnosed in a single centre between January 2006 and August 2014. Review of the clinic and laboratory parameters and response evaluation at 3, 6 and 12 months of treatment. Determining the *halving time* and logarithmic reduction of %BCR-ABL1 in the group of patients with suboptimal response at 3 months of treatment with Imatinib.

Results: After 3 months of treatment, 14 and 10 patients had optimal and suboptimal responses, respectively. Patients with suboptimal response presented with a higher transcript value at diagnosis ($p < 0,05$). In this group of patients, the halving time was predictive of response failure (AUC=0,83; $p = 0,02$) and optimal response at 6 months (AUC=0,93; $p < 0,0001$). The

logarithmic reduction at 3 months was predictive of optimal molecular response at 6 (AUC=0,96; $p<0,0001$) and 12 months (AUC=0,83; $p=0,03$). An *halving time* of 22,59 days and a -1,1log reduction at 3 months of treatment showed a good predictive value of achieving an optimal response at 6 months.

Conclusion: These results outline the importance of transcript quantification at the time of diagnosis in the interpretation of the 3-month molecular response, as well as the role of kinetic parameters of transcript decrease, at an early timepoint, in discriminating patients with suboptimal response at 3 months that will respond favorably in the long-term.

KEYWORDS

Chronic Myeloid Leukemia; BCR-ABL1>10%; suboptimal response; *halving time*; logarithmic reduction

ÍNDICE

Índice de Tabelas	11
Índice de Figuras	13
Lista de Abreviaturas	14
1.Introdução	16
1.1 Epidemiologia e apresentação clínica.....	18
1.2 Critérios de diagnóstico.....	18
1.3 Índices de prognóstico.....	20
1.4 Critérios de resposta hematológica, citogenética e molecular.....	22
1.5 Monitorização e critérios de resposta terapêutica.....	26
1.6 Avaliação de resposta molecular precoce.....	28
1.7 Cinética de decréscimo do transcrito BCR-ABL1.....	30
1.8 Factores que influenciam resposta terapêutica.....	32
1.8.1 Adesão terapêutica.....	32
1.8.2 Farmacocinética do Imatinib.....	33
1.8.3 Resistência ao tratamento com inibidores da tirosina-cinase.....	34
1.8.4 Tipo de transcrito.....	36
1.8.5 Anomalias cromossômicas adicionais.....	37

2. Objectivos	39
3. Material e Métodos	40
3.1 População em estudo.....	40
3.2 Índice EUTOS e Sokal.....	40
3.3 Estudos moleculares.....	40
3.4 Cálculo da redução logarítmica.....	41
3.5 Cálculo do <i>halving time</i>	41
3.6 Análise estatística.....	42
4. Resultados	43
4.1 Caracterização da população em estudo.....	43
4.2 Avaliação de resposta ao tratamento com Imatinib.....	44
4.3 Resposta aos 3, 6 e 12 meses de tratamento.....	45
4.4 Doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses de tratamento.....	49
4.5 Pesquisa de mutações do gene <i>BCR-ABL1</i>	53
4.6 Valor preditivo do <i>halving time</i> e redução logarítmica.....	54
5. Discussão	57
6. Conclusão	62
7. Anexo 1	63
8. Bibliografia	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de diagnóstico de fase crónica, fase acelerada e fase blástica na Leucemia Mielóide Crónica.....	12
Tabela 2. Índices de prognóstico na Leucemia Mielóide Crónica.....	14
Tabela 3. Critérios de resposta hematológica completa e citogenética.....	15
Tabela 4. Critérios de resposta molecular profunda.....	17
Tabela 5. Definição de resposta ao tratamento de primeira linha segundo a ELN.....	19
Tabela 6. Caracterização da população em estudo.....	36
Tabela 7. Análise comparativa dos doentes com resposta óptima e sub-óptima aos 3 meses.....	37
Tabela 8. Respostas moleculares aos 6 e 12 meses de tratamento com Imatinib nos grupos A e B.....	39
Tabela 9. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem falência de resposta aos 6 meses de tratamento.....	41
Tabela 10. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem resposta óptima aos 6 meses de tratamento.....	42
Tabela 11. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem falência de resposta aos 12 meses de tratamento.....	44

Tabela 12. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem resposta óptima aos 12 meses de tratamento.....	45
Tabela 13. Valor preditivo do <i>halving time</i> e da redução logarítmica na resposta molecular aos 6 e 12 meses.....	46
Tabela 14. Valores de <i>cut-off</i> óptimos preditivos de resposta molecular do <i>halving time</i> e da redução logarítmica.....	48
Tabela 1 (Anexo 1). Comparação por pares do valor preditivo de resposta molecular do <i>halving time</i> e da redução logarítmica	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Definições de resposta molecular, segundo a Escala Internacional.....	20
Figura 2. Ilustração esquemática da ligação do Imatinib ao domínio cinase ABL da proteína de fusão BCR-ABL1.....	30
Figura 3. Incidência cumulativa de respostas moleculares com mais de 12 meses de tratamento com Imatinib.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA/Ph⁻ – Anomalias cromossómicas clonais adicionais nas células Ph⁻

ACA/Ph⁺ – Anomalias cromossómicas clonais adicionais nas células Ph⁺

AUC – *Area under the curve*

BCR-ABL1 – Transcrito de fusão BCR-ABL1

BO – Biopsia óssea

CB – Crise blástica

CF – Factor de conversão

DAUC – Diferença da AUC

ELN – *European Leukemia Net*

EUTOS – *European Treatment and Outcome Study*

FA – Fase acelerada

FC – Fase crónica

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*

GUSB - Glucoronidase beta

IFN α – Interferão α

IM - Imatinib

IS – Escala internacional

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

M-bcr – Região *major* do gene BCR

m-bcr – Região *minor* do gene BCR

MO – Medula óssea

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Ph⁺ – Cromossoma Filadélfia

QPCR12M – Quantificação de transcrito BCR-ABL1 por qRT-PCR aos 12 meses

QPCR3M – Quantificação de transcrito BCR-ABL1 por qRT-PCR aos 3 meses

QPCR6M – Quantificação de transcrito BCR-ABL1 por qRT-PCR aos 6 meses

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RCyC – Resposta citogenética completa

RHC – Resposta hematológica completa

RM⁴ – Resposta molecular 4

RM^{4.5} – Resposta molecular 4.5

RM⁵ – Resposta molecular 5

RMM, RM³ – Resposta molecular *major*

RMP – Resposta molecular precoce

SP – Sangue periférico

TKIs – Inibidores de tirosina-cinase

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Mielóide Crónica (LMC) é uma Neoplasia Mieloproliferativa com origina na célula hematopoiética pluripotente da medula óssea, estando consistentemente associada à presença do cromossoma Filadélfia (Cromossoma Ph), resultante da translocação recíproca entre o braço longo do cromossoma 9, contendo o oncogene *ABL*, e o braço longo do cromossoma 22, contendo o gene *BCR*, (t(9;22(q34;q11)) ⁽¹⁾. Esta translocação origina o gene de fusão *BCR-ABL1* (*breakpoint cluster region-abelson 1*), responsável pela produção da proteína tirosina-cinase constitutivamente activa BCR-ABL1, responsável por iniciar inúmeras vias de sinalização intracelular que permitem a proliferação e sobrevivência das células leucémicas. A síntese de BCR-ABL1 em todas as linhagens mielóides, algumas células linfóides e endoteliais, é responsável pela expansão clonal de células mielóides diferenciadas.

Dependendo dos locais de quebra, o gene de fusão resultante da translocação t(9;22)(q34;q11) produz diferentes transcritos BCR-ABL1, habitualmente envolvendo a região a montante do exão 2 do gene *ABL* e a região *major* do gene *BCR* (*M-bcr*), exões 13 e/ou 14, produzindo os transcritos e13a2 e/ou e14a2. Assim, o gene de fusão *BCR-ABL1* origina, em 95% dos casos, um transcrito de mRNA que codifica uma proteína citoplasmática com actividade tirosina-cinase de 210kDa (p210). A maioria dos doentes expressa uma de duas variantes do transcrito, produzidas por *splicing* alternativo, e13a2 (b2a2) ou e14a2 (b3a2), existindo raros casos em que são expressos os dois simultaneamente. Nos restantes 5% dos casos, é codificada uma proteína de 190kDa (p190), mais frequentemente associada à Leucemia Linfoblástica Aguda Ph positiva ou, mais raramente, 230kDa

(p230). A expressão de transcritos atípicos, envolvendo a região *minor* (*m-bcr*) é rara (<1%) ⁽²⁾.

A história natural da Leucemia Mielóide Crónica sem tratamento é bi ou trifásica, constituída por uma fase inicial crónica indolente (FC), seguida de uma fase acelerada (FA), crise blástica (CB) ou ambas ⁽¹⁾.

O primeiro relato desta entidade data de 1845, quando Hughes Bennet descreveu pela primeira vez uma doença, inicialmente considerada infecciosa, caracterizada por leucocitose e hepato-esplenomegalia. Simultaneamente, Rudolf Virchow publicava um caso em que descrevia um quadro clínico semelhante, no entanto não considerava que a origem fosse infecciosa e descreve-a pela primeira vez como leucemia. Em 1872, Ernst Neumann estabeleceria a medula óssea como o local de origem da leucemia, assim como o de todas as células sanguíneas. Mais de um século depois, em 1960, Peter Nowell e David Hungerford descobrem e descrevem pela primeira vez o cromossoma Filadélfia, e seria em 1973 que Janet D. Rowley se notabilizaria pela descoberta do mecanismo de translocação envolvido na sua origem ⁽³⁾.

A descoberta da função de tirosina-cinase da proteína resultante do gene de fusão BCR-ABL1 ocorreria no final dos anos 90, levando ao desenvolvimento e introdução de inibidores de tirosina-cinase (TKIs) no tratamento destes doentes. Até então, o único tratamento com intuito curativo consistia no transplante alogénico de progenitores hematopoiéticos, com taxas de morbimortalidade consideráveis e contraindicado em alguns doentes cuja única opção terapêutica era o Interferão alfa (IFN α) ou o Bussulfan. Estes progrediam, num curto período de tempo, para crise blástica e leucemia aguda.

1.1 Epidemiologia e apresentação clínica

Com uma incidência anual de 1-2 casos/100.000 habitantes no mundo inteiro, a Leucemia Mielóide Crónica é uma doença rara, representando 15-20% de todas as leucemias ^(1,3). Pode apresentar-se em qualquer idade, apesar de surgir sobretudo a partir da 5^a-6^a década de vida, sendo rara em crianças, com discreto predomínio do sexo masculino. Antes da introdução do Imatinib, o primeiro inibidor de tirosina-cinase, a sobrevivência média dos doentes aos 10 anos era inferior a 10%. Actualmente, ela ultrapassa os 75% ⁽⁴⁾.

Em cerca de 20-40% dos casos o diagnóstico é feito de forma ocasional, através da realização de um hemograma, em doentes normalmente assintomáticos. Em 50% dos casos os doentes surgem com sintomas leves a moderados de astenia, anorexia, perda de peso, sudorese nocturna, sintomas decorrentes do aumento das dimensões do baço (como dor abdominal ou enfartamento pós-prandial) e anemia. Ao diagnóstico, apesar de se poder apresentar em qualquer das fases de doença, a maioria (80%) dos doentes encontra-se em fase crónica ^(1,3,4).

1.2 Critérios de diagnóstico

O diagnóstico de Leucemia Mielóide Crónica requer a realização de uma história clínica e exame físico detalhados, e observação do esfregaço de sangue periférico para identificação das alterações morfológicas características. A realização de um medulograma é importante para a contagem de blastos e é imprescindível a realização de um cariótipo para comprovar a presença da t(9;22)(q34;q11) e de eventuais alterações cromossómicas adicionais. Apesar de não ser mandatório, a pesquisa da translocação por análise de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) pode mostrar-se útil pela rapidez dos resultados e pela conveniência de poder ser feito em amostras de sangue periférico. Através de técnicas de biologia

molecular é efectuada a identificação do transcrito de fusão BCR-ABL1, em amostras de sangue periférico ou medula óssea, que servirá para monitorizar posteriormente a resposta molecular ao tratamento.

É ainda necessário estabelecer em que fase a doença é diagnosticada. As definições de fase crónica, fase acelerada e fase blástica variam consoante o grupo de trabalho que as propõe e encontram-se sumarizadas na Tabela 1. Segundo a *European Leukemia Net* (ELN), a fase crónica é estabelecida quando, na presença do cromossoma Ph, a contagem de blastos no sangue periférico ou na medula é inferior a 15%, com menos de 20% de basófilos periféricos ou medulares, com ou sem esplenomegalia ⁽⁵⁾. A fase acelerada é definida por uma contagem de 15-29% de blastos no sangue periférico ou medula, ou contagem de blastos mais promielócitos superior a 30% (com menos de 30% de blastos), basofilia superior ou igual a 20%, trombocitopenia persistente não-relacionada com tratamento, ou anomalias cromossómicas clonais nas células Ph positivas (ACA/Ph+) que surgem sob tratamento. A crise blástica é definida por uma contagem de blastos periféricos ou medulares igual ou superior a 30% e proliferação extramedular de blastos (exceptuando o baço).

