

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação de ensaios comerciais de RT-qPCR para monitoramento de Doença Residual Mínima em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

FRANCELI RAMOS CARVALHO

PORTO ALEGRE, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação de ensaios comerciais de RT-qPCR para monitoramento de Doença Residual Mínima em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica

Dissertação apresentada por **Franceli Ramos Carvalho**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Diogo André Pilger
Co-orientadora: Dra. Ana Paula Alegretti

PORTO ALEGRE, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20 de março de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andréia Buffon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Patrícia Nardin

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Profa. Dra. Sandrine Comparsi Wagner

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Franceli Ramos

Avaliação de ensaios comerciais de RT- qPCR para monitoramento de Doença Residual Mínima em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica / Franceli Ramos Carvalho. -- 2017.

150 f.

Orientador: Diogo André Pilger.

Coorientador: Ana Paula Alegretti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Leucemia Mielóide Crônica. 2. Monitoramento Molecular. 3. Doença Residual Mínima. 4. Kits Comerciais. 5. RT-qPCR. I. Pilger, Diogo André, orient. II. Alegretti, Ana Paula, coorient. III.

Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Unidade de Diagnóstico Personalizado (UDP), Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), na cidade de Porto Alegre. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

Esta dissertação foi estruturada conforme as recomendações para elaboração de Teses e Dissertações do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFRGS), a qual foi organizada no modelo com encarte de publicações, em dois capítulos, sendo cada um composto por um artigo científico.

À minha família,
em especial aos meus pais Flori e Rejane,
ao meu irmão Anderson e ao meu namorado Igor,
por todo amor, compreensão, incentivo e apoio em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente, a Deus por me dar forças nos momentos difíceis!

Ao professor Dr. Diogo André Pilger pela orientação, oportunidade, disponibilidade, dedicação, confiança e por acreditar neste trabalho;

A minha co-orientadora Dra. Ana Paula Alegretti, pelos ensinamentos e, principalmente, por ter me dado a oportunidade de conhecer a UDP e desenvolver a maioria dos experimentos;

A Fernanda de Paris, pela disponibilidade, paciência e por toda dedicação em me ensinar a trabalhar com a biologia molecular;

Ao Rodrigo Minuto Paiva, Elisa Costabeber, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Denise Menezes e Juliana de Paoli, por terem me recebido tão bem na UDP;

A Patrícia Koehler dos Santos pela disponibilidade e auxílio na eletroforese capilar;

Aos meus colegas do LABC – Aline Beckenkamp, Paola, Samuel, Sílvia, Julia, Jéssica e Manuela. Agradeço pelo apoio e ensinamentos;

À colega Aline Schuster pela amizade, força e auxílio;

À Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela assistência e oportunidade;

Ao CNPq pelo auxílio e oportunidade;

Aos meus pais, Flori e Rejane, agradeço pela educação, incentivo, amor incondicional, por acreditarem em mim e compreenderem a minha ausência;

Ao meu irmão Ânderson pela companhia e apoio;

Ao meu namorado Igor pelo incentivo, força, amor e compreensão;

A Melinha, pela companhia de estudos no final de semana e nas madrugadas;

Aos meus afilhados, familiares, amigos e a todos que compreenderam e contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

A utilização de Inibidores da Tirosino Quinase (ITQ) alterou drasticamente a expectativa de vida do paciente com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e o monitoramento da expressão do oncogene BCR-ABL1 tornou-se um fator prognóstico fundamental para avaliação da resposta ao tratamento. Atualmente, a necessidade de desenvolvimento de metodologias moleculares que facilitem a quantificação rápida, barata e sensível, associada à detecção precoce de baixos níveis de BCR-ABL1, tem proporcionado o surgimento de diversos ensaios comerciais para monitoramento molecular. Entretanto, estes kits possuem uma variabilidade na sua composição, execução e parâmetros analíticos, principalmente com relação à sensibilidade, o que torna os resultados, muitas vezes, não comparáveis. Esse trabalho teve como objetivo revisar a literatura buscando identificar as diferentes opções comerciais disponíveis para o monitoramento do BCR-ABL1, além de comparar os resultados de dois destes ensaios com a metodologia de referência. A partir da revisão realizada, identificamos cinco kits comerciais como principais opções disponíveis para monitoramento de BCR-ABL1 na LMC: *GeneXpert® BCR-ABL Assay* (Cepheid), *Ipsogen® BCR-ABL1 Mbc Fusion Quant Kit* (QIAGEN), *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay* (Asuragen), *LightCycler® t(9;22) Quantification Kit* (Roche Molecular Biochemicals) e *ODK-1201* (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.). Posteriormente, comparamos os resultados e avaliamos o desempenho dos ensaios *GeneXpert® BCR-ABL* e do *BCR-ABL1 Quant RUO™* com a metodologia de referência a partir de amostras de 60 pacientes com LMC em uso de ITQ. Identificamos uma concordância global ótima, com coeficientes de correlação de 0,97 (*GeneXpert® BCR-ABL Assay*) e 0,84 (*BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay*). No entanto, na avaliação da concordância relacionada ao alcance ou não de uma Resposta Molecular Maior (RMM), o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* apresentou melhores resultados, com uma menor discrepância para respostas moleculares profundas. A análise estratificada por subtipos de transcritos de BCR-ABL1 não mostrou diferença de desempenho entre os dois ensaios. A partir das análises comparativas realizadas e respectivas vantagens de cada teste, aliados aos dados obtidos a partir da revisão da literatura, sugere-se que o *GeneXpert® BCR-ABL* poderia ser utilizado como um teste primário, devido à rapidez do ensaio, enquanto o *BCR-ABL1 Quant RUO™*, por apresentar resultados associados a uma maior sensibilidade, poderia ser um teste secundário, a fim de confirmar resultados abaixo de uma RMM ou resultados não detectáveis. Fica evidente que a escolha de um ensaio comercial deve atender às necessidades de cada laboratório, mas que, fundamentalmente, esteja alinhada às recomendações internacionais de quantificação.

Palavras chave: BCR-ABL1, monitoramento molecular, doença residual mínima, kits comerciais.