Com algumas diferenças, a Organização Mundial de Saúde (OMS) define fase crónica quando a contagem de blastos é inferior a 10%, com contagem plaquetar entre $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ e $1000 \times 10^3/\mu\text{L}$, com os restantes critérios iguais aos da ELN. Define, igualmente, de forma diferente a fase acelerada, estabelecendo a contagem de blastos entre 10-19%, acrescentando critérios como a presença de trombocitose superior a $1000 \times 10^3/\mu\text{L}$ resistente ao tratamento e o aumento do baço e da contagem leucocitária sob tratamento. A crise blástica é definida por uma contagem de blastos igual ou superior a 20%, proliferação extramedular de blastos (exceptuando o baço) e presença de agregados de blastos na biopsia óssea ⁽¹⁾.

Existem ainda outras definições para fase acelerada e crise blástica, como a

da *International Bone Marrow Transplant Registry*, e os critérios modificados do *MD Anderson Cancer Center*, mais frequentemente usados em ensaios clínicos, e sumarizados nas recomendações da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* ⁽⁶⁾.

Tabela 1. Critérios de diagnóstico de fase crónica, fase acelerada e fase blástica na Leucemia Mielóide Crónica

	CRITÉRIOS DA ELN	CRITÉRIOS DA OMS
FASE CRÓNICA	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP ou MO <15% . Basófilos no SP ou MO <20% . Plaquetas > 100 x10³/μL . Baço normal ou aumentado 	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP ou MO <10% . Basófilos no SP ou MO <20% . Plaquetas >100 e < 1000 x10³/μL . Baço normal ou aumentado
FASE ACELERADA	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP/MO 15-29% ou blastos mais promielócitos >30% (com blastos <30%) . Basofilia no SP ≥20% . Trombocitopenia persistente (<100x10³/μL) não relacionado com tratamento . Anomalias cromossómicas clonais nas células Ph+ (ACA/Ph⁺), <i>major route</i>, sob tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP ou MO 10-19% . Basófilos no SP ≥20% . Trombocitopenia persistente (<100x10³/μL) não relacionada com o tratamento . Trombocitose (>1000x10³/μL) resistente ao tratamento . ACA/Ph⁺ . Aumento do baço e da contagem leucocitária resistente ao tratamento
FASE BLÁSTICA	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP ou MO ≥30% . Proliferação de blastos extramedular, excepto baço 	<ul style="list-style-type: none"> . Blastos no SP ou MO ≥20% . Proliferação extramedular de blastos (excepto baço) . Grandes focos ou agregados de blastos na BO

SP - sangue periférico; MO - medulograma; BO - biopsia óssea; ACA/Ph⁺ - anomalias cromossómicas clonais adicionais nas células Ph positivas; ELN - *European Leukemia Net*; OMS - Organização Mundial de Saúde.

1.3 Índices de prognóstico

Foram descritos vários factores prognósticos que, ao diagnóstico, permitem prever pior resposta ao tratamento. Os índices prognósticos existentes -

Sokal, Hasford e EUTOS - permitem identificar os doentes de alto risco, que terão piores respostas (Tabela 2).

O índice de Sokal foi introduzido em 1984, por Sokal *et al* ⁽⁷⁾ e aplicado a doentes sob tratamento com Bussulfan. Posteriormente, foi validado em doentes sob tratamento com Imatinib, mantendo o seu impacto prognóstico. Este índice tem em conta as seguintes variáveis: idade, tamanho do baço à palpação (centímetros abaixo do rebordo costal), contagem plaquetar e percentagem de blastos presentes no sangue periférico. Define três grupos de risco (baixo, intermédio e alto). O índice de Hasford ⁽⁸⁾, estabelecido em doentes sob tratamento com IFN α , define também três grupos de risco. Para além dos critérios incluídos no índice de Sokal, tem em conta a percentagem de basófilos e de eosinófilos no sangue periférico. A sua validação em doentes sob tratamento com Imatinib não foi efectuada.

O índice prognóstico mais recente é o do EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*), desenvolvido pelo grupo da ELN ⁽⁹⁾, num grupo de doentes com diagnóstico de novo tratados com Imatinib em primeira linha. Este índice tem em conta unicamente o tamanho do baço e a percentagem de basófilos no sangue periférico ao diagnóstico, definindo dois grupos de risco, baixo e alto. Actualmente não está estabelecido qual dos sistemas prognósticos é superior em termos de predição de resposta. No entanto, pela sua simplicidade e validação com base em doentes sob tratamento *ab initio* com Imatinib, os índices EUTOS e de Sokal, respectivamente, são os mais utilizados na prática clínica.

Tabela 2. Índices de prognóstico na Leucemia Mielóide Crónica

ÍNDICE PROGNÓSTICO	CÁLCULO	GRUPOS DE RISCO
Sokal	$\text{Exp}[(0,0116 \times (\text{idade} - 43,4) + 0,0345 / (\text{baço} - 7,51) + 0,188 \times (\text{plaquetas} / 700)^2 - 0,563)] + 0,0887 \times (\text{blastos} - 2,10)$	Baixo <0,8 Intermédio 0,8-1,2 Alto >1,2
Hasford	$[0,6666 \times \text{idade} (0 \leq \text{se} < 50, 1 \leq \text{se} > 50) + 0,042 \times \text{baço} + 1,0956 \times \text{plaquetas} (0 \leq \text{se} < 1500, 1 \leq \text{se} > 1500 \times 10^9 / \text{L}) + 0,0584 \times \% \text{blastos} + 0,2039 \times \% \text{basófilos} (0 \leq \text{se} < 3 \text{ e } 1 \leq \text{se} > 3) + 0,0413 \times \% \text{eosinófilos} \times 1000]$	Baixo ≤ 780 Intermédio $> 781 \leq 1480$ Alto > 1480
EUTOS	$\text{Baço} \times 4 + \text{basófilos} \times 7$	Baixo < 87 Alto > 87

1.4 Critérios de resposta hematológica, citogenética e molecular

A monitorização dos doentes sob tratamento com TKIs consiste na avaliação de resposta hematológica, citogenética e molecular ao longo do tratamento. Os critérios de resposta hematológica e citogenética encontram-se sumarizados na Tabela 3.

A Resposta Hematológica Completa (RHC) corresponde à normalização da contagem leucocitária ($< 10 \times 10^3 / \mu\text{L}$) e plaquetar ($< 450 \times 10^3 / \mu\text{L}$), na ausência de observação de formas imaturas no esfregaço de sangue periférico, com uma percentagem de basófilos periféricos inferior a 5% e perante o desaparecimento de doença extramedular (hepato-esplenomegalia) ⁽⁶⁾.

Em 2006, o grupo de trabalho da ELN sistematizou a resposta citogenética em 5 grupos ⁽¹⁰⁾: nula ($> 95\%$ de metafases Ph^+), mínima (66-95%), *minor* (36-65%), parcial (1-35%) e completa (0%). Para avaliar o grau de resposta citogenética, a análise das bandas cromossómicas deve ser feita em pelo menos 20 metafases de células de uma amostra medular.

Tabela 3. Critérios de resposta hematológica completa e citogenética.

CRITÉRIO DE RESPOSTA	DEFINIÇÃO
Resposta Hematológica Completa	<ul style="list-style-type: none"> . Plaquetas $<450 \times 10^3/L$. Leucócitos $<10 \times 10^3/L$. Ausência de formas imaturas no ESP . Basófilos no SP $<5\%$. Ausência de esplenomegalia
Resposta Citogenética	<ul style="list-style-type: none"> . Completa: Ph⁺ 0% . Parcial: Ph⁺ 1-35% . <i>Minor</i>: Ph⁺ 36-65% . Mínima: Ph⁺ 66-95% . Nula: Ph⁺ $>95\%$

ESP - esfregaço de sangue periférico; SP - sangue periférico; Ph+ - cromossoma Filadélfia.

A definição de resposta molecular na Leucemia Mielóide Crónica tem sofrido várias actualizações, muito devido ao facto das metodologias laboratoriais para a quantificação dos transcritos BCR-ABL1 não serem, até há relativamente pouco tempo, uniformes entre os laboratórios.

O estabelecimento de critérios de resposta molecular para o transcrito BCR-ABL1 tem acompanhado a evolução das técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para a identificação/quantificação de mRNA. Inicialmente, a monitorização dos doentes passava pela avaliação da presença ou ausência de transcrito, através de técnicas de PCR qualitativa de amplificação simples ⁽¹¹⁾. Em 1993, Cross *et al* ⁽¹²⁾ introduziram a técnica de PCR competitivo, que permitia a determinação da concentração de transcrito por micrograma de RNA leucocitário, e posteriormente, introduziram o conceito do cálculo de uma razão entre o transcrito amplificado e um gene controlo (*BCR-ABL1/ABL*) ⁽¹³⁾, adaptada para a reacção de PCR quantitativo em tempo real (qRT-QPCR), em 1998, por Mensink *et al* ⁽¹⁴⁾. Um ano mais tarde, Branford *et al* ⁽¹⁵⁾ desenvolveram um método de quantificação de BCR-ABL1 através de qRT-PCR em amostras de sangue periférico, que se correlacionava

positivamente com as medições feitas em amostras de medula óssea, simplificando o processo de monitorização molecular.

Para a quantificação do transcrito BCR-ABL1 são propostos três genes-controlo como sendo adequados - *ABL*, *BCR* e o *GUSB* (glucoronidase beta). A escolha de um gene-controlo adequado é de extrema importância para tornar os resultados fiáveis e reprodutíveis ⁽¹⁶⁾. Este deve satisfazer os seguintes critérios: (1) a sua expressão ao diagnóstico deve ser semelhante à do transcrito BCR-ABL1; (2) deve ter estabilidade semelhante à do BCR-ABL1; (3) os *primers* usados para a amplificação do gene controlo não devem amplificar outras sequências genómicas, nomeadamente pseudogenes.

Em 2003, Hughes *et al* ⁽¹⁷⁾ introduziram, pela primeira vez, o conceito de redução logarítmica (\log_{10}) para normalizar a linguagem de aferição de resposta ao tratamento com TKIs em doentes de diferentes áreas geográficas. Nesse mesmo ano, o grupo da *Europe Against Cancer Program* ⁽¹⁸⁾ estabeleceu protocolos standardizados para a quantificação molecular na Leucemia Mielóide Crónica por forma a tornar as metodologias sensíveis e reprodutíveis.

Foi em 2006 que Hughes *et al* ⁽¹¹⁾ propuseram a Escala Internacional (IS) como meio de reportar os resultados moleculares de uma forma uniforme. Ao converter resultados individuais de cada laboratório em valores de uma escala estandardizada internacionalmente, através de um factor de conversão calculado em centros de referência e atribuído a cada laboratório, o valor basal de transcrito BCR-ABL1 ao diagnóstico passou a ser considerado como 100%, e a redução de 3 log a partir desse valor, considerado como 0,1% (Resposta Molecular *Major*, RMM ou RM³) (Figura 1).

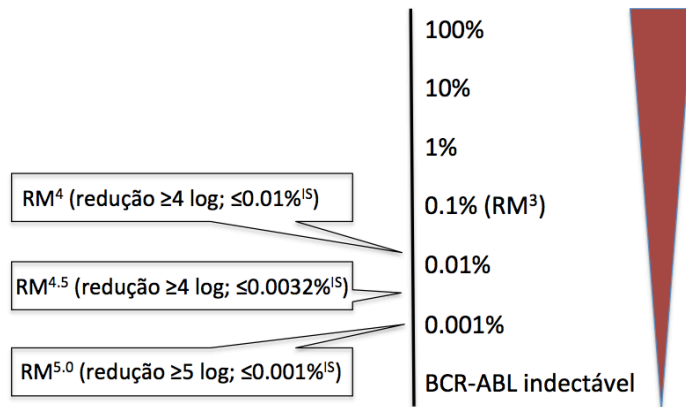


Figura 1. Definições de resposta molecular, segundo a Escala Internacional.

A Escala Internacional expressa a quantificação do BCR-ABL1 por qRT-PCR como uma percentagem e fixa-se em dois valores-chave: 100% corresponde ao valor basal e 0.1% ao limite superior da resposta molecular *major* (RMM), também denominada RM³. RM - Resposta molecular; IS - escala internacional. Adaptado de Cross *et al* ⁽¹⁹⁾.

As resposta moleculares subsequentes, correspondendo a reduções logarítmicas de 4 a 5 vezes o valor basal, foram também estabelecidas (Tabela 4). A Escala Internacional preconiza que esta apenas possa ser aplicada quando são usados o gene *ABL* e o *GUSB* como genes-controlo (2,20,11).

Tabela 4. Critérios de resposta molecular profunda.

RM⁴	Doença detectável ≤0,01% BCR-ABL1 ^{IS} ou indetectável para ≥10.000 <i>ABL1</i> ou ≥24.000 <i>GUSB</i>
RM^{4.5}	Doença detectável ≤0,0032% BCR-ABL1 ^{IS} ou indetectável para ≥32.000 <i>ABL1</i> ou ≥77.000 <i>GUSB</i>
RM^{5.0}	Doença detectável ≤0,001% BCR-ABL1 ^{IS} ou indetectável para ≥100.000 <i>ABL1</i> ou ≥240.000 <i>GUSB</i>

1.5 Monitorização e critérios de resposta terapêutica

A crescente evidência de que os TKIs de segunda geração resultam em respostas moleculares mais rápidas e mais profundas, comparadas com o Imatinib, em doentes com diagnóstico *de novo*, fez crescer a ideia de que a Leucemia Mielóide Crónica pode ser uma doença curável e de que o tratamento pode ser interrompido. Estes novos paradigmas de tratamento fomentaram a necessidade de estabelecer metodologias estandardizadas, robustas e reprodutíveis, tanto intra como inter-laboratórios, no que toca à avaliação de resposta molecular ⁽²⁰⁾. Por outro lado, levaram à actualização consecutiva dos critérios de resposta ao tratamento. A actualização mais recente destes critérios foi desenhada em 2013 pela ELN ⁽⁵⁾, estabelecendo *timings* específicos para a monitorização dos doentes e definindo três grupos consoante a resposta: grupo com resposta óptima, grupo com resposta sub-óptima (*warning*) e grupo com falência terapêutica (Tabela 5).