ABSTRACT

The use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has drastically changed the life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia (CML) and monitoring the expression of the BCR-ABL1 oncogene has become a key prognostic factor for assessing treatment response. The need to development molecular methodologies that facilitate fast, cheap and sensitive quantification associated with the early detection of low levels of BCR-ABL1 has led to the emergence of several commercial assays for molecular monitoring. However, these kits have variability in their composition, performance and analytical parameters, mainly in relation to the sensitivity, which makes the results often not comparable. This work aimed to review the literature in order to identify the different commercial options available for the monitoring of BCR-ABL1, in addition to comparing the results of two of these tests with the reference methodology. From the review, we identified five commercial kits as the main options available for monitoring BCR-ABL1 in the LMC: *GeneXpert® BCR-ABL Assay* (Cepheid), *Ipsogen® BCR-ABL1 Mbc Fusion Quant Kit* (QIAGEN), *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay* (Asuragen), *LightCycler® t (9; 22) Quantification Kit* (Roche Molecular Biochemicals) and *ODK-1201* (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.). Subsequently, we compared the results and evaluated the performance of the *GeneXpert® BCR-ABL* and *BCR-ABL1 Quant RUO™* with reference methodology from samples of 60 patients with CML using TKI. We identified an optimal overall agreement for the two trials, with correlation coefficients of 0.97 and 0.84, respectively. However, in the evaluation of the agreement related to the reach of a Major Molecular Response (MMR), the *BCR-ABL1 Quant RUO™* assay presented better results, with a smaller discrepancy for deep molecular responses. Analysis stratified by subtypes of BCR-ABL1 transcripts showed no difference in performance between the two assays. From the comparative analyzes performed and the respective advantages of each test, allied to the data obtained from the literature review, it is suggested that *GeneXpert® BCR-ABL* assay could be used as a primary test, due to the rapidity of the assay, while the *BCR-ABL1 Quant RUO™*, for presenting results associated with increased sensitivity, could be a secondary test in order to confirm results below an MMR or undetected results. It is clear that the choice of a commercial assay should meet the needs of each laboratory, but thè fundamentally in line with international quantification recommendations.

Keywords: BCR-ABL1, molecular monitoring, minimal residual disease, commercial kits.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Níveis de resposta molecular e redução na escala logarítmica.....47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Definições de resposta aos inibidores da tirosino quinase de primeira linha de tratamento.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL - *Abelson Leukemia Vírus*

ARQ - *Armored RNA Quant*

ATP - Trifosfato de Adenosina

BCR - *Breakpoint Cluster Region*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DRM - Doença Residual Mínima

ELN - *European Leukemia Net*

FA - Fase Acelerada

FB - Fase Blástica

FCr - Fase Crônica

FC - Fator de Conversão

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente

G6PDH - Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GUSB - β -glucuronidase

INF- α - Interferon alfa

IRIS - *International Randomized Study of Interferon versus STI571*

IS - *International Standard*

ITQ - Inibidores da Tirosino Quinase

LLA - Leucemia Linfocítica Aguda

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

M-bcr - *Major breakpoint cluster*

mRNA - RNA mensageiro

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBGD – Porfobilinogênio Desaminase

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Ph - Cromossomo *Philadelphia*

RC - Resposta Citogenética

RCC - Resposta Citogenética Completa

RH - Resposta Hematológica

RM - Resposta Molecular

RMM - Resposta Molecular Maior

RNA - Ácido Ribonucleico

RT - Transcriptase Reversa

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em tempo real Quantitativo

TCTH-alo – Transplante de Células Tronco Hematopoético alogênico

β 2M - Beta 2- Microglobulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 História da LMC	29
2.2 O cromossomo <i>Philadelphia (Ph)</i>	30
2.3 Epidemiologia	31
2.4 Etiologia	32
2.5 Fases da doença.....	33
2.6 Diagnóstico e achados laboratoriais	34
2.7 Citogenética convencional	35
2.8 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente - FISH.....	36
2.9 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa - RT-PCR.....	36
2.10 Tratamento da LMC	40
2.11 Monitoramento da Resposta ao Tratamento.....	42
2.12 Doença Residual Mínima	44
2.13 Monitoramento Molecular e a Escala Internacional	45
2.14 Quantificação de BCR-ABL1 por RT-qPCR: Metodologia <i>in house</i>	48
2.15 Kits comerciais para o monitoramento de BCR-ABL.....	49
3. OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral	53
3.2 Objetivos Específicos	53
4. ARTIGO CIENTÍFICO - CAPÍTULO 1	55
5. ARTIGO CIENTÍFICO - CAPÍTULO 2	83
6. DISCUSSÃO GERAL	109

7. CONCLUSÕES GERAIS.....	119
8. PERSPECTIVAS	123
9. REFERÊNCIAS	127
10. ANEXOS	137
10.1 Anexo I	139
10.2 Anexo II	145

1. Introdução

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal resultante da transformação de uma célula-tronco hematopoética primitiva caracterizada por uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo *Philadelphia*, t(9;22). Devido a este rearranjo, o gene da região de agrupamento de BCR é justaposto ao gene ABL, resultando no gene de fusão BCR-ABL1. A doença causa um aumento do número de leucócitos circulantes, geralmente neutrófilos e seus precursores e, ocasionalmente, eosinófilos ou basófilos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; SAWYERS, 1999).

O desenvolvimento de uma terapia alvo direcionada com Inibidores da Tirosino Quinase (ITQ), especialmente o mesilato de imatinibe, alterou drasticamente a expectativa de vida do paciente com LMC. A inibição da quinase BCR-ABL1 reduziu significativamente a frequência de progressão para fase blástica e eliminou os principais sintomas da fase crônica (MUGHAL *et al.*, 2016). O objetivo principal da terapia, em um primeiro momento, é reduzir progressivamente a carga da doença e, desta forma, alcançar uma Resposta Molecular Maior (RMM). Como se sabe, a demonstração de respostas moleculares duradouras durante a terapia com os ITQ está associada com a resposta clínica, incluindo maior sobrevida global e sobrevida livre de progressão da doença (YEUNG, C. C.; EGAN; RADICH, 2016). Uma vez que todas as terapias para a LMC funcionam melhor na fase crônica do que na avançada, a identificação precoce da recaída ou da progressão pode aumentar a chance de que os tratamentos alternativos sejam eficazes (RADICH, 2009).

As recomendações atuais indicam uma observação cuidadosa do perfil de cada paciente para decidir a terapia e suas possíveis modificações (BACCARANI *et al.*, 2015). Conseqüentemente, essas decisões devem ser tomadas com base em uma avaliação precisa do estado e da carga da doença no acompanhamento da resposta ao tratamento. Sendo assim, são necessários métodos sensíveis, precisos e padronizados para orientar essas decisões. O monitoramento molecular é avaliado por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real quantitativo (RT-qPCR) e/ou análise citogenética (MARUM; BRANFORD, 2016). A RT-qPCR é usada rotineiramente na quantificação dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de BCR-ABL1, em relação a um gene de referência e tornou-se o protocolo padrão de cuidados no monitoramento molecular de pacientes submetidos a terapia

com os ITQ. Mais importante ainda, a avaliação da Doença Residual Mínima (DRM) pode fornecer informações valiosas que ajudam a guiar decisões terapêuticas, evidenciando pacientes que respondem bem à terapia e reduzir riscos de recidiva iminente da doença (YEUNG, C. C. *et al.*, 2016).