O conceito de resposta óptima significa que a resposta obtida com o tratamento se associa a taxas de sobrevivência global óptimas, não sendo necessário, perante boa tolerância, mudar a terapêutica. Falência terapêutica inclui doentes em que a probabilidade de resposta óptima é escassa e que deverão mudar de tratamento para inibidores de tirosina-cinase de segunda linha. O grupo de resposta sub-óptima corresponde a uma situação intermédia entre resposta óptima e falência, em que o decréscimo do clone Ph⁺ é mais lento do que o esperado para uma resposta óptima, mas em que ainda existe a possibilidade de obtenção do grau de resposta desejada ^(5,21).

Assim, a resposta óptima aos 3 meses ocorre quando a resposta citogenética é, pelo menos parcial e/ou a quantificação do transcrito BCR-ABL1 é igual ou inferior a 10% (QPCR3M \leq 10%). Aos 6 meses, a resposta citogenética deverá ser completa e/ou o nível de transcrito BCR-ABL1 inferior a 1% (QPCR6M $<$ 1%). Aos 12 meses, considera-se resposta óptima quando o doente alcança resposta molecular *major* (RM³, QPCR \leq 0,1%).

Tabela 5. Definição de resposta ao tratamento de primeira linha segundo a ELN⁽⁵⁾

RESPOSTA	ÓTIMA	SUB-ÓTIMA	FALÊNCIA
Basal	NA	Alto risco ou ACC/Ph+	NA
3 meses	BCR-ABL1 ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% e/ou Ph+ 36-95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95%
6 meses	BCR-ABL1 < 1% e/ou Ph+ 0%	BCR-ABL1 = 1-10% e/ou Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 > 10% e/ou Ph+ > 35%
12 meses	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	BCR-ABL1 > 0,1-1%	BCR-ABL1 > 1% e/ou Ph+ > 0%
A partir dos 12 meses	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	ACA/Ph- (-7 ou 7q-)	. Perda de RHC, RCyC ou RMM . Mutações . ACA/Ph+

NA - não aplicável; RHC - resposta hematológica completa; RCyC - resposta citogenética completa; RMM - resposta molecular *major*; ACC/Ph+ - anomalias cromossômicas clonais adicionais em células Ph+; ACC/Ph- - anomalias cromossômicas clonais adicionais em células Ph-.

A evidência de falência terapêutica aos 3 meses dá-se quando não há resposta hematológica completa e/ou a resposta citogenética é nula. Aos 6 meses, uma quantificação de transcrito superior a 10% (QPCR6M > 10%) e/ou uma resposta citogenética diferente de completa ou parcial, são critérios de falência. Aos 12 meses considera-se falência terapêutica quando a quantificação de transcrito é superior a 1% (QPCR12M > 1%) e/ou a resposta citogenética é diferente de completa.

No que diz respeito ao grupo de resposta sub-ótima, aos 3 meses esta é definida por um nível de transcrito superior a 10% (QPCR3M > 10%) e/ou a resposta citogenética é *minor*. Aos 6 meses, os doentes incluem-se neste grupo se o valor de transcrito estiver entre 1-10% e/ou a resposta

citogenética for parcial. Aos 12 meses, considera-se resposta sub-óptima se a resposta molecular estiver entre 0,1-1%.

1.6 Avaliação de resposta molecular precoce

Desde a introdução do Imatinib no tratamento da LMC, a resposta citogenética foi considerada como o mais importante factor preditivo prognóstico^(22,23). Doentes com Resposta Citogenética Completa (RCyC) até aos 12 meses de tratamento apresentam melhores resultados em termos de sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão.

A avaliação de Resposta Molecular Precoce (RMP), isto é, a determinação da percentagem de transcritos BCR-ABL1 aos 3 e 6 meses de tratamento (QPCR3M \leq 10% e QPCR6M $<$ 1%), demonstrou discriminar os doentes com maior probabilidade de alcançar resposta citogenética completa aos 12 meses, predizendo assim melhores resultados a longo prazo^(22,24,25,26,27). Nos doentes com resposta citogenética completa, a quantificação do transcrito BCR-ABL1 aos 3 meses de tratamento demonstrou ter melhor valor preditivo em termos de sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão, do que a dos 6 meses^(26,27). Isto pode ser explicado pelo facto de, à medida que o tratamento continua, outros factores como a adesão terapêutica e a necessidade de ajustar doses do tratamento devido a toxicidade, influenciarem a resposta aos inibidores de tirosina-cinase⁽²⁷⁾. Em doentes com valores de transcrito superiores a 10% aos 3 meses de tratamento, a probabilidade de atingir resposta citogenética completa até aos 12 meses é menor e o risco de progressão para fase acelerada/blástica aumenta, com menor sobrevivência global e, embora não em todos os casos⁽²⁵⁾, menor sobrevivência livre de progressão.

A avaliação do impacto prognóstico da RMP fomentou a ideia da alteração precoce da terapêutica para TKIs de segunda linha quando a resposta

molecular atingida sob tratamento com Imatinib fosse inferior à considerada desejável. Antes da última actualização de ambas as *guidelines*, tanto a NCCN como a ELN recomendavam a mudança de tratamento para TKIs de segunda linha aos 3 meses neste grupo de doentes^(28,30). No entanto, alguns autores, como Rohon *et al*⁽²⁹⁾, discordavam da mudança de terapêutica demasiado precoce, uma vez que nas suas séries não observaram os mesmos resultados. Nesse sentido, a ELN actualizou em 2013⁽⁵⁾ as suas recomendações de 2009⁽³⁰⁾, considerando que um doseamento único aos 3 meses não é suficiente para considerar falência terapêutica que obrigue a mudança de tratamento, ressalvando que nestes doentes a mudança de TKI deve ser ponderada tendo em conta quantificações consecutivas, aos 3 e 6 meses, e entre estas se necessário.

Entretanto, outros grupos investigaram que factores influenciam a obtenção de RMP. Lee *et al*⁽²⁴⁾ observaram que um menor número de blastos ao diagnóstico e uma concentração sérica de Imatinib mais elevada no dia 29 de tratamento estavam associados a maior probabilidade de atingir resposta molecular óptima aos 3 meses. Factores como maior redução logarítmica do BCR-ABL1, doses médias de Imatinib administrado aos 6 meses superior a 350mg/dia e um score de Sokal baixo, influenciavam positivamente a obtenção de resposta molecular óptima aos 6 meses. Os doentes com RMP apresentavam maior probabilidade de alcançar resposta citogenética completa e RMM aos 18 meses, com benefício na sobrevivência livre de progressão, mas sem diferença na sobrevivência global. Este estudo evidencia o facto de factores individuais influenciarem a obtenção de RMP, sendo essencial identificá-los quando se pondera alterar estratégias terapêuticas.

1.7 Cinética de decréscimo do transcrito BCR-ABL1

Actualmente, a resposta molecular aos 3 meses de tratamento é um ponto crítico de decisão terapêutica em doentes com diagnóstico de novo tratados com Imatinib. Esta resposta, como já referido, pode ser influenciada por vários factores, pelo que alguns autores investigaram outros critérios que possam prever respostas moleculares e prognóstico a longo prazo, nomeadamente, a cinética de declínio do transcrito BCR-ABL1. Vigneri *et al* ⁽³¹⁾ observaram que os doentes com níveis de transcrito ao diagnóstico mais elevados apresentam pior prognóstico em termos de sobrevivência livre de progressão e sobrevivência livre de falência, mas não em termos de sobrevivência global. Adicionalmente, verificaram que o tipo de gene-controlo, *ABL* ou *GUSB*, usado na quantificação influenciava a avaliação de resposta. De facto, a correlação entre nível de transcrito basal e a resposta citogenética ao tratamento com Imatinib foi maior quando aplicado o *GUSB* como gene-controlo. Estes autores concluíram que o nível basal de transcrito, quando quantificado através de uma razão BCR-ABL1/*GUSB*, apresentava uma maior capacidade discriminativa dos doentes que obteriam piores resultados sob Imatinib.

Por outro lado, Hanfstein *et al* ⁽³²⁾, através do cálculo da redução logarítmica, avaliaram o impacto da velocidade de decréscimo do transcrito BCR-ABL1 entre o diagnóstico e os 3 meses de tratamento, na resposta terapêutica e no prognóstico. Usando o *GUSB* como gene-controlo, os autores estabeleceram uma redução de 0,5log aos 3 meses de tratamento de Imatinib como o valor de *cut-off* óptimo para prever resposta molecular e prognóstico favorável a longo prazo.

O grupo de Branford *et al* ⁽³³⁾ analisou dentro do grupo de doentes que aos 3 meses apresentavam níveis de transcrito considerados sub-óptimos e, assim, com pior prognóstico, o valor discriminativo do *halving time* do transcrito BCR-ABL1 para prever resposta e prognóstico. Já previamente aplicado a

marcadores tumorais de outros tipos de neoplasias, o *halving time* consiste no tempo durante o qual uma determinada carga tumoral reduz para metade. Usando o *BCR* como gene-controlo, os autores concluíram por um *halving time* inferior a 76 dias como sendo capaz de discriminar os doentes com melhores taxas de respostas moleculares subseqüentes, sobrevivência global, sobrevivência livre de falência e sobrevivência livre de progressão. Neste estudo os autores determinaram um *cut-off* de 1,4% de BCR-ABL1 como o valor ideal de transcrito aos 3 meses capaz de predizer obtenção de resposta molecular *major* até aos 12 meses de tratamento. De forma similar, Huet *et al* ⁽³⁴⁾ identificaram os valores de *cut-off* óptimos de transcrito, *halving time* e redução logarítmica aos 3 meses de tratamento, para predizer resposta. Usando o *ABL* como gene-controlo, eles determinaram um valor de *halving time* igual ou inferior a 19 dias, uma redução de 1,7log e um valor de transcrito aos 3 meses inferior a 0,99% como preditivos de obtenção de RMM até aos 12 meses de tratamento. Quando aplicado o *GUSB* como gene-controlo, os valores foram semelhantes (*halving time* de 21 dias, redução logarítmica de 1,45log e valor de 0,36% de transcrito aos 3 meses).

Estes estudos, ainda que com resultados diferentes e usando diferentes genes-controlo, enfatizam a ideia de que o prognóstico dos doentes com respostas moleculares sub-óptimas aos 3 meses de tratamento com Imatinib é heterogéneo e de que, a longo prazo, outros factores influenciam a resposta e o prognóstico. Mais do que a avaliação de valores estáticos e fixos no tempo, outros determinantes de resposta devem ser tidos em conta, nomeadamente a cinética de declínio do transcrito durante os primeiros meses de tratamento, quando está em causa a tomada de decisões clínicas, nomeadamente a de mudança de terapêutica.

1.8 Factores que influenciam resposta terapêutica

1.8.1 Adesão terapêutica

A resposta ao tratamento na LMC varia muito entre os doentes, e apesar da principal razão ser a heterogeneidade biológica da leucemia, a adesão à terapêutica crónica desempenha um papel muito importante e é um problema bem reconhecido. Alguns autores sugerem que, em doentes sob tratamento com Imatinib há muito tempo, a falência na adesão terapêutica aumenta, com impacto significativo no grau de resposta ao tratamento, sendo a principal razão para perda de resposta citogenética e respostas moleculares sub-óptimas ⁽³⁵⁾.

Marin *et al* ⁽³⁶⁾ reconheceram que a adesão terapêutica ao Imatinib é menor em doentes mais jovens. Observaram igualmente que a adesão diminui em doentes com efeitos adversos crónicos ligeiros, mas frequentes, como astenia, náuseas, câibras musculares e artralguas, em doentes que tomam a medicação fora dos horários das refeições, e em doentes em que a dose do Imatinib tenha sido aumentada. Neste mesmo estudo foi possível aferir uma correlação forte entre a adesão terapêutica e a probabilidade de atingir RMM. Numa extensão deste estudo, Ibrahim *et al* ⁽³⁵⁾ avaliaram o impacto da adesão terapêutica na probabilidade de perder RCyC: doentes com uma taxa de adesão inferior a 85% apresentavam um probabilidade significativamente maior de perder RCyC aos 2 anos, em comparação com o grupo de doentes com taxa de adesão igual ou superior a 95%. Noens *et al* ⁽³⁷⁾ concluíram que, num contexto de prática clínica real, um terço dos doentes sob Imatinib não eram cumpridores, e apenas 14% dos doentes tomava a dose total prescrita. Paradoxalmente, a percepção de adesão, tanto pelos doentes como pelos médicos, era bastante alta.