O monitoramento molecular através da RT-qPCR está continuamente sendo aprimorado, uma vez que são relatados inúmeros problemas relacionados à qualidade dos resultados. À medida que o número de células leucêmicas circulantes diminui, há necessidade de técnicas mais sensíveis para o monitoramento da doença (RADICH, 2009). Variações nos procedimentos pré-analíticos e analíticos, que vão desde a coleta de amostras até a escolha de um controle interno adequado e a forma de expressão dos resultados da RT-qPCR, são conhecidos na literatura e impõem constantes desafios para a realização dos ensaios (ZHEN; WANG, 2013).

Atualmente, a necessidade de desenvolvimento de metodologias moleculares eficientes que facilitem a quantificação rápida, barata e sensível associada à detecção precoce com quantificação de baixos níveis de BCR-ABL1 tem proporcionado o surgimento de diversos kits comerciais para monitoramento molecular. Estes ensaios visam, principalmente, facilitar a validação das metodologias na rotina do laboratório, uniformizar resultados e aumentar a comparabilidade interlaboratorial. Entretanto, ainda não há um consenso em relação a melhor opção disponível considerando critérios analíticos e comerciais, tampouco se os resultados das diferentes alternativas apresentam resultados comparáveis.

2.1 História da LMC

Descrições indicativas de pacientes com LMC na literatura médica contemporânea francesa datam de 1825 e relatavam uma autópsia com um aumento no tamanho do baço e fígado e sangue espesso (HAYHOE, 1960). Um pouco mais tarde, em 1839, Paul Donne, um microscopista francês, descreveu um caso de esplenomegalia cujo sangue semi-purulento demonstrava que mais da metade das células pareciam ser “células incolores com núcleos compostos de grânulos”(DONNÉ, 1844). Em 1845, John Hugues Bennet, na Escócia, e Robert Virchow, na Alemanha, foram cruciais para a descoberta da LMC, pois combinaram os detalhes clínicos e microscópicos em relatos de casos modelo, enquanto exploravam a fisiopatologia subjacente da doença (GEARY, 2000).

Virchow propôs duas variedades principais de leucemia crônica: esplênica e linfática e, após 12 anos do seu primeiro reconhecimento, os dois tipos de leucemia haviam sido distinguidos(GEARY, 2000). Em 1900, casos com leucocitose leve e sintomas mínimos foram observados e os mieloblastos foram identificados como precursores dos granulócitos. Mais tarde, o perfil característico da contagem diferencial da LMC foi elucidado, com predomínio de granulócitos segmentados e menor contagem de mielócitos. Basofilia e trombocitose foram reconhecidas como características da contagem sanguínea em meados de 1920. Em 1938, Forkner observou que os mieloblastos poderiam ser vistos nos estágios mais avançados da doença e que esses pacientes tornavam-se refratários ao tratamento, enquanto Piney (1931) já havia reconhecido que quanto maior a porcentagem de mieloblastos no sangue pior era o prognóstico da doença (HAYHOE, 1960).

Nesta mesma época muitas discussões acerca da fisiopatologia da LMC foram realizadas, em particular, sobre algum estímulo não identificado que poderia ser responsável pela origem da doença (GEARY, 2000). No entanto, somente em 1960, Nowell e Hungerford, ambos cientistas americanos, que trabalhavam na *Philadelphia*, descobriram uma anormalidade cromossômica em células cultivadas a partir do sangue de sete pacientes com LMC. A descoberta foi denominada cromossomo *Philadelphia (Ph)*(NOWELL, 1960). Por décadas, este foi o único marcador cromossômico descoberto que se correlacionou com uma doença neoplásica específica. Estudos posteriores identificaram que o cromossomo

Philadelphia originava-se de uma deleção parcial no braço longo do cromossomo 22 e, em 1972, Janet Rowley, um geneticista americano, mostrou que a parte excluída não era perdida, mas translocada para a extremidade distal do cromossomo 9 (ROWLEY, 1973). Os sítios envolvidos nos cromossomos 9 e 22 foram então delineados e, sabe-se agora, que o proto-oncogene ABL normalmente localizado no cromossomo 9 é translocado para o cromossomo 22. Em 1985, o transcrito BCR-ABL1 e a proteína de fusão p210 foram identificados e as caracterizações do gene de fusão BCR-ABL1 e a produção de uma proteína híbrida foram delineadas (ROWLEY, 1973).

A descoberta do cromossomo *Philadelphia* foi de grande importância na compreensão da patogênese e biologia da LMC. Esta observação levou a novas descobertas sobre evoluções cariotípicas, transformações blásticas, clonalidade e distinção da LMC de outros tipos de transtornos da medula, bem como o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas para diferentes estágios da transformação maligna (GEARY, 2000).

2.2 O cromossomo *Philadelphia* (Ph)

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph) e do oncogene que o codifica. Presente em 95% dos pacientes com LMC, este cromossomo resulta da translocação recíproca dos cromossomos 9 e 22 - t(9;22)(q34;q11). A fusão do gene ABL (do inglês, *Abelson leukemia virus*), na região q34, no cromossomo 9 com o gene BCR (do inglês, *breakpoint cluster region*), na região q11 do cromossomo 22, gera um gene híbrido BCR-ABL no cromossomo 22 e um gene ABL-BCR no cromossomo 9. Este último parece não ter papel funcional na doença. A formação desse oncogene quimérico codifica uma proteína quinase desregulada que promove o crescimento e a replicação através de diversas vias de sinalização celular. Essa proteína varia em tamanho de acordo com o ponto de interrupção cromossômico no gene BCR, podendo possuir 190, 210 ou 230 kDa (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; SAWYERS, 1999).

A maioria dos pacientes com LMC apresentam o ponto de ruptura em uma região denominada *major breakpoint cluster* (M-bcr). Em todas as fusões o ponto de ruptura de ABL ocorre mais frequentemente no éxon 2 (a2) enquanto os pontos de

interrupção de BCR são variáveis (BENNOUR; SAAD; SENNANA, 2016; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000). No gene BCR, o *splicing* alternativo dá origem a dois transcritos, podendo ocorrer após o éxon b2 (ou e13) ou o éxon b3 (ou e14), produzindo b2a2/e13a2 e b3a2/e14a2 que são traduzidos a uma proteína de 210 kDa (p210^{BCR-ABL}). Esta proteína possui atividade tirosino quinase elevada e induz a medula óssea a proliferar um clone de células mielóides malignas constantemente, resultando em um número excessivo de células dessa linhagem (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; KALEEM *et al.*, 2015; KOLIBABA, 2013).

O impacto da posição dos pontos de ruptura dentro de M-bcr no fenótipo da doença e o seu prognóstico tem sido discutido recentemente. Algumas evidências sugerem que o tipo de transcrito (e13a2 ou e14a2) esteja relacionado com diferenças nas características clínicas dos pacientes com LMC, apesar de haver controvérsias. Alguns estudos relatam associação do transcrito de fusão e14a2 com uma maior contagem de plaquetas, embora os rearranjos não se correlacionem com a contagem de leucócitos e os níveis de hemoglobina. Não se encontrou associação das isoformas com o sexo dos pacientes (BENNOUR *et al.*, 2013; BENNOUR *et al.*, 2016).

2.3 Epidemiologia

De acordo com a última atualização disponível da *International Agency for Research on Cancer -World Health Organization*, no ano de 2012, estima-se que foram diagnosticados em 352 mil novos casos de leucemia no mundo naquele ano, correspondendo a 2,5% de todos os casos novos de câncer. No que se refere ao índice de mortalidade, ocorreram 265 mil óbitos no mundo nesse mesmo ano por esta causa (GLOBOCAN, 2014). Para o Brasil, em 2016, dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) estimaram 5.540 novos casos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 novos casos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres, não levando em consideração os subtipos de leucemias. No Brasil, para o período de 2000 a 2005, a sobrevida relativa em cinco anos de leucemia em adultos foi de 20%, resultado bem inferior às leucemias infantis (70%). No sul do país, a leucemia em homens ocupa a décima posição (8,55/100 mil) e a oitava para mulheres (6,62/ 100 mil) (BRASIL, 2015).

A LMC representa de 10 a 15% de todas as leucemias em adultos com uma incidência anual de 1-1,6 casos em 100.000 habitantes (BACCARANI *et al.*, 2015; CHEREDA; MELO, 2015). De acordo com o *National Cancer Institute - Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) e dados do *Medical Research Council* (MRC), a média de idade dos pacientes com LMC é de 66 anos. No entanto, a maioria dos pacientes diagnosticados possui entre 50 e 60 anos (mediana aproximada de 53 anos), sendo que 10% dos casos podem ocorrer em pacientes com menos de 20 anos (PICON; BELTRAME, 2002). Há um predomínio da doença no sexo masculino, com uma relação de 1,3 - 1,5 homens para cada mulher afetada, porém o desenvolvimento da doença é similar em ambos os sexos (BERGER *et al.* 2005; CHEREDA; MELO, 2015). No Brasil, em 2012, foram registrados 81.001 procedimentos de quimioterapia para LMC no adulto, no Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS – SIA-SUS, demonstrando uma prevalência anual de cerca de 10.125 casos desta doença (DE; URA).

De maneira global, antes do desenvolvimento do mesilato de imatinibe a sobrevida mediana dos pacientes era de aproximadamente 6 anos. Embora a incidência anual desta doença permaneça inalterada, a mortalidade anual estimada, que foi aproximadamente de 10-20% reduziu para 1-2% desde a introdução da terapia alvo (HUANG; CORTES; KANTARJIAN, 2012; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

2.4 Etiologia

Pouco se sabe a respeito da causa da LMC. Algumas evidências estão relacionadas à exposição a altas doses de radiação ionizante. As três principais populações que possuem uma frequência de LMC significativamente maior que o esperado, foi a população japonesa expostas à radiação liberada pelas bombas em Hiroshima e Nagasaki, pacientes britânicos com espondilite anquilosante tratados com radiação e mulheres com carcinoma cervical uterino que necessitaram de radioterapia (LICHTMAN, 2006). Leucemógenos químicos, tais como benzeno e agentes alquilantes não foram relacionados como agentes causadores de LMC, embora o aumento dose-dependente seja bem estabelecido para a Leucemia Mielóide Aguda (LMA). No entanto, inibidores de DNA topoisomerase II podem estar relacionados, já que estes têm demonstrado uma propensão para induzir leucemia

t(9;22) - positivas. Há pouca evidência ligando fatores hereditários à LMC e filhos de pais com LMC não tem uma maior incidência do que a população em geral(CORTES, 2004; ROHRBACHER; HASFORD, 2013).

2.5 Fases da doença

A LMC é classicamente caracterizada por um curso clínico evolutivo de duas a três fases. Sem intervenção terapêutica, a LMC progride da fase crônica (FCr) para uma fase blástica (FB), muitas vezes através de uma fase acelerada (FA) (CHEREDA; MELO, 2015). Os pacientes são geralmente diagnosticados na FCr da doença (90-95%) que possui uma duração média de 3 a 5 anos. Cerca de 50% dos pacientes diagnosticados são assintomáticos e descobrem a doença frequentemente após exames de rotina. Esplenomegalia é o sinal físico mais comumente detectado em 40-50% dos casos(JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; MELO; BARNES, 2007).

A FCr é caracterizada por marcada hiperplasia medular com expansão de células granulocíticas no sangue periférico e manutenção da capacidade de maturação destas células. Leucocitose, anemia e trombocitose são achados laboratoriais típicos. A proporção de blastos deve ser inferior a 10% na medula ou no sangue periférico com ausência de características das fases de transformação (FA) ou FB. Sinais e sintomas comuns da FCr, quando presentes, resultam em anemia, inchaço abdominal, sangramento, fadiga, perda de peso, mal-estar, letargia e sudorese (MELO; BARNES, 2007).

A FA é uma transição gradual para a FB com duração aproximada de 3 a 18 meses e está presente em cerca de 60-80% dos pacientes. Dores de cabeça, dor nos ossos, artralgias, dor por infarto esplênico e febre são mais frequentes nesta fase, bem como alguns pacientes podem apresentar piora na anemia, esplenomegalia e infiltração de órgãos. Os critérios para definição desta fase não são universais e parte dos pacientes diagnosticados como fase crônica pode ser reclassificado como fase acelerada. A evolução clonal é um critério comum para as classificações existentes e pode ocorrer entre 20 a 40% dos pacientes. As anormalidades cromossômicas mais comuns associadas à evolução clonal são trissomia do 8, perda adicional de material de 22q ou *Ph* duplo, o isocromossomo 17, trissomia do 19, perda do cromossomo Y, trissomia do 21 e monossomia do 7(JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; JOHANSSON; FIORETOS; MITELMAN, 2002).