1.8.2 Farmacocinética do Imatinib

A administração de Imatinib na dose de 400mg id é o tratamento *standard* nos doentes adultos com LMC em fase crónica. Todavia, alguns autores, como Hehlmann *et al* ⁽³⁸⁾, demonstraram que a administração de uma dose de 800mg id de Imatinib na fase inicial de tratamento resultava em respostas mais profundas e mais rápidas, com impacto na sobrevivência. Em particular, Proetel *et al* ⁽³⁹⁾ demonstraram que uma dose de Imatinib de 800 mg id permitia alcançar melhores taxas de resposta citogenética e molecular em doentes idosos (≥ 65 anos).

Apesar da excelente eficácia terapêutica do Imatinib, a resposta dos doentes é heterogénea, devendo-se, em parte, à sua variabilidade farmacocinética ⁽⁴⁰⁾. A molécula de Imatinib é metabolizada no hepatócito pelo citocromo P450, nomeadamente pelas isoformas CYP3A4 e 3A5. O transporte do Imatinib para o interior da célula é mediado, principalmente, pelo transportador hOCT1 (codificado pelo gene *SLC22A1*), enquanto que o transporte para fora da célula é mediado pelos transportadores ABC, em particular o transportador ABCB1 (também denominado MDR1) e ABCG2 ⁽⁴¹⁾. A variabilidade de resposta ao Imatinib pode assim ser influenciada pela sua concentração intracelular, determinada pelo seu maior ou menor influxo/efluxo pela membrana citoplasmática. Foram identificados alguns polimorfismos nos genes que codificam estas proteínas que poderão explicar a maior ou menor sensibilidade de alguns doentes ao Imatinib, com repercussão evidente na probabilidade de alcançar RMM e assim condicionar respostas clínicas e sobrevivência.

Muitos factores podem influenciar o grau de exposição ao fármaco, como a capacidade de absorção, distribuição e metabolismo, assim como interações com outros fármacos, com impacto no seu benefício terapêutico máximo. A concentração plasmática do Imatinib parece, assim, ser determinante na taxa de respostas citogenéticas e moleculares e apresenta uma correlação

positiva com estas, na medida em que doentes com concentrações séricas mais elevadas apresentam maiores taxas de RCyC e RMM, com impacto na sobrevivência ^(42,43).

1.8.3 Resistência ao tratamento com inibidores da tirosina-cinase

O tratamento com Imatinib, apesar de reconhecidamente eficaz em doentes *naïve* com LMC em fase crónica, com bom perfil de tolerabilidade, está sujeito ao desenvolvimento de resistências, primárias ou secundárias. A resistência primária ocorre em doentes que nunca alcançam respostas clínicas satisfatórias, enquanto os doentes que perdem a resposta inicial são considerados como desenvolvendo resistência secundária.

Enquanto que os mecanismos de resistência primária aos TKIs estão ainda mal compreendidos a nível molecular, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência secundária têm sido amplamente estudados ⁽⁴⁴⁾. O principal, mas não o único, mecanismo de resistência secundária ao Imatinib é o desenvolvimento de mutações pontuais a nível do gene *ABL* na região que codifica o domínio cinase da proteína de fusão, dificultando ou mesmo impedindo a ligação dos inibidores tirosina-cinase à proteína de fusão BCR-ABL1. Diferentes mutações conferem graus variáveis de resistência ao Imatinib ⁽⁴⁵⁾.

O Imatinib ocupa a interface entre os sub-domínios N-terminal e C-terminal do domínio cinase da proteína de fusão (Figura 2). A sua ligação sobrepõe-se ao local de ligação do ATP, actuando como um inibidor competitivo do ATP, induzindo igualmente uma mudança conformacional da alça rica em Gly (*ATP phosphate-binding loop, P-loop*) do domínio cinase. Esta alteração conformacional aumenta a superfície de complementaridade com o Imatinib, estabilizando a sua interacção.

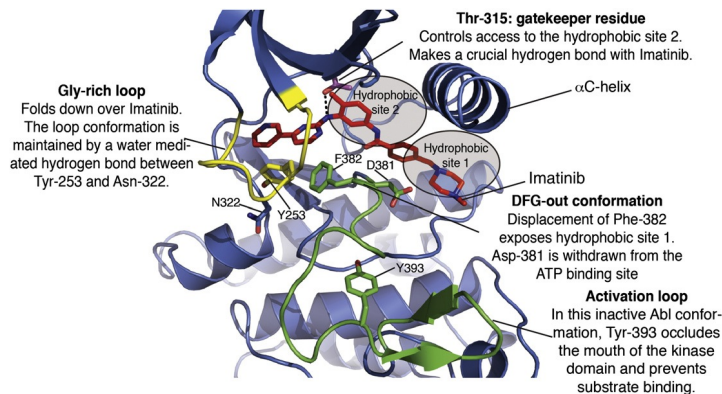


Figura 2. Ilustração esquemática da ligação do Imatinib ao domínio cinase ABL da proteína de fusão BCR-ABL1. Retirado de Lamontanara *et al* ⁽⁴⁴⁾.

Outra região da proteína de fusão, não envolvida na interação com o ATP, é modulada por uma parte diferente da molécula do Imatinib, contribuindo para a sua elevada especificidade, cujo acesso é controlado por um resíduo de treonina (T315I), denominado resíduo *gatekeeper*. A mutação ABL T315I (mutação *gatekeeper*) foi a primeira mutação identificada em doentes com recaída de doença. A ausência do grupo hidroxilo no resíduo T315I previne a formação da ligação de hidrogénio com o Imatinib. Para além de impedir a ligação do Imatinib, esta mutação leva a uma ainda maior activação do domínio cinase. Ela confere resistência não só ao Imatinib, como à maior parte dos TKIs disponíveis para o tratamento da LMC, com excepção do Ponatinib.

As mutações envolvendo a *P-loop* mais frequentemente observadas são as mutações G250E, Q252H, Y253H/F e E255K/V. Comparando com a resistência conferida pela mutação T315I, as mutações envolvendo a *P-loop* conferem um grau de resistência apenas moderado. Não obstante, elas são capazes de restaurar a actividade cinase da interacção BCR-ABL mesmo na presença de Imatinib, perpetuando clones com uma destas mutações. Branford *et al* ⁽⁴⁶⁾ demonstraram que, nos doentes que desenvolviam

resistência ao tratamento com Imatinib, a maioria apresentava mutações adquiridas envolvendo a *P-loop*. Este grupo de doentes apresentava pior prognóstico, com uma taxa de mortalidade mais elevada do que doentes com mutações fora do domínio *P-loop*.

Ocorrem, igualmente, mutações envolvendo a alça de activação do domínio cinase (*A-loop*), actuando através da sua estabilização conformacional na forma activa e diminuindo a força de ligação do Imatinib. Três mutações são descritas: F382L, L387M e H396P/R. As mutações mais frequentes envolvem o resíduo H396.

Para além destas mutações, que envolvem regiões no domínio cinase da proteína de fusão BCR-ABL1 implicadas na ligação do Imatinib, muitas outras estão descritas, envolvendo resíduos dispersos pelo domínio cinase e distantes da região de interacção com o Imatinib. Uma mutação comum é a mutação M351T.

Fora do domínio cinase, mutações envolvendo os domínios reguladores, SH3 e SH2, influenciam a estrutura conformacional da região cinase, comprometendo igualmente a sensibilidade aos TKIs. Um exemplo de mutações do domínio regulador é a mutação T212R. Outros mecanismos de resistência ao Imatinib incluem a amplificação do BCR-ABL e a presença de mutações em domínios cinase independentes do BCR-ABL (mutações nas cinases SRC).

1.8.4 Tipo de transcrito

A possibilidade de existirem diferenças de fenótipo e de prognóstico entre as variantes e13a2 e e14a2 do gene de fusão BCR-ABL1 tem sido amplamente discutida, levantando a hipótese de que, se estas diferenças existem, então a resposta ao tratamento com TKIs poderá ser diferente. Embora alguns

estudos não encontrem diferenças prognósticas entre os tipos de transcritos nem diferentes características clínicas ^(47,48), outros conseguem essa associação.

Num estudo recente de Hanfstein *et al* ⁽⁴⁹⁾, o grupo de doentes com transcrito e13a2 apresentava ao diagnóstico trombocitose mais elevada e o grupo com transcrito e14a2 leucocitose mais elevada. Lucas *et al* ⁽⁵⁰⁾ observaram uma maior sensibilidade do transcrito e14a2 ao Imatinib, apesar de não influenciar a obtenção de resposta citogenética. Pelo contrário, Lemos *et al* ⁽⁵¹⁾ concluíram por uma resposta molecular mais rápida e profunda no grupo de doentes com transcrito e13a2.

Polampalli *et al* ⁽⁵²⁾ não encontraram diferenças nos parâmetros hematológicos consoante o transcrito expresso, mas descreveram uma maior associação entre o transcrito e13a2 e a ocorrência de crise blástica. Nesta mesma análise, a taxa de RMM aos 6 e 12 meses de tratamento foi maior no grupo de doentes com transcrito e13a2, embora sem significado estatístico.

Assim, apesar de alguns autores considerarem que se deva ter em conta o tipo de transcrito quando se avalia resposta ao tratamento ⁽⁴⁹⁾, os resultados dos estudos disponíveis parecem ser ainda pouco consistentes e as conclusões demasiado discordantes quanto ao significado clínico e prognóstico dos dois tipos de transcrito mais frequentes.

1.8.5 Anomalias cromossómicas clonais adicionais

A ocorrência de anomalias cromossómicas clonais adicionais nas células Ph+ (ACA/Ph+), não envolvidos na translocação BCR-ABL1, parecem ter inequívoco impacto prognóstico, uma vez que ocorrem em contexto de evolução clonal e progressão de doença. Cortes *et al* ⁽⁵³⁾ encontraram diferenças na sobrevida global de doentes com evolução citogenética clonal

sob tratamento com Imatinib, tanto em fase crónica como acelerada, apesar de não haver diferenças nas taxas de resposta citogenética. Pelo contrário, Fabarius *et al* ⁽⁵⁴⁾ concluíram por piores taxas de sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão, assim como tempo até resposta citogenética completa e molecular *major* mais demoradas. De forma semelhante, Schoch *et al* ⁽⁵⁵⁾ encontraram menores taxas de resposta citogenética neste grupo de doentes que se encontravam, na maioria, em fase blástica ao diagnóstico.

De facto, a presença de anomalias cromossómicas clonais adicionais é critério para definir fase acelerada e o seu aparecimento durante o tratamento com TKI é critério de falência terapêutica.

2. OBJECTIVOS

Este trabalho centra-se na análise retrospectiva de uma população de doentes com Leucemia Mielóide Crónica, com os objectivos de:

- analisar se existem diferenças clínico-laboratoriais entre os doentes que atingem respostas moleculares consideradas óptimas aos 3 meses de tratamento com Imatinib e os doentes que não atingem;
- nos doentes com respostas sub-óptimas aos 3 meses, analisar factores que distinguem e permitem prever respostas moleculares subsequentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População em estudo

Estudo retrospectivo de 24 doentes com LMC, diagnosticados entre 1 de Janeiro de 2006 e 31 de Agosto de 2014, seguidos no Serviço de Hematologia Clínica - Pólo Hospital Geral do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal, de acordo com os critérios diagnósticos da OMS 2008/2001. Ao diagnóstico todos os doentes estavam em fase crónica, tendo iniciado tratamento de primeira linha com Imatinib na dose 400mg id. Em 12 doentes foi necessária introdução de terapêutica com Hidroxicarbamida com o intuito de citorredução temporária. Nenhum doente recebeu tratamento com Interferão antes de iniciar Imatinib.

3.2 Índice EUTOS e Sokal

Para cada doente, foram calculados os índices de prognóstico EUTOS e de Sokal.

3.3 Estudos moleculares

A pesquisa, quantificação inicial e posterior monitorização molecular do transcrito BCR-ABL1, foram realizadas no mesmo laboratório em amostras de sangue periférico, de acordo com técnicas e procedimentos laboratoriais estandardizados pelo grupo da *Europe Against Cancer Program* ⁽¹⁸⁾. O gene controlo utilizado foi o *ABL1*. O resultado da quantificação do transcrito BCR-

ABL1 é dado por BCR-ABL1/ABL1% x Factor de Conversão (CF), de modo a reportar os valores na Escala Internacional (IS), à excepção da quantificação ao diagnóstico, onde não se aplica o CF. Os valores de BCR-ABL1 foram convertidos para a IS utilizando o factor de conversão específico deste laboratório: 0,37. A monitorização molecular foi feita ao diagnóstico, aos 3 e 6 meses de tratamento e, posteriormente, com uma periodicidade de 3 a 6 meses. A aferição de resposta molecular foi feita durante o período em que os doentes mantiveram tratamento com Imatinib.

3.4 Cálculo da redução logarítmica

A redução logarítmica foi calculada aos 3 meses de tratamento com Imatinib, a partir da equação $\log(a/b)$, em que a corresponde à quantificação de transcrito aos 3 meses de tratamento e b à quantificação ao diagnóstico.

3.5 Cálculo do *halving time*

Para cada doente, o *halving time* foi calculado segundo a equação proposta por Branford *et al* ⁽³³⁾, $c = -\ln(2)/k$, em que c corresponde ao *halving time*, k ($k = [\ln(b) - \ln(a)]/d$) à redução de transcrito BCR-ABL1 desde o valor inicial ao diagnóstico (a) e a monitorização aos 3 meses (b), a dividir pelo número de dias decorridos (d) entre as duas avaliações. Nos casos em que o valor de *halving time* foi negativo, foi atribuído o valor de 2000 dias como representativo do *halving time* positivo mais longo.

3.6 Análise estatística

A análise estatística descritiva e inferencial foi realizada com recurso ao *software* de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, v.21). Para a caracterização das variáveis demográficas e clínico-laboratoriais foram utilizadas medidas de tendência central (média) e medidas de dispersão (desvio padrão) e realizados testes de hipóteses para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Na presença do cumprimento dos pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk), foi utilizado o Teste t de Student para amostras independentes, assumindo-se igualdade de variâncias através da aplicação do Teste de Levene. Na ausência do cumprimento dos pressupostos de normalidade foi utilizado o Teste U de Mann-Whitney para amostras independentes. Para os eventos dicotómicos foi utilizado o Teste do Qui-Quadrado (χ^2) ou o seu equivalente Teste Exacto de Fisher quando os pressupostos de normalidade não se encontravam cumpridos. Foram feitas comparações de incidência cumulativa de resposta molecular através da aplicação do Teste Log Rank (Mantel-Cox).

O valor preditivo foi determinado pelo cálculo das "áreas sob a curva" (AUC, *area under the curve*), utilizando o programa de análise estatística *MedCal*, assim como para a construção e análise das curvas de ROC (*receiver operating characteristic*), ao longo das quais foram identificados os valores de *cut-off* óptimos, através do cálculo do Younden (J) Index.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da população em estudo

Entre 1 de Janeiro de 2006 e 31 de Agosto de 2014 foram diagnosticados 24 doentes com Leucemia Mielóide Crónica. Ao diagnóstico todos os doentes se encontravam em fase crónica, tendo iniciado tratamento de primeira linha com IM 400mg id. O tempo médio de seguimento foi de 4,58 anos (mín=1,27; máx=9,07). Em 12 doentes foi necessário introduzir terapêutica inicial com Hidroxicarbamida com o intuito de citorredução temporária. Nenhum doente recebeu tratamento com Interferão antes de iniciar Imatinib.

Dos 24 doentes estudados, 16 eram do sexo masculino (66,7%) e 8 do sexo feminino (33,3%), com média de idades ao diagnóstico de 57,71 anos ($\pm 15,75$; mín=16; máx=76). Os parâmetros analíticos ao diagnóstico estão resumidos na Tabela 6. Foram calculados os índices de prognóstico EUTOS e Sokal em 21/24 doentes. De acordo com o índice EUTOS, 90,5% (19) foram classificados de baixo risco e 2 (9,5%) doentes de alto risco. Pelo cálculo do índice de Sokal, 3 (14,3%) doentes foram classificados de baixo risco, 9 (42,9%) de risco intermédio e 9 (42,9%) de alto risco (Tabela 6).

Durante o tempo de seguimento, 1 doente diminuiu de dose de IM e em 12 doentes foi necessário aumentar a dose. Destes, 4 doentes mudaram de linha de tratamento para TKI de 2ª geração: Nilotinib em 2 doentes (por presença de mutações de resistência ao IM) e Dasatinib em 2 doentes (um doente por presença de mutação de resistência e outro por não atingir RMM apesar de aumento de dose do IM, com pesquisa de mutações negativas).

Tabela 6. Caracterização da população em estudo

AMOSTRA TOTAL	
Nº de doentes (n)	24
Idade (anos)	57,71 ± 15,75
Sexo F/M n (%)	8 (33,3) / 16 (66,7)
Dados analíticos	
Hb (g/dL)	12,42 ± 1,81
Leuc (x10³/uL)	75,1 (141)
Pla_q (x10³/uL)	452,92 ± 299,51
Basófilos (%)	2,43 ± 1,8
Blastos (%)	2,3 ± 2,07
LDH (U/L)	1302,79 ± 852,41
Baço (cm)	13 ± 5,97
Tipo de transcrito	
e13a2 n (%)	8 (33,3)
e14a2 n (%)	16 (66,7)
Índice EUTOS	
Baixo n (%)	19 (90,5)
Alto n (%)	2 (9,5)
Índice de Sokal	
Baixo n (%)	3 (14,3)
Intermédio n (%)	9 (42,9)
Alto n (%)	9 (42,9)
QPCR inicial (%)	95,95 ± 55,26
Tempo QPCR3M (dias)	93,25 ± 18,43

Características clínico-laboratoriais ao diagnóstico, índices de prognóstico e tempo entre diagnóstico e monitorização dos 3 meses (QPCR3M) da população em estudo. São apresentados a média e o desvio padrão para todos os grupos, excepto quando identificadas as proporções (%) ou mediana (med).

4.2 Avaliação de resposta ao tratamento com Imatinib

Ao diagnóstico a quantificação do transcrito BCR-ABL1 foi em média de 95,95% (±55,26, mín=41; máx=264). Dos 24 doentes, 66,7% (16) expressavam o transcrito e14a2 (b3a2) e 33,3% (8) o transcrito e13a2 (b2a2) do gene de fusão *BCR-ABL1*. O tempo decorrido entre a quantificação ao diagnóstico e a primeira monitorização molecular foi em média 93,25 dias (±18,43, mín=58; máx=135).

4.3 Resposta aos 3, 6 e 12 meses de tratamento

Aos 3 meses de tratamento com Imatinib todos os doentes apresentaram Resposta Hematológica Completa (RHC), com excepção de um doente com trombocitose mantida apesar de resposta citogenética completa e resposta molecular óptima. Neste doente foi encontrada uma mutação no gene *CALR* que justificou a persistência da trombocitose ao longo do tempo de observação. Nenhum doente evoluiu para fase acelerada ou crise blástica.

Tendo em conta a avaliação de resposta molecular (RM) aos 3 meses de tratamento, os doentes foram divididos em 2 grupos: Grupo A (n=14) incluindo os doentes que apresentavam resposta molecular óptima (QPCR3M \leq 10%), e o Grupo B (n=10) incluindo os doentes que apresentavam resposta molecular sub-óptima (QPCR3M $>$ 10%) (Tabela 7).

Tabela 7. Análise comparativa dos doentes com resposta óptima e sub-óptima aos 3 meses

	QPCR3M \leq 10% (Grupo A)	QPCR3M $>$ 10% (Grupo B)	<i>p</i>
Nº de doentes (n)	14	10	-
Idade (anos)	59,43 \pm 15,22	55,3 \pm 16,98	<i>p</i> =0,53*
Sexo			
Feminino n (%)	6 (42,9)	2 (20)	<i>p</i> =0,38**
Masculino n (%)	8 (57,1)	8 (80)	<i>p</i> =0,38**
Dados analíticos			
Hb (g/dL)	12,61 \pm 1,99	12,14 \pm 1,58	<i>p</i> =0,54*
Leuc ($\times 10^3$ /uL)	57,55 (104,6)	166 (161,3)	<i>p</i> =0,14***
Pla α ($\times 10^3$ /uL)	436,86 \pm 288,68	475,4 \pm 328,49	<i>p</i> =0,76*
Basófilos (%)	1,96 \pm 1,72	3,1 \pm 1,77	<i>p</i> =0,13*
Blastos (%)	1,97 \pm 1,8	2,75 \pm 2,43	<i>p</i> =0,38*
LDH (U/L)	1319,21 \pm 851,75	1279,8 \pm 898,85	<i>p</i> =0,91*
Baço (cm)	11,75 \pm 3,09	14,25 \pm 8,34	<i>p</i> =0,606*
Tipo de transcrito			
e13a2 n (%)	16,7	4 (16,7)	<i>p</i> =0,67**
e14a2 n (%)	41,7	6 (25)	
Índice EUTOS			
Baixo n (%)	11 (100) [∞]	8 (80)	<i>p</i> =0,21**
Alto n (%)	0 (0)	2 (20)	

Índice de Sokal			
Baixo n (%)	3 (27,3) [∞]	0 (0)	
Intermédio n (%)	3 (27,3) [∞]	6 (60)	$p=0,25^{**}$
Alto n (%)	5 (45,4) [∞]	4 (40)	
QPCR inicial (%)	73,53 ± 25,52	127,33 ± 70,62	$p=0,04^*$
Tempo QPCR3M (dias)	92,43 ± 21,56	94,4 ± 13,92	$p=0,80^*$

Comparação das características clínico-laboratoriais, índices de prognóstico e tempo entre diagnóstico e monitorização dos 3 meses, entre o grupo de doentes com resposta óptima e sub-óptima aos 3 meses. São apresentados a média e o desvio padrão para todos os grupos, excepto quando identificadas as proporções (%) ou mediana (med). *Teste *t* de Student para amostras independentes **Teste Exacto de Fisher. ***Teste *U* de Mann Whitney para amostras independentes. [∞] 3 missing data

A comparação dos parâmetros demográficos e clínico-laboratoriais, tipo de transcrito e índice prognóstico não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo com resposta molecular sub-óptima aos 3 meses (Grupo B) apresentava valores de transcrito mais elevados ao diagnóstico (127,33±70,62 vs 73,53±25,52; $p=0,04$), com diferenças estatisticamente significativas.

Ao comparar os dois grupos em termos de respostas moleculares aos 6 e 12 meses de tratamento com Imatinib (Tabela 8) observámos que nenhum doente com resposta óptima aos 3 meses apresentou falência de resposta aos 6 e 12 meses. Os doentes do grupo B, com pior resposta molecular aos 3 meses, obtiveram piores respostas moleculares aos 6 meses, com maior número de casos de falência terapêutica (40% vs 0%, $p=0,02$) e menor número de doentes com resposta molecular óptima (20% vs 78,6%, $p=0,01$). Da mesma forma, aos 12 meses, o número de doentes com falência de resposta molecular foi maior no grupo B (40% vs 0%, $p=0,02$). No que diz respeito ao atingimento de resposta molecular óptima aos 12 meses (RMM), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,09$), no entanto, o número de doentes com falha de resposta molecular óptima aos 12 meses é superior no grupo B. Foi possível determinar uma

associação moderada entre o tipo de resposta molecular aos 3 meses e a obtenção de resposta molecular favorável ou não aos 6 meses, através do cálculo de *V* de *Cramer*.

Tabela 8. Respostas moleculares aos 6 e 12 meses de tratamento com Imatinib nos grupos A e B

	QPCR3M≤10% (Grupo A)	QPCR3M>10% (Grupo B)	<i>p</i>	<i>V Cramer</i>
Nº de doentes (n)	14	10	-	-
6 Meses				
QPCR6M<1% (resposta óptima)	11 (78,5)	2 (20)	<i>p</i> =0,01**	0,58
QPCR6M>10% (falência)	0	4 (40)	<i>p</i> =0,02**	0,529
12 Meses				
QPCR12M≤0,1% (resposta óptima)	10 (71,4)	3 (30)	<i>p</i> =0,09**	0,41
QPCR12M>1% (falência)	0	4 (40)	<i>p</i> =0,02**	0,529

Análise comparativa das respostas moleculares aos 6 e 12 meses entre os grupos A e B. QPCR6M<1%, resposta molecular óptima aos 6 meses de tratamento. QPCR6M>10%, falência de resposta molecular aos 6 meses de tratamento. QPCR12M≤0,1%, resposta molecular major aos 12 meses de tratamento. QPCR12M>1%, falência de resposta molecular aos 12 meses de tratamento. **Teste Exacto de Fisher.

De modo a determinar a probabilidade de alcançar respostas moleculares subsequentes, foi feita comparação da incidência cumulativa de RMM depois dos 12 meses de tratamento, RM^{4.0}, RM^{4.5} e RM^{5.0} entre os dois grupos, durante o período de tratamento com Imatinib (Figura 3). Observou-se que a probabilidade de obter RMM ao longo do tempo, assim como de obter respostas moleculares profundas, entre o grupo de doentes com resposta molecular óptima e sub-óptima aos 3 meses, não difere de forma estatisticamente significativa.