Caracteriza-se pelo surgimento de células mais imaturas no sangue periférico, leucocitose persistente ou em elevação e esplenomegalia persistente ou crescente na vigência do tratamento, trombocitopenia persistente (abaixo de 100 mil/mm³) e não relacionada ao tratamento, basofilia no sangue periférico igual ou superior a 20%. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o número de blastos no sangue ou na medula-óssea varia de 10-19%, enquanto que as recomendações da *European Leukemia Net (ELN)* apontam um número de blastos que pode variar de 15-29% no sangue ou medula-óssea; ou blastos + promielócitos >30% com blastos inferiores a 30% no sangue ou medula-óssea(BACCARANI *et al.*, 2013),

A maioria dos pacientes evolui para a FB apresentando-se com piora dos sintomas constitucionais, hemorragias, febre, perda de peso rápido, alterações visuais de hemorragia retiniana, acidente vascular cerebral, infiltrações cutâneas e meníngeas e infecções recorrentes(MELO; BARNES, 2007). A FB assemelha-se morfológicamente à leucemia aguda. É definida pela presença de blastos representando $\geq 30\%$ das células nucleadas do sangue periférico ou medula-óssea de acordo com as recomendações da *ELN* ou $\geq 20\%$ de acordo com a OMS (BACCARANI *et al.*, 2013). A proliferação extramedular de blastos é um achado comum, sendo as áreas mais frequentemente afetadas para a manifestação da FB os linfonodos, superfícies serosas, pele, trato gastrointestinal e genitourinário, ossos e sistema nervoso central (LICHTMAN, 2006). Esta fase geralmente é refratária ao tratamento, independente do tipo de diferenciação celular, e pode ter duas ou mais linhagens comprometidas, apresentando um fenótipo mielóide em 60%, linfóide em 30% e megacariocítico ou indiferenciado em 10% dos casos. A FB é geralmente fatal com uma sobrevida que varia de 3 a 6 meses(CORTES, 2004; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

2.6 Diagnóstico e achados laboratoriais

O diagnóstico da LMC é baseado, primeiramente, na avaliação do hemograma do paciente juntamente com anamnese e exame físico. É possível observar a presença de leucocitose persistente inexplicada (superior a 25.000/ μ L) com ou sem desvio à esquerda, eritrócitos levemente alterados com anemia normocítica e normocrômica. Podem ser encontrados granulócitos em todos os estágios de maturação com a presença de promielócitos, mielócitos, metamielócitos

e alguns blastos, dependendo da fase da doença ao diagnóstico. A proporção de eosinófilos não é aumentada, mas sua contagem absoluta sim e a contagem de basófilos pode ser extremamente útil para um diagnóstico diferencial. A contagem absoluta de linfócitos é aumentada em pacientes com LMC ao diagnóstico e as plaquetas podem estar aumentadas, ou não (LICHTMAN, 2006; PICON; BELTRAME, 2002).

Uma amostra de medula óssea (medulograma ou biópsia de medula) deve ser examinada para confirmar os achados sanguíneos e determinar as anormalidades cromossômicas presentes. A análise cromossômica confirma o diagnóstico de LMC e pode ser detectada por exame citogenético convencional, por citogenética molecular - Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), ou por estudos moleculares utilizando PCR em tempo real (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

2.7 Citogenética convencional

A análise citogenética é realizada nas células hematopoéticas, preferencialmente em amostra da medula-óssea por estar em completo processo de divisão celular e conter mais material para análise. A célula deve estar em metáfase, na qual se evidencia divisão celular mitótica em que os cromossomos estão condensados, os centríolos estão em polos opostos na célula, ficando os cromossomos na região mediana e presos pelos centrômeros. Além disso, um estudo citogenético é útil somente se forem avaliadas ≥ 20 células em metáfase. É uma técnica que detecta anormalidades citogenéticas adicionais, além do cromossomo Ph, e ainda é o método de escolha para o diagnóstico da LMC (BENNOUR *et al.*, 2016; JOHANSSON *et al.*, 2002).

Entre as desvantagens da citogenética convencional está a baixa sensibilidade, que está limitada a 1% de células Ph-positivas na cultura amostrada (EGAN; RADICH, 2016). Outras desvantagens estão relacionadas ao tempo de execução, devido à necessidade de obtenção de células em crescimento e a necessidade de aspiração de medula óssea como uma fonte. Algumas limitações desta técnica incluem, ainda, amostra inadequada por não crescimento celular e presença de fibrose medular, o que pode levar a uma ausência de células em divisão. Mesmo assim, a citogenética é a técnica padrão-ouro para detecção do cromossomo Ph, sendo utilizada na maioria dos centros médicos e em ensaios

clínicos para monitorar a resposta citogenética durante o tratamento (BENNOUR *et al.*, 2016; TEFFERI, 2016).

2.8 Hibridização *in situ* Fluorescente - FISH

A análise por FISH baseia-se na utilização de sondas marcadas com corante fluorescente, que é uma sequência de bases específicas para os genes BCR e ABL. Esta técnica permite detectar uma translocação em qualquer região de qualquer cromossomo, podendo ser no braço curto, no braço longo ou, até mesmo, na região centromérica. A técnica de FISH é mais sensível do que a citogenética (0,1 a 5%) e pode ser realizada na medula óssea ou no sangue periférico (EGAN; RADICH, 2016). Diferentemente da citogenética, pode ser realizado em células em divisão e não divididas; no entanto, pode não detectar alterações cromossômicas adicionais, a menos que sejam selecionadas sondas específicas antecipadamente. A técnica possui baixa taxa de falsos positivos, mas depende do uso de sondas comerciais de boa qualidade (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; YEUNG, C. C. *et al.*, 2016).

Atualmente, muitos centros utilizam FISH para o monitoramento de rotina de BCR-ABL durante o tratamento com ITQ, geralmente em combinação com citogenética convencional e particularmente quando o monitoramento quantitativo por PCR não está disponível (BENNOUR *et al.*, 2016).

2.9 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa - RT-PCR

Os testes de PCR podem ser qualitativos, fornecendo informações sobre a presença dos transcritos de BCR-ABL1, útil no diagnóstico; ou quantitativos, avaliando a expressão de BCR-ABL1, ideal para o monitoramento da Doença Residual Mínima (DRM) (BENNOUR *et al.*, 2016). Neste último caso, a análise do mRNA de BCR-ABL1 é transcrito em DNA complementar utilizando a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), seguido pela amplificação do DNA obtido pela reação de polimerização (TATAR; IONITA, 2009).

A técnica quantitativa (RT-qPCR) evoluiu muito ao longo dos anos a partir da técnica de PCR qualitativa convencional e de suas variantes como o PCR Nested, podendo identificar translocações complexas, não detectada pela citogenética convencional (TASHFEEN *et al.*, 2014). Com a possibilidade de detecção dos sinais de amplificação durante e/ou após cada ciclo de reação subsequente, os dados

quantitativos podem ser obtidos num curto período de tempo sem a necessidade de processamento pós-PCR, reduzindo substancialmente o risco de contaminação do produto de PCR e acelerando a execução do teste (VAN DER VELDEN *et al.*, 2003). Esta técnica baseia-se na utilização de fluoróforos intercalantes e sondas específicas, gerando resultados comparáveis desde que sejam seguidos procedimentos padronizados e validados (HUGHES *et al.*, 2006).