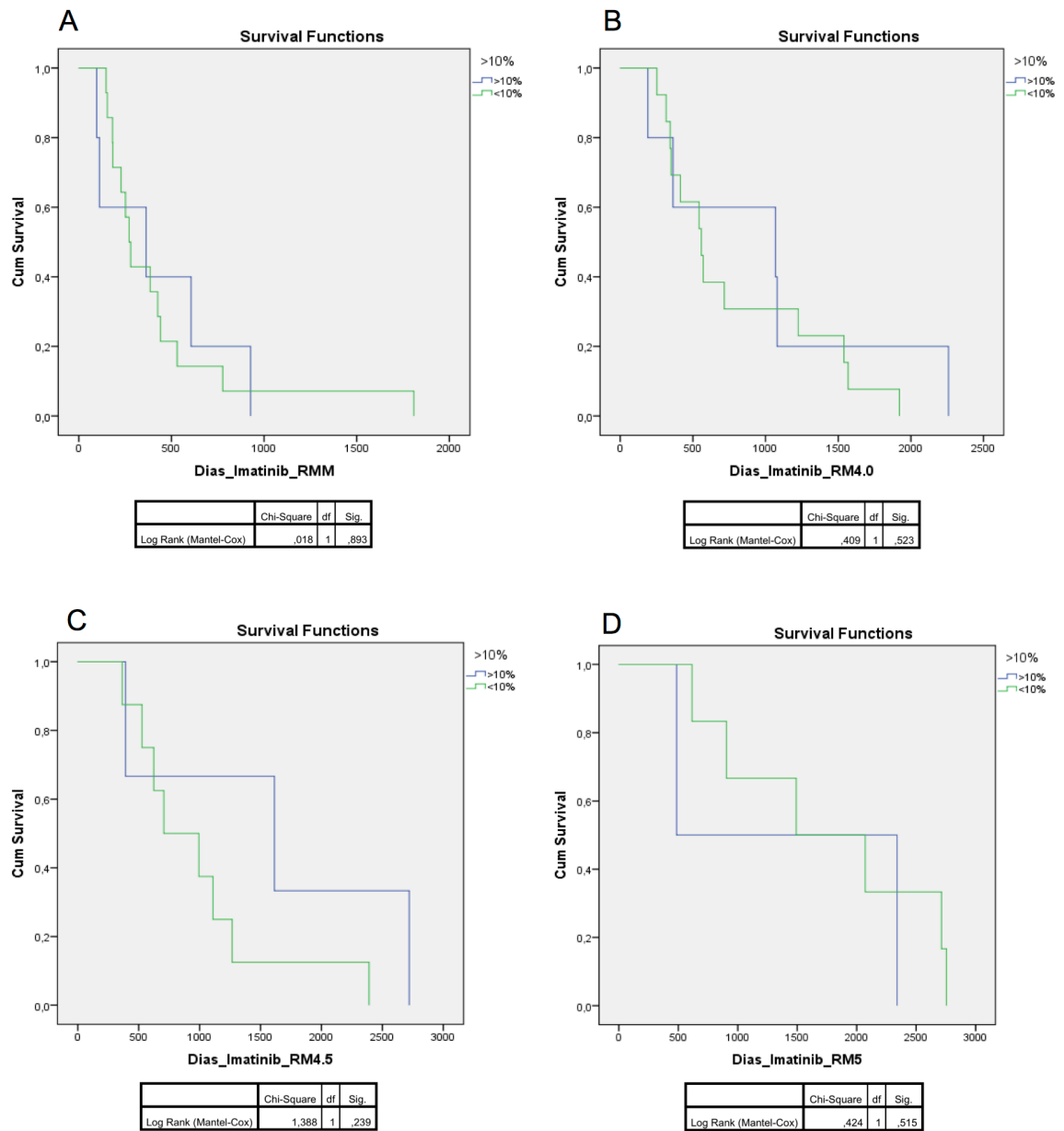


Figura 3. Incidência cumulativa de respostas moleculares com mais de 12 meses de tratamento com Imatinib Análise da incidência cumulativa de respostas moleculares após 12 meses de tratamento com Imatinib entre os grupos A e B. A) Resposta molecular major; B) Resposta molecular 4.0; C) Resposta molecular 4.5; D) Resposta molecular 5.0.

4.4 Doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses de tratamento

Dos 10 doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses de tratamento, 4 (40%) atingiram falência terapêutica aos 6 meses de tratamento. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos dados clínico-laboratoriais dos doentes com e sem falência de resposta aos 6 meses (Tabela 9). O tamanho do baço ao diagnóstico, apesar de não apresentar diferenças com significado estatístico, é maior no grupo com falência de resposta aos 6 meses. Quanto aos índices prognósticos não houve diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos. No entanto, todos os doentes sem critérios de falência aos 6 meses incluíam-se no grupo de baixo risco, segundo o índice EUTOS.

Tabela 9. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem falência de resposta aos 6 meses de tratamento

	QPCR6M>10% (falência)	QPCR6M<10%	<i>p</i>
Nº de doentes (n)	4	6	
Idade (anos)	55,25 ± 22,29	55,33 ± 14,86	<i>p</i> =0,99*
Sexo			
Mulheres n (%)	1 (25)	1 (16,7)	<i>p</i> =1**
Homens n (%)	3 (75)	5 (83,3)	
Dados analíticos			
Hb (g/dL)	11,7 (3)	12,8 (4)	<i>p</i> =0,47***
Leuc (x10³/uL)	238,52 ± 186,84	108,95 ± 75,87	<i>p</i> =0,15*
Plaq (x10³/uL)	386,5 ± 192,5	534,67 ± 401,8	<i>p</i> =0,46*
Basófilos (%)	3,77 ± 2,19	2,65 ± 1,47	<i>p</i> =0,35*
Blastos (%)	4,5 ± 2,5	2,8 ± 2,02	<i>p</i> =0,33*
LDH (U/L)	1141,25 ± 1077,01	1372,17 ± 855,99	<i>p</i> =0,71*
Baço (cm)	15,5 (19)	0 (0)	<i>p</i>=0,06***
Transcrito			
e13a2 n (%)	3 (75)	1 (16,7)	<i>p</i> =0,19**
e14a2 n (%)	1 (25)	5 (83,3)	
Índice EUTOS			
Baixo n (%)	2 (50)	6 (100)	<i>p</i> =0,13**
Alto n (%)	2 (50)	0	

Índice de Sokal			
Baixo n (%)	0	0	
Intermédio n (%)	1 (25)	5 (83,3)	$p=0,19^{**}$
Alto n (%)	3 (75)	1 (16,7)	
QPCR Inicial (%)	91,52 ± 48,45	151,2 ± 76,55	$p=0,2^*$

Análise comparativa dos doentes com e sem falência de resposta aos 6 meses de tratamento, dentro do grupo B. *Teste *t* de Student para amostras independentes. **Teste Exacto de Fisher. ***Teste *U* de Mann Whitney para amostras independentes. É apresentado a média e desvio padrão para todos os grupos excepto quando identificado as proporções (%) ou mediana (med).

Apenas 2 doentes alcançaram respostas moleculares óptimas ao 6 meses de tratamento (Tabela 10). Comparando com os doentes que não o conseguiram, observaram-se diferenças estatisticamente significativas no valor de hemoglobina e de plaquetas ao diagnóstico: os doentes com resposta óptima apresentavam valores mais elevados de hemoglobina (14,2 vs 11,7, $p=0,04$) e plaquetas (1040,5 vs 332,5, $p=0,04$).

Tabela 10. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem resposta óptima aos 6 meses de tratamento

	QPCR6M<1% (boa resposta)	QPCR6M>1%	<i>p</i>
Nº de doentes (n)	2	8	
Idade (anos)	42,5 (-)	58,5 (20)	$p=0,26^{***}$
Sexo			
Mulheres n (%)	1 (50)	1 (12,5)	$p=0,37^{**}$
Homens n (%)	1 (50)	7 (87,5)	
Dados analíticos			
Hb (g/dL)	14,2 (-)	11,7 (3)	$p=0,04^{***}$
Leuc (x10³/uL)	35,8 (-)	198,5 (121)	$p=0,08^{***}$
Plaq (x10³/uL)	1040,5 (-)	332,5 (206)	$p=0,04^{***}$
Basófilos (%)	4,05	2,25 (3,3)	$p=0,26^{***}$
Blastos (%)	1,85	3,9 (4,5)	$p=0,42^{***}$
LDH (U/L)	777,5	1434 (2160)	$p=0,53^{***}$
Baço (cm)	0 (-)	2 (18)	$p=0,4^{***}$
Transcrito			
e13a2 n (%)	0 (0)	4 (50)	$p=0,46^{**}$
e14a2 n (%)	2(100)	4 (50)	

Índice EUTOS			
Baixo n (%)	2 (100)	6 (75)	$p=1^{**}$
Alto n (%)	0(0)	2 (25)	
Índice de Sokal			
Baixo n (%)	0	0	$p=1^{**}$
Intermédio n (%)	1 (50)	5 (62,5)	
Alto n (%)	1(50)	3(37,5)	
QPCR Inicial (%)	165,5	79,55 (79,92)	$p=0,4^{***}$

Análise comparativa dos doentes com e sem resposta óptima aos 6 meses de tratamento, dentro do grupo B. *Teste *t* de Student para amostras independentes. **Teste Exacto de Fisher. ***Teste *U* de Mann Whitney para amostras independentes. É apresentado a média e desvio padrão para todos os grupos excepto quando identificado as proporções (%) ou mediana (med).

De forma semelhante, analisaram-se as diferenças clínico-laboratoriais entre os doentes que tiveram falência de resposta molecular aos 12 meses ($n=4$) e os que não tiveram ($n=6$) (Tabela 11). O grupo com falência de resposta aos 12 meses apresentava, ao diagnóstico, valores mais baixos de hemoglobina (10,9 vs 12,9, $p=0,03$) e de leucócitos (267,75 vs 89,46, $p=0,03$). O tamanho do baço era maior no grupo de doentes com falência terapêutica aos 12 meses, embora sem significado estatístico.

Tabela 11. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem falência de resposta aos 12 meses de tratamento

	QPCR12M>1% (falência)	QPCR12M<1%	<i>p</i>
Nº de doentes (n)	4	6	
Idade (anos)	62 (36)	55 (23)	<i>p</i> =0,91***
Sexo			
Mulheres n (%)	1 (25)	1 (16,7)	<i>p</i> =1**
Homens n (%)	3 (75)	5 (83,3)	
Dados analíticos			
Hb (g/dL)	10,9±0,91	12,9 ± 1,42	<i>p</i> =0,03*
Leuc (x10 ³ /uL)	267,75 ± 150,94	89,46 ± 76,38	<i>p</i> =0,03*
Pla _q (x10 ³ /uL)	403,25 ± 183,79	523,5 ± 408,69	<i>p</i> =0,54*
Basófilos (%)	3,9 ± 2,06	2,56 ± 1,49	<i>p</i> =0,26*
Blastos (%)	4,2 ± 2,1	2,67 ± 2,31	<i>p</i> =0,36*
LDH (U/L)	1157,5 ± 1070,7	1361,3± 864	<i>p</i> =0,74*
Baço (cm)	15,5 (19)	0 (-)	<i>p</i> =0,06***
Transcrito			
e13a2 n (%)	2 (50)	2 (33,3)	<i>p</i> =1**
e14a2 n (%)	2 (50)	4 (66,7)	
Índice EUTOS			
Baixo n (%)	2 (50)	6 (100)	<i>p</i> =0,13**
Alto n (%)	2 (50)	0	
Índice de Sokal			
Baixo n (%)	0	0	<i>p</i> =0,19**
Intermédio n (%)	1 (25)	5 (83,3)	
Alto n (%)	3 (75)	1 (16,7)	
QPCR Inicial (%)	117,77 ± 99,13	133,7 ± 55,41	<i>p</i> =0,74*

Análise comparativa dos doentes com e sem falência de resposta aos 12 meses de tratamento, dentro do grupo B. *Teste *t* de Student para amostras independentes. **Teste Exacto de Fisher. ***Teste *U* de Mann Whitney para amostras independentes. É apresentado a média e desvio padrão para todos os grupos excepto quando identificado as proporções (%) ou mediana (med).

Entre os 3 doentes que atingiram resposta molecular major aos 12 meses de tratamento e os que não o conseguiram fazer (n=7), não houve diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros estudados (Tabela 12). Todavia, nenhum doente com resposta óptima aos 12 meses de tratamento se incluía no grupo de alto risco do índice EUTOS.

Tabela 12. Análise comparativa dos doentes do grupo B com e sem resposta óptima aos 12 meses de tratamento

	QPCR12M≤0,1% (boa resposta)	QPCR12M>0,1%	<i>p</i>
Nº de doentes (n)	3	7	
Idade (anos)	57 (-)	64 (16)	<i>p</i> =0,91***
Sexo			
Mulheres n (%)	1 (33,3)	1 (14,3)	<i>p</i> =1**
Homens n (%)	2 (66,7)	6 (85,7)	
Dados analíticos			
Hb (g/dL)	14,2 (-)	11,7 (2)	<i>p</i> =0,26***
Leuc (x10 ³ /uL)	46,2 (-)	199 (181)	<i>p</i> =0,18***
Pla _q (x10 ³ /uL)	777,33 ± 470,71	346 ± 151,29	<i>p</i> =0,25*
Basófilos (%)	3,36 ± 1,87	2,98 ± 1,86	<i>p</i> =0,77*
Blastos (%)	3,23 ± 2,48	3,65 ± 2,33	<i>p</i> =0,85*
LDH (U/L)	1184,67 ± 709,7	1320,57 ± 1018,6	<i>p</i> =0,84*
Baço (cm)	0 (-)	11 (19)	<i>p</i> =0,18***
Transcrito			
e13a2 n (%)	0	4 (57,1)	<i>p</i> =0,2**
e14a2 n (%)	3 (100)	3 (42,9)	
Índice EUTOS			
Baixo n (%)	3 (100)	5 (71,4)	<i>p</i> =1**
Alto n (%)	0	2 (28,6)	
Índice de Sokal			
Baixo n (%)	0	0	<i>p</i> =1**
Intermédio n (%)	2 (66,7)	4 (57,1)	
Alto n (%)	1 (33,3)	3 (42,9)	
QPCR Inicial (%)	116 (-)	92 (122,2)	<i>p</i> =1***

Análise comparativa dos doentes com e sem resposta óptima aos 12 meses de tratamento, dentro do grupo B. *Teste *t* de Student para amostras independentes. **Teste Exacto de Fisher. ***Teste *U* de Mann Whitney para amostras independentes. É apresentado a média e desvio padrão para todos os grupos excepto quando identificado as proporções (%) ou mediana (med).