A análise RT-qPCR baseada na utilização de sondas de hidrólise explora a atividade exonuclease 5'-3' da polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq) para detectar e quantificar produtos de PCR específicos à medida que a reação prossegue. A sonda de oligonucleotídeos de corante duplo é conjugada com um fluorocromo *reporter* (ex. FAM, VIC ou JOE) na extremidade 5', o qual é responsável pela emissão da fluorescência, e um fluorocromo denominado *quencher* (ex. TAMRA) localizado na extremidade terminal 3'. Desde que os dois fluorocromos estejam próximos um do outro, isto é, enquanto a sonda estiver intacta, a fluorescência emitida pelo fluorocromo *reporter* será absorvida pelo fluorocromo *quencher*, impossibilitando de emitir sua fluorescência. No entanto, na fase de hibridização da PCR, as sondas vão ligar-se à sequência alvo com a qual apresentam uma total complementaridade e, após amplificação, esta sonda é hidrolisada pela atividade exonuclease 5'-3' da Taq polimerase, estendendo a fita complementar. Isto resulta na separação do *reporter* e do *quencher* durante a extensão e conseqüentemente a fluorescência do fluorocromo *reporter* torna-se detectável pelo equipamento em tempo real. Durante cada ciclo de PCR consecutivo, esta fluorescência aumentará ainda mais devido ao acúmulo progressivo e exponencial de fluorocromos *reporter* livres. Portanto, o número de ciclos de PCR nos quais é detectado um aumento exponencial significativo na fluorescência é diretamente proporcional ao número de cópias de DNA presente na reação (TATAR; IONITA, 2009; VAN DER VELDEN *et al.*, 2003).

Já a análise RT-qPCR baseada em sondas de hibridização utiliza duas sondas específicas de sequência justapostas, uma marcada com um fluorocromo doador (ex. FAM) na extremidade 3' e a outra marcada com um fluorocromo aceptor (ex. LC Red 640, LC Red 705) na extremidade 5'. As sequências das duas sondas são escolhidas de forma que estas hibridizem em locais adjacentes ao DNA alvo, aproximando assim os dois fluorocromos (isto é, entre 1-5 nucleotídeos). Após a

excitação do fluorocromo doador, será emitida luz com um comprimento de onda mais longo. Quando os dois fluorocromos estão próximos, a luz emitida do fluorocromo doador excitará o fluorocromo receptor, um processo referido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer* – Energia de Ressonância Transferida por Fluorescência). Isto resulta na emissão de fluorescência, que pode ser detectada durante a fase de anelamento e na primeira parte da fase de extensão da reação de PCR (TATAR; IONITA, 2009; VAN DER VELDEN *et al.*, 2003). Embora existam as duas possibilidades de sondas, o ensaio utilizando sondas Taqman é o principal e, ainda, o mais utilizado na rotina laboratorial para quantificação de BCR-ABL1.

O desenvolvimento da RT-qPCR como uma metodologia mais sensível para avaliar a resposta ao tratamento foi uma extensão à prática da LMC associada à introdução do imatinibe na clínica. À medida que os resultados à terapêutica melhoraram, foram necessários métodos mais sensíveis para medir níveis de doença abaixo do nível de detecção da citogenética convencional e da técnica de FISH. A RT-qPCR para BCR-ABL1 evoluiu nesse contexto, permitindo uma detecção de uma célula leucêmica a cada 10^5 a 10^6 células normais, com uma sensibilidade de até 0,001% para a detecção da expressão do BCR-ABL em LMC (EGAN; RADICH, 2016; YEUNG, C. C. *et al.*, 2016). Quando avaliado o tempo de execução, a análise molecular é muito mais rápida do que a citogenética convencional e destaca-se ainda uma grande vantagem que é a possibilidade de utilização de sangue periférico em alternativa à medula óssea, tornando-se o teste mais conveniente disponível para o monitoramento. No entanto, a complexidade do ensaio e a falta de padronização entre os laboratórios são algumas das adversidades deste ensaio (EGAN; RADICH, 2016). A presença de resultados falso-negativos na RT-qPCR pode estar relacionada à má qualidade do RNA ou falha da reação e resultados falso-positivos podem ser devidos a uma provável contaminação entre amostras (BENNOUR *et al.*, 2016).

Um ponto extremamente relevante no que se refere ao monitoramento do BCR-ABL1 é a escolha do gene controle para padronização (controle endógeno). Escolher um gene apropriado é importante para gerar dados fiáveis e reprodutíveis. A comparação com os resultados do gene controle ajuda a identificar a qualidade da amostra/RNA, pois compensa as variações nos níveis de transcrição devido à

degradação da amostra após a coleta, na eficiência da transcrição reversa e nas variações na quantidade de RNA, auxiliando na avaliação da sensibilidade da medida de cada amostra (HUGHES *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2010).

Um gene controle deve satisfazer alguns critérios, como ter um nível de expressão no momento do diagnóstico e estabilidade muito semelhante ao do gene alvo, neste caso, BCR-ABL; ausência de pseudogenes para evitar a amplificação do DNA genômico, alta à média expressão e expressão similar entre amostras de sangue periférico normal e amostras com transcritos BCR-ABL1, bem como similaridade de expressão entre amostras de sangue periférico e de medula óssea (ZHEN; WANG, 2013). Níveis semelhantes de estabilidade do RNA são essenciais, uma vez que atrasos no processamento da amostra são comuns e alterações substanciais na expressão podem ocorrer após a coleta da amostra. Basicamente, 3 genes controles foram estudados e recomendados para a quantificação de BCR-ABL, são eles: BCR, ABL e β -glucuronidase (GUSB) (HUGHES *et al.*, 2006).

O gene ABL1 tem sido amplamente utilizado para avaliação de DRM em pacientes com LMC desde a era pré imatinibe, demonstrando um nível de expressão e estabilidade média comparável a de BCR-ABL1. No entanto, quando usado como gene controle em amostras com números de transcritos BCR-ABL1 elevados, o ABL1 derivado da sequência BCR-ABL1 e ABL1 são ambos amplificados, podendo elevar os resultados dos mesmos e subestimar a relação BCR-ABL/ABL. Em níveis mais baixos do transcrito essa distorção é pequena e irrelevante. O gene BCR foi inicialmente investigado como um gene controle, uma vez que tem um nível de expressão maior que o ABL1 e estabilidade semelhante ao de BCR-ABL1. BCR foi o gene controle selecionado para o estudo que comparou o uso em primeira linha de imatinibe com interferon e citarabina. Em contraste com ABL1 e BCR, GUSB tem a vantagem de que não estar envolvido na translocação; contudo, a expressão de GUS tem variações superiores a de ABL1 e BCR em diferentes fases da doença (HUET *et al.*, 2014). Assim, embora ABL seja atualmente o gene controle mais amplamente utilizado, BCR e GUSB são igualmente adequados (WANG *et al.*, 2006; WEISSER *et al.*, 2004; YEUNG, D. T.; PARKER; BRANFORD, 2011).

2.10 Tratamento da LMC

A introdução de quimioterapias convencionais como estratégia terapêutica marcou a primeira era de tratamento da LMC. Agentes citotóxicos inespecíficos como busulfano, hidroxiuréia e interferon alfa (INF- α) tratavam os sintomas da LMC, mas não alteravam a progressão da doença e o aparecimento da FB era, normalmente, observado em 5-6 anos (SHAH; PARIKH; RAWAL, 2016). O desenvolvimento dos inibidores de tirosina quinase (ITQ) melhorou muito a resposta clínica do paciente à terapia (CHEREDA; MELO, 2015). De modo geral, os ITQ mostraram interferir potentemente com a interação entre a proteína BCR-ABL e o trifosfato de adenosina (ATP), inibindo a fosforilação de proteínas envolvidas na transdução de sinais e bloqueando a proliferação celular do clone maligno. O advento dos ITQ como uma terapia alvo direcionada permitiu que pacientes com LMC em fase crônica pudessem ter resultados de sobrevida semelhantes à de uma população normal, melhorando a sobrevida global de 20 para 80-90% em 10 anos de acompanhamento (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; YEUNG, C. C. *et al.*, 2016).

Em 2001 foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) a utilização do mesilato de imatinibe (Gleevec®) como terapia alvo para pacientes na FCr, resistentes, refratários ou intolerantes ao INF- α ; sendo, atualmente, o fármaco de primeira escolha para o tratamento da LMC (SWEET; HAZLEHURST; PINILLA-IBARZ, 2013). Este atua através da competição pelo mesmo sítio de ligação do ATP na oncoproteína BCR-ABL1, resultando na inibição da fosforilação de proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares. Isto inibe eficazmente a quinase BCR-ABL1, mas também bloqueia o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDFR) e a tirosina quinase c-KIT (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016). Apesar dos avanços bem sucedidos no tratamento da LMC, a resistência ao imatinibe é observada em aproximadamente 25% dos pacientes. Destes, o mecanismo de resistência conhecido mais comum é a mutação na proteína BCR-ABL1, que é observada em 25-30% dos pacientes em FCr e 70-80% dos pacientes em FB. As estratégias atuais para contornar a resistência incluem o uso de outros ITQ, como nilotinibe (Tasigna®), dasatinibe (Sprycel®), bosutinibe (Bosulif®) e ponatinibe (Iclusig®) atuando em outros sítios ou outras vias celulares (CHEREDA; MELO, 2015).

O nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe são ITQ de segunda geração. O nilotinibe é um análogo estrutural do imatinibe e sua afinidade com o sítio de ligação ao ATP em BCR-ABL1 é 30-50 vezes maior *in vitro*, enquanto o dasatinibe é 350 vezes mais potente do que imatinibe *in vitro* e inibe também a família de quinases Src. Diversos estudos demonstraram que os ITQ de segunda linha desenvolvem altas taxas de resposta em pacientes com respostas inadequadas ao imatinibe e a mudança da terapia para um inibidor de segunda geração pode ser mais eficaz que o aumento da dose usual de imatinibe. O bosutinibe foi inicialmente estudado em pacientes com resistência ou intolerância ao imatinibe e demonstrou manter a atividade mesmo na presença de mutações mais conhecidas, exceto a mutação T315I. Já o ponatinibe é um ITQ de terceira geração, 500 vezes mais potente que o imatinibe na inibição de BCR-ABL1 e foi o primeiro inibidor a exibir a atividade em pacientes com LMC que apresentam a mutação T315I (BACCARANI *et al.*, 2015; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016; SHAH *et al.*, 2016).

Na LMC, uma terapia continuada com inibidores de primeira ou segunda geração que controlam a doença e o surgimento de resistência pode ser associada a uma cura funcional. Várias questões que envolvem o uso da terapia com os ITQ, incluindo a toxicidade crônica e qualidade de vida do paciente têm sido discutidas e alternativas à terapia continuada (CORTES; GOLDMAN; HUGHES, 2012; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016). Recentemente, alguns estudos de descontinuação do tratamento confirmaram que é viável a interrupção da terapia com os ITQ em pacientes com níveis de BCR-ABL1 indetectáveis e um monitoramento molecular frequente (REA *et al.*, 2013; ROSS *et al.*, 2013).

O transplante de células tronco hematopoético alogênico (TCTH-alo) ainda é a única estratégia curativa da doença, contudo, nem sempre é acessível e apropriada, devido à disponibilidade de doadores, idade do paciente, à morbidade relacionada ao tratamento pós-transplante e à mortalidade associada à toxicidade dos medicamentos (JIANG *et al.*, 2014). O TCTH- alo apresenta menor taxa de sucesso para aqueles pacientes em fase avançada da doença em comparação à FCr, sendo eficaz em mais de 75% dos casos de pacientes em FCr(RADICH, 2009).

2.11 Monitoramento da Resposta ao Tratamento

Avaliar a resposta a um ITQ é um fator prognóstico importante uma vez que os pacientes usam esta terapia por um longo período. A *European Leukemia Net (ELN)* desenvolveu recomendações para o tratamento médico de pacientes com LMC na prática clínica diária. O monitoramento cuidadoso para o acompanhamento da resposta ao tratamento e de fatores prognósticos é necessário primeiro para identificar o desenvolvimento da terapia de primeira linha (imatinibe), resistência, intolerância e não adesão ou progressão para a doença em fase avançada. Posteriormente, os benefícios do tratamento de terapias de segunda linha devem ser considerados (BACCARANI *et al.*, 2015; BENNOUR *et al.*, 2016).

Independentemente de qual ITQ for utilizado, deve-se sempre alcançar uma taxa de resposta adequada. A *ELN* distingue três graus de resposta: “ótima”, “alerta” e “falha”. Uma resposta “ótima” está associada a uma sobrevida comparável a de um indivíduo saudável de uma população normal, o que indica a não necessidade de modificação no tratamento. O “alerta” é uma categoria de advertência intermediária de resposta em que as características da doença e a resposta do tratamento requerem um monitoramento mais frequente. Já a “falha” significa que o tratamento deve ser alterado, pois o paciente apresenta um risco de progressão da doença e morte (BACCARANI *et al.*, 2015; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016).

Quanto ao controle da doença, a resposta do paciente pode ser monitorada em três níveis:

- a) **Resposta Hematológica (RH):** Definida como a normalização das contagens celulares do sangue periférico, realizada através da contagem diferencial no hemograma. Para uma Resposta Hematológica Completa (RHC): Leucócitos abaixo de $10 \times 10^9/L$, plaquetas abaixo de $450 \times 10^9/L$, diferencial sem mielócitos, promielócitos e blastos, menos de 5% de basófilos. No exame físico, baço não palpável. O hemograma deve ser realizado a cada duas semanas até RHC ser atingida e, depois, a cada 3 meses ou conforme a necessidade.
- b) **Resposta Citogenética (RC):** Realizado através do CBA (*Chromosome Banding Analysis*) de, pelo menos, 20 metáfases de células da medula óssea. O nível de resposta citogenética é baseado no número de metáfases Ph+.