4.5 Pesquisa de mutações do gene *BCR-ABL1*

Foram pesquisadas mutações de resistência ao Imatinib em 5 doentes, todos com resposta sub-óptima aos 3 meses. Em 2 doentes foram identificadas as mutações E459K e E359F no domínio cinase do gene de fusão *BCR-ABL1*. O doente com a mutação E459K apresentou critérios de falência aos 6 e 12 meses, e o doente com a mutação E359F apresentava respostas sub-

óptimas aos 6 e 12 meses, assim como os restantes 3 doentes sem mutações identificadas.

4.6 Valor preditivo do *halving time* e redução logarítmica

Para o grupo de doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses, foi avaliado o valor preditivo do *halving time* e da redução logarítmica, calculados aos 3 meses de tratamento, nas respostas moleculares subsequentes (aos 6 e 12 meses). Para tal, foram calculadas as AUC para cada uma destas metodologias e analisadas as suas significâncias estatísticas (Tabela 13).

Tabela 13. Valor preditivo do *halving time* e da redução logarítmica na resposta molecular aos 6 e 12 meses

Avaliação aos 3 meses	Resposta Molecular	AUC	IC 95%	p
<i>Halving Time</i>	QPCR6M<1%	0,93	0,60-1	p<0,0001*
	QPCR6M>10%	0,83	0,47-0,98	p=0,02*
	QPCR12M≤0,1%	0,81	0,45-0,97	p=0,05
	QPCR12M>1%	0,75	0,39-0,95	p=0,23
Redução Log	QPCR6M<1%	0,96	0,64-1	p<0,0001*
	QPCR6M>10%	0,79	0,43-0,97	p=0,12
	QPCR12M≤0,1%	0,83	0,47-0,98	p=0,03*
	QPCR12M>1%	0,85	0,50-0,99	p=0,01*

Cálculo e análise do valor preditivo do *halving time* e da redução logarítmica na resposta molecular, calculados aos 3 meses de tratamento, no grupo B. AUC - área sob a curva.

*Significado estatístico entre as variáveis.

Observou-se que o *halving time* tem valor preditivo de resposta molecular para a falência de resposta aos 6 meses (AUC=0,83; IC95%=047-0,98;

$p=0,02$) e, principalmente, para a resposta molecular óptima (AUC=0,93; IC95%=0,6-1; $p<0,0001$).

A redução logarítmica aos 3 meses foi fortemente preditiva da resposta molecular óptima aos 6 meses (AUC=0,96; IC95%=0,64-1; $p<0,0001$) e aos 12 meses (AUC=0,83; IC95%=0,47-0,98; $p=0,03$) de tratamento. A redução logarítmica não prediz a ocorrência de falência aos 6 meses, no entanto é a melhor a predizer falência (AUC=0,85; IC95%=0,50-0,99; $p=0,01$) aos 12 meses de tratamento.

Quando realizada a comparação por pares destas duas metodologias, calculando a diferença de AUC (DAUC), não se observaram diferenças estatisticamente significativas para os valores preditivos de resposta molecular aos 6 e 12 meses (Anexo 1, tabela 1).

Para cada uma das metodologias, procedeu-se ao cálculo do *cut-off* óptimo para predizer resposta molecular, através do Younden (*J*) Index (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de *cut-off* óptimos preditivos de resposta molecular do *halving time* e da redução logarítmica

Avaliação aos 3 meses	Resposta Molecular	Younden índice (<i>J</i>)	Ponto de <i>cut-off</i>	S	E
Halving Time	QPCR6M<1%	0,87 (0,50-1)	22,59 (22,59-29,13)	100	50
	QPCR6M>10%	0,58 (0,33-0,83)	122,31 (28,67-503,06)	83,3	75
	QPCR12M≤0,1%	0,57 (0,33-0,85)	22,59 (22,59 -29,13)	100	33,3
	QPCR12M>1%	0,58 (0,25-1)	122,31 (22,59-503,06)	83,3	75
Redução Log	QPCR6M<1%	0,87 (0,50-1)	-1,1 (-1,1 – -1)	100	50
	QPCR6M>10%	0,58 (0,25-1)	- 0,2 (-1,1 – -0,1)	83,3	75
	QPCR12M≤0,1%	0,57 (0,23-0,85)	-1,1 (-1,1 – -1)	100	33,3
	QPCR12M>1%	0,58 (0,26-0,83)	- 0,2 (-1 – -0,1)	83,3	75

Cálculo dos valores de *cut-off* óptimos preditivos de resposta molecular para o *halving time* (em dias) e redução logarítmica (em log de redução), calculados aos 3 meses de tratamento,

no grupo B. Por forma a obter os intervalos de confiança, foi necessário aplicar o método de *bootstrap* para simular a análise para uma amostra de 1000 valores, extrapolando o ponto de *cut-off*.

Quando aplicados à predição de resposta molecular óptima aos 6 meses, o *halving time* e a redução logarítmica obtiveram os valores J mais preditivos ($J=0,87$). Um valor de *halving time* de 22,59 dias e uma redução logarítmica de $-1,1\log$ aos 3 meses de tratamento, parecem ter um bom poder discriminativo dos doentes que alcançam resposta molecular óptima aos 6 meses. Para os restantes pontos, nenhuma variável apresentou capacidade discriminativa de resposta aceitável.

5. DISCUSSÃO

A monitorização de resposta ao tratamento com inibidores das tirosina-cinases na Leucemia Mielóide Crónica passa pela avaliação da resposta hematológica, citogenética e molecular em *timings* bem estabelecidos, estando definidos critérios de resposta óptima, sub-óptima e falência aos 3, 6 e 12 meses de tratamento. Os doentes com mais de 10% de transcrito BCR-ABL1 aos 3 meses de tratamento com Imatinib são considerados como tendo resposta sub-óptima e pior prognóstico a longo prazo. No entanto, existe uma considerável proporção de doentes que atingem respostas moleculares favoráveis posteriormente.

A Leucemia Mielóide Crónica é uma neoplasia mieloproliferativa associada à presença de um gene de fusão *BCR-ABL1*, decorrente da translocação $t(9;22)(q34;q11)$, que sintetiza uma proteína de fusão oncogénica com actividade de tirosina-cinase. A monitorização de resposta ao tratamento com inibidores de tirosina-cinases passa pela avaliação da resposta hematológica, citogenética e molecular, estando definidos critérios de resposta óptima, sub-óptima e falência aos 3, 6 e 12 meses de tratamento. Os doentes com >10% de transcrito BCR-ABL1 aos 3 meses são considerados como tendo resposta sub-óptima ao tratamento e pior prognóstico a longo prazo.

A ideia de que a carga tumoral ao diagnóstico influencia o tipo de resposta obtida numa fase precoce de tratamento, levou a que alguns autores estudassem o contributo da avaliação da velocidade de decréscimo do transcrito BCR-ABL1 entre o diagnóstico e os 3 meses de tratamento. Para além do conceito de redução logarítmica, já anteriormente utilizado para monitorizar resposta ao tratamento, o halving time surgiu recentemente como

um novo parâmetro de cinética de transcrito que poderá melhor discriminar os doentes com respostas sub-ótimas aos 3 meses.

Neste trabalho analisámos, retrospectivamente, um grupo de 24 doentes com Leucemia Mielóide Crónica, em tratamento com Imatinib, de modo avaliar as diferenças clínico-laboratoriais entre os doentes que atingiram resposta óptima (QPCR3M \leq 10%) e sub-óptima (QPCR3M $>$ 10%) aos 3 meses de tratamento.

Ao diagnóstico, todos os doentes se encontravam em fase crónica, nenhum doente evoluiu para fase acelerada e/ou crise blástica e não se registaram mortes, num tempo médio de seguimento de 4,58 anos. A maioria dos doentes era do sexo masculino (66,7%) e expressava o transcrito e14a2 do gene de fusão *BCR-ABL1* (66,7%), tal como observado noutros estudos. Ao diagnóstico a quantificação inicial de transcrito BCR-ABL1 foi em média de 95,95% (41-264%). Relativamente aos índices de prognóstico, 90,5% (19) do doentes tinha um EUTOS baixo e apenas 2 tinham de alto risco. Tendo em conta o índice de Sokal, 57% dos doentes estava no grupo de risco baixo/intermédio e 43% no grupo de alto risco.

Aos 3 meses de tratamento com Imatinib, dos 24 doentes estudados, 14 apresentavam resposta óptima e 10 doentes resposta sub-óptima. O tempo decorrido entre o diagnóstico e a monitorização molecular dos 3 meses não diferiu de forma significativa entre os dois grupos, assegurando a possibilidade de comparação dos parâmetros de resposta molecular e cinética do transcrito.

A estratificação de risco não diferiu de forma estatisticamente significativa entre os dois grupos. No entanto, foi possível verificar que todos os doentes com resposta óptima aos 3 meses tinham EUTOS baixo e que nenhum doente com resposta sub-óptima apresentava um índice de Sokal de baixo risco.

Relativamente às restantes características clinico-laboratoriais, apenas a percentagem de transcrito ao diagnóstico diferiu de forma estatisticamente significativa, sendo superior no grupo de resposta molecular sub-ótima ($127,33 \pm 70,62$ vs $73,53 \pm 25,52$; $p=0,04$). Estes resultados sugerem que o valor de transcrito ao diagnóstico poderá condicionar a capacidade de atingir valores de transcrito $<10\%$ aos 3 meses de tratamento. Neste sentido, a carga tumoral inicial parece influenciar negativamente a taxa e/ou rapidez de resposta ao tratamento, e, conseqüentemente, afectar o prognóstico dos doentes. De facto, Vigneri *et al* ⁽³¹⁾ observaram que o grupo de doentes com maior carga tumoral ao diagnóstico apresentava menores taxas de sobrevivência livre de progressão e sobrevivência livre de falência.

Ao comparar a resposta molecular aos 3 meses com as respostas subseqüentes, verificou-se que a proporção de doentes com critérios de falência aos 6 e 12 meses foi maior no grupo com resposta sub-ótima sendo que nenhum doente com resposta ótima aos 3 meses apresentou falência. Estes dados corroboram a associação entre resposta molecular precoce aos 3 meses e o tipo de resposta molecular atingida posteriormente. Contudo, verificou-se que a probabilidade de obter resposta molecular major e resposta molecular profunda após os 12 meses não diferiu de forma significativa entre o grupo de doentes com resposta molecular ótima e sub-ótima aos 3 meses. De ressaltar que em 12 casos foi necessário aumentar a dose de Imatinib administrada por respostas citogenética ou molecular sub-ótimas.

Durante o tempo de seguimento, em 5 doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses, 2 tinham mutações no domínio cinase do *ABL* (E459K e F359V).

No grupo de 10 doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses de tratamento, avaliámos as respostas moleculares aos 6 e 12 meses. Em relação à avaliação de resposta molecular aos 6 meses, a maioria dos doentes não teve falência de resposta (60%) e destes nenhum tinha EUTOS alto. Este resultados demonstram que o valor de QPCR $>10\%$ aos 3 meses

não discrimina completamente os doentes neste ponto de avaliação molecular. Ou seja, neste estudo, observámos que a maioria dos doentes com resposta sub-ótima uma considerável proporção de doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses, ainda assim, atingiu respostas aceitáveis aos 6 meses, apenas 2 doentes tiveram critérios de falência.

Os 2 doentes que alcançaram respostas moleculares ótimas aos 6 meses apresentavam valores mais elevados de hemoglobina (14,2 vs 11,7, $p=0,04$) e de plaquetas (1040,5 vs 332,5, $p=0,04$) ao diagnóstico. No que diz respeito à avaliação de resposta molecular aos 12 meses, a maioria dos doentes não apresentou falência de resposta (60%), sendo que 50% destes atingiu resposta molecular major. Nenhum doente com resposta óptima aos 12 meses de tratamento se incluía no grupo de alto risco do índice EUTOS. Os doentes com falência de resposta aos 12 meses apresentavam, ao diagnóstico, valores mais baixos de hemoglobina (10,9 vs 12,9, $p=0,03$) e de leucócitos (267,75 vs 89,46, $p=0,03$).

No grupo de doentes com resposta sub-ótima aos 3 meses ($n=10$), analisámos a capacidade do *halving time* e da redução logarítmica calculadas aos 3 meses, em prever respostas moleculares aos 6 e 12 meses. Observámos que o *halving time* tinha um bom valor preditivo para falência de resposta aos 6 meses ($AUC=0,83$, $p=0,02$), mas principalmente para prever resposta molecular óptima ($AUC=0,93$, $p<0,0001$). Ou seja, o *halving time* aos 3 meses parece discriminar quais os doentes que alcançarão respostas moleculares favoráveis aos 6 meses. No grupo de doentes analisado encontrámos um valor de *halving time* de 22,59 dias como *cut-off* óptimo para prever resposta molecular óptima aos 6 meses. O seu valor preditivo para resposta molecular óptima aos 12 meses aproximou-se de significância estatística ($p=0,05$)

Como sublinhado por Branford *et al* ⁽³³⁾, o *halving time* complementa o valor prognóstico da quantificação de transcrito aos 3 meses (inferior ou superior a

10%), auxiliando na tomada de decisão terapêutica numa fase precoce de tratamento. Estes autores encontraram um valor de 76 dias para prever resposta molecular óptima aos 12 meses em doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses, utilizando como gene controlo o *BCR*. Por outro lado, Huet *et al* ⁽³⁴⁾ obtiveram um valor de *halving time* de 19 e 21 dias, consoante o gene-controlo usado, *ABL* ou *GUS*, independentemente da resposta aos 3 meses, como discriminativos de resposta molecular major aos 12 meses.