Para uma Resposta Citogenética Completa (RCC): Percentual de células Ph+ igual à zero. A análise citogenética deve ser realizada aos 3, 6 e 12 meses. Uma vez que a RCC foi alcançada a CBA da medula óssea pode ser substituída por FISH de, pelo menos, 200 núcleos.

- c) Resposta Molecular (RM):** Realizado através de RT-qPCR onde os transcritos BCR-ABL1 do sangue periférico são amplificados em relação a um gene controle. As respostas moleculares são definidas pela magnitude da redução dos transcritos de BCR-ABL a partir de um valor padronizado. Para uma Resposta Molecular Maior (RMM) ou RM 3.0: $\leq 0,1\%$ de transcritos BCR-ABL1 em relação a um gene controle – redução de 3 logs na escala internacional. Uma vez que uma RMM foi atingida pode ser realizada a cada 3 a 6 meses.

A tabela 1 reúne os critérios da *ELN* considerando os tipos de resposta aos ITQ ao longo do tempo avaliados pelos diferentes níveis de resposta.

Tabela 1: Definições de resposta aos ITQ, primeira linha de tratamento, em pacientes com LMC avaliados aos 3, 6, 12 meses de tratamento, de acordo com o *European Leukemia Net (ELN)*.

	Ótima	Alerta	Falha
3 meses	BCR-ABL1 $\leq 10\%$ ou Ph+ $\leq 35\%$	BCR-ABL1 $> 10\%$ ou Ph+ de 36- 95%	Sem RHC ou Ph+ $> 35\%$
6 meses	BCR-ABL1 $\leq 1\%$ ou Ph+ = 0 (RCC)	BCR-ABL1 1-10% ou Ph+ de 1-35%	BCR-ABL1 $> 10\%$ ou Ph+ de 35%
12 meses	BCR- ABL1 $\leq 0,1\%$ (RMM)	BCR-ABL1 0,1- 1%	BCR-ABL1 $> 1\%$ ou Ph+ $\geq 1\%$

Legenda: Ph: Cromossomo Philadelphia; RCC: Resposta Citogenética Completa; RMM: Resposta Molecular Maior. Adaptado de BACCARANI *et al*, 2015.

Definições semelhantes são fornecidas para resposta à terapia de segunda linha. Recomendações específicas são feitas para pacientes nas fases acelerada e blástica e para o TCTH-alo. Os respondedores “ótimos” devem continuar a terapia indefinidamente, com vigilância cuidadosa, ou podem ser incluídos em estudos

controlados de interrupção do tratamento, uma vez que uma resposta molecular mais profunda é alcançada (BACCARANI *et al.*, 2013).

O *ELN* reconheceu que se a metodologia RT-qPCR é padronizada e os resultados são expressos de acordo com a Escala Internacional como % de BCR-ABL1 (será discutida posteriormente neste trabalho), a resposta pode ser avaliada utilizando apenas RT-qPCR, não só quando uma RCC for alcançada, mas desde o início do tratamento, pois esta metodologia é mais sensível e não requer uma amostra de medula-óssea. Testes moleculares e citogenéticos em conjunto são recomendados nos casos em que a resposta é limítrofe ou flutuante (BACCARANI *et al.*, 2015).

2.12 Doença Residual Mínima

A Doença Residual Mínima (DRM) é definida como a presença de células leucêmicas residuais na ausência de sinais ou sintomas clínicos e identifica a doença que foi detectada apenas por técnicas laboratoriais mais sensíveis (CHEREDA; MELO, 2015). No final dos anos 90 (1997/1998), as técnicas de RT-qPCR tornaram-se rapidamente implementadas para estudos de DRM em pacientes tratados para neoplasias malignas hematológicas. Vários instrumentos RT-qPCR estão hoje disponíveis e diferentes princípios e abordagens podem ser usados. A detecção da DRM correlaciona-se significativamente com o desfecho clínico em muitas malignidades hematológicas e já está descrita em vários protocolos de tratamento (VAN DER VELDEN *et al.*, 2003). Na LMC, uso da RT-qPCR para avaliar a resposta molecular tornou-se um método amplamente disponível e menos invasivo para determinar a eficácia do tratamento, bem como o monitoramento da doença (MARUM; BRANFORD, 2016).

A DRM pode ser uma fonte de recaída, portanto, o monitoramento molecular adequado da doença pode ter um impacto profundo sobre o curso da doença de maneira individualizada. O aumento no número de transcritos BCR-ABL1 podem prever perda iminente de resposta ou indicar a suspeita de uma mutação, por exemplo (BAUER; ROMVARI, 2012). O objetivo final de ensaios para detecção de DRM é orientar decisões terapêuticas reconhecendo pacientes que responderam bem à terapia e distingui-los de pacientes em que a terapia deve ser continuada ou intensificada, para minimizar a probabilidade de recidiva clínica (PAIETTA, 2002).

Com um monitoramento molecular altamente sensível, correções de tratamento precoce podem ser feitas, se necessário, o que pode otimizar as respostas e aumentar a probabilidade de sobrevivência a longo prazo. Como o tratamento tornou-se mais eficaz, a eliminação de BCR-ABL para níveis indetectáveis tornou-se a meta do tratamento (BAUER; ROMVARI, 2012).

Tendo em vista a importância clínica da avaliação da DRM, foram feitos esforços para harmonizar a quantificação mundial de BCR-ABL. A padronização de certas etapas pré-analíticas e analíticas melhorou a comparabilidade dos resultados, mesmo quando existirem diferenças interlaboratoriais entre os métodos (MÜLLER *et al.*, 2009).

2.13 Monitoramento Molecular e a Escala Internacional

A análise molecular por RT-qPCR ganhou importância considerável, porque através de técnicas quantitativas permite determinar com exatidão e precisão a qualidade da resposta do paciente, monitorando a doença ao longo do tratamento e o risco de recaídas precoces. As respostas são definidas pela redução nos transcritos de BCR-ABL a partir de um valor padronizado, em vez do nível de transcrição original de um dado paciente (YEUNG, C. C. *et al.*, 2016).

Em 2005, um consenso internacional de especialistas realizado em Bethesda, EUA, propôs que as medidas de BCR-ABL1 deveriam ser expressas como valores de referência baseados em uma Escala Internacional (IS) numérica para a padronização da avaliação da DRM (WHITE *et al.*, 2010). A conversão de valores laboratoriais locais BCR-ABL para uma IS foi proposta para permitir o alinhamento dos dados e reduzir a variabilidade entre laboratórios. Além disso, foram feitas uma série de recomendações para a produção de dados de RT-qPCR confiáveis