Por outro lado, uma redução logarítmica de $-1,1\log$ calculada aos 3 meses foi altamente preditiva de resposta molecular óptima aos 6 meses, mantendo o seu poder preditivo aos 12 meses, embora sem poder estatístico para calcular um *cut-off* aceitável.

Ao contrário do valor de QPCR aos 3 meses, aferido a uma escala internacional, o *halving time* e a redução logarítmica são metodologias dependentes do conhecimento do valor de transcrito ao diagnóstico. Daí que a sua aplicação esteja limitada pelo facto de requerem que a quantificação dos transcritos seja efectuada no mesmo laboratório, de modo a assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

Embora a amostra seja reduzida, os resultados encontrados reforçam a ideia de que um valor de transcrito inicial mais elevado influencia a resposta molecular obtida aos 3 meses (superior ou inferior a 10%). Assim, como descrito noutros estudos, a avaliação da velocidade de decréscimo dos transcrito BCR-ABL torna-se fundamental num ponto de avaliação precoce como é o dos 3 meses. Neste trabalho, o *halving time* e a redução logarítmica revelaram ter um bom valor preditivo para discriminar respostas moleculares subsequentes em doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses. No entanto, a capacidade para definir um *cut-off* óptimo preditivo de resposta foi limitada no que diz respeito à avaliação dos 12 meses. Deste modo, seria importante aumentar o tamanho da amostra para poder retirar maior significado estatístico e avaliar a reprodutibilidade destes resultados.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, analisámos retrospectivamente um grupo de 24 doentes com Leucemia Mielóide Crónica, em fase crónica, em tratamento com Imatinib, de modo a avaliar as diferenças clínico-laboratoriais entre os doentes que atingiram resposta óptima e sub-óptima aos 3 meses.

Observámos que os doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses de tratamento apresentavam um valor estatisticamente mais elevado de transcrito ao diagnóstico, quando comparado com os doentes com resposta óptima. Isto sublinha a importância que o valor de transcrito inicial tem quando se trata de uma avaliação de resposta precoce.

Avaliámos igualmente de que maneira as metodologias de cinética de transcrito poderiam prever respostas moleculares subsequentes nos doentes com resposta sub-óptima aos 3 meses.

Na avaliação de parâmetros de cinética no grupo dos doentes com resposta sub-óptima, verificámos que tanto o *halving time* como a redução logarítmica apresentam valor preditivo de resposta molecular aos 6 e 12 meses.

A aplicação destes conceitos, juntamente com a quantificação de transcrito, poderá discriminar melhor os doentes com respostas sub-óptimas que responderão, num ponto de avaliação precoce, como é o dos 3 meses de tratamento.

7. ANEXO 1

Tabela 1. Comparação por pares do valor preditivo de resposta molecular do *halving time* e da redução logarítmica

Avaliação aos 3 meses	Resposta Molecular	DAUC	IC 95%	<i>p</i>
Halving Time vs Redução Log	QPCR6M<1%	0,03	-0,12-0,18	<i>p</i> =0,69
	QPCR6M>10%	0,04	-0,13-0,21	<i>p</i> =0,64
	QPCR12M≤0,1%	0,02	-0,09-0,14	<i>p</i> =0,069
	QPCR12M>1%	0,10	-0,07-0,28	<i>p</i> =0,26

Comparação por pares do valor preditivo do halving time e da redução logarítmica, calculados aos 3 meses de tratamento, através do cálculo da diferença da área sob a curva (DAUC).

8. BIBLIOGRAFIA

1. Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M, Thiele J. Chronic Myelogenous Leukemia, BCR-ABL1 positive. 2008 WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. 2008;
2. Demehri S, Paschka P, Schultheis B, Lange T, Koizumi T, Sugimoto T, Branford S, Lim LC, Kegel T, Martinelli G, Hochhaus A, Druker BJ, Deininger MW. e8a2 BCR-ABL: more frequent than other atypical BCR-ABL variants? *Leukemia*. 2005;19,681-684;
3. Deininger MW. Chronic myeloid leukemia. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th ed. 2014;
4. Olmedillas JL, Casares MT, Encinas MP. Manual para el control y et tratamiento de los pacientes con leucemia mielóide crónica. Edición 2014;
5. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Martinelli G, Mayer J, Müller MC, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Roussetot P, Saglio G, Sauße S, Schiffer C, Silver R, Simonsson B, Steegmann JL, Goldman JM, Hehlmann R. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884;
6. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia, V.1.2016. NCCN.org;
7. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, *et al*. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789-99;
8. Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(11):850-8;

- 9.** Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, Guilhot F, Porkka K, Ossenkoppele G, Lindoerfer D, Simonsson B, Pffirmann M, Hehlmann R. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686-92;
- 10.** Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R; European LeukemiaNet. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-1820;
- 11.** Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37;
- 12.** Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82(6):1929-36;
- 13.** Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Mason PJ, van Rhee F, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood*. 1996;87(4):1549-55;
- 14.** Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, De Witte T. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol*. 1998;102(3):768-74;
- 15.** Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999;107(3):587-99;
- 16.** Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in

leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2474–2486;

17. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM, Radich JP; International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1423-32;

18. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2318-57;

19. Cross NC, White HE, Müller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(10):2172-5;

20. Cross N, Muller M, Pane F, Hochhaus A, EUTOS molecular monitoring steering group. Working definitions of molecular response in CML. *Blood* 2013;122(6):872-84;

21. Morotti A, Fava C, Saglio G. Milestones and monitoring. *Curr Hematol Malig Rep.* 2015;10(2):167-72;

22. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348(11):994-1004;

23. Kantarjian H, O'Brien S, Shan J, Huang X, Garcia-Manero G, Faderl S, Ravandi-Kashani F, Verstovsek S, Beth Rios M, Cortes J. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: need for new response definitions? *Cancer.* 2008;112(4):837-45;

24. Lee SE, Choi SY, Oh YJ, Kim SH, Song HY, Yoo HL, Lee MY, Chae MJ, Kang KH, Hwang HJ, Jang EJ, Kim DW. Distinct predictive factors influence on achievement of early

molecular response by frontline imatinib in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2015;39(4):411-8;

25. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, Druker BJ, Guilhot F, Larson RA, O'Brien SG, Rudoltz MS, Mone M, Wehrle E, Modur V, Goldman JM, Radich JP; IRIS investigators. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood.* 2010;116(19):3758-65;

26. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, Gerrard G, Wang L, Szydlo RM, Clark RE, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Pavlu J, Paliompeis C, Reid A, Rezvani K, Goldman JM, Foroni L. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol.* 2012;30(3):232-8;

27. Neelakantan P, Gerrard G, Lucas C, Milojkovic D, May P, Wang L, Paliompeis C, Bua M, Reid A, Rezvani K, O'Brien S, Clark R, Goldman J, Marin D. Combining BCR-ABL1 transcript levels at 3 and 6 months in chronic myeloid leukemia: implications for early intervention strategies. *Blood.* 2013;121(14):2739-42;

28. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Chronic Myelogenous Leukemia, V.1.2009. NCCN.org;

29. Rohon P, Faber E, Divoka M, Rozmanova S, Friedecky D, Jarosova M, Indrak K. A significant proportion of patients with chronic myeloid leukemia and suboptimal response according to European Leukemia Net criteria have excellent prognosis without treatment change. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Jun;157(2):181-8;

30. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European Leukemia Net. *J Clin Oncol* 2009;27:1-11;

31. Vigneri et al. High BCR-ABL Levels At Diagnosis Are Associated with Unfavorable Responses to Imatinib Mesylate. 2012 Abstract ASH;

32. Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Dietz C, Erben P, Fabarius A, Proetel U, Schnittger S, Krause SW, Schubert J, Einsele H, Hänel M, Dengler J,

Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Pffirmann M, Hasford J, Hofmann WK, Hochhaus A, Müller MC; SAKK and the German CML Study Group. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014;28(10):1988-92;

33. Branford S, Yeung DT, Parker WT, Roberts ND, Purins L, Braley JA, Altamura HK, Yeoman AL, Georgievski J, Jamison BA, Phillis S, Donaldson Z, Leong M, Fletcher L, Seymour JF, Grigg AP, Ross DM, Hughes TP. Prognosis for patients with CML and >10% BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. *Blood*. 2014;124(4):511-8;

34. Huet S, Cony-Makhoul P, Heiblig M, Tigaud I, Gazzo S, Belhabri A, Souche D, Michallet M, Magaud JP, Hayette S, Nicolini F. Major molecular response achievement in CML Patients can be predicted by BCR-ABL1/ABL1 or BCR-ABL1/GUS ratio at an earlier time point of follow-up than currently recommended. *PLoS One*. 2014;9(9):e106250. doi: 10.1371/journal.pone.0106250.eCollection 2014.

35. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Szydlo R, Mahon FX, Kozlowski K, Paliompeis C, Foroni L, Khorashad JS, Bazeos A, Molimard M, Reid A, Rezvani K, Gerrard G, Goldman J, Marin D. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood*. 2011;117(14):3733-6;

36. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, Apperley JF, Szydlo R, Desai R, Kozlowski K, Paliompeis C, Latham V, Foroni L, Molimard M, Reid A, Rezvani K, de Lavallade H, Guallar C, Goldman J, Khorashad JS. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*. 2010;28:2381-2388;

37. Noens L, van Lierde MA, De Bock R, Verhoef G, Zachée P, Berneman Z, Martiat P, Mineur P, Van Eygen K, MacDonald K, De Geest S, Albrecht T, Abraham I. Prevalence, determinants and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. *Blood*. 2009;113(22):5401-11;

38. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Müller MC, Pietsch N, Proetel U, Haferlach C, Schlegelberger B, Balleisen L, Hänel M, Pffirmann M, Krause SW, Nerl C, Pralle H, Gratwohl A, Hossfeld DK, Hasford J, Hochhaus A, Saussele S. Tolerability-adapted

imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon- α in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1634-42;

39. Proetel U, Pietsch N, Lauseker M, Müller MC, Hanfstein B, Krause SW, Kalmanti L, Schreiber A, Heim D, Baerlocher GM, Hofmann WK, Lange E, Einsele H, Wernli M, Kremers S, Schlag R, Müller L, Hänel M, Link H, Hertenstein B, Pffirman M, Hochhaus A, Hasford J, Hehlmann R, Saußebe S; German Chronic Myeloid Leukemia Study Group; Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK). Older patients with chronic myeloid leukemia (≥ 65 years) profit more from higher imatinib doses than younger patients: a subanalysis of the randomized CML-Study IV. *Ann Hematol*. 2014;93(7):1167-76;

40. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, Molimard M, Krajcinovic M, Mahon FX. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;112(5):2024-7;

41. Angelini S, Soverini S, Ravegnini G, Barnett M, Turrini E, Thornquist M, Pane F, Hughes TP, White DL, Radich J, Kim DW, Saglio G, Cilloni D, Iacobucci I, Perini G, Woodman R, Cantelli-Forti G, Baccarani M, Hrelia P, Martinelli G. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*. 2013;98(2):193-200;

42. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, Gathmann I, Wang Y; IRIS (International Randomized Interferon vs STI571) Study Group. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-8;

43. Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon FX. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109(8):3496-9;

44 Lamontanara AJ1, Gencer EB, Kuzyk O, Hantschel O. Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834(7):1449-59;

45. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Müller MC, Ernst T, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors:

recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia Net. *Blood*. 2011;118(5):1208-15;

46. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-83;

47. Meissner RV, Covas DT, Dias P, Job F, Leite M, Nardi NB. Analysis of mRNA transcripts in CML patients. Analysis of mRNA transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Genet Mol Biol* 1999;22:475-479;

48. Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E, Holm MS, Nielsen JL, Hokland P. Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol* 2001;67:302-308;

49. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, Fabarius A, Proetel U, Schnittger S, Haferlach C, Krause SW, Schubert J, Einsele H, Hänel M, Dengler J, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Pfirrmann M, Hasford J, Hofmann WK, Hochhaus A, Müller MC; SAKK and the German CML Study Group. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*. 2014;99(9):1441-7;

50. Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Davies A, Knight K, Watmough SJ, Wang L, Clark RE. Chronic myeloid leukemia with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica* 2009;94:1362-1367;

51. de Lemos JA, de Oliveira CM, Scerni AC, Bentes AQ, Beltrão AC, Bentes IR, Azevedo TC, Maradei-Pereira LM. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res* 2005;4(4):803-11;

52. Polampalli S, Choughule A, Negi N, Shinde S, Baisane C, Amre P, Subramanian PG, Gujral S, Prabhash K, Parikh P. Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. *Genet Mol Res* 2008;7(4):1138-49;

- 53.** Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia-Manero G, Faderl S, Thomas DA, Wierda W, Ferrajoli A, Jeha S, Kantarjian HM. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003;101(10):3794-800;
- 54.** Fabarius A1, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, Göhring G, Schlegelberger B, Jotterand M, Reiter A, Jung-Munkwitz S, Proetel U, Schwaab J, Hofmann WK, Schubert J, Einsele H, Ho AD, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Lauseker M, Pfirrmann M, Hasford J, Saussele S, Hehlmann R; Schweizerische Arbeitsgemeinschaft für Klinische Krebsforschung (SAKK) and the German CML Study Group. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011;118(26):6760-8;
- 55.** Schoch C, Haferlach T, Kern W, Schnittger S, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Hochhaus A. Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2003;17(2):461-3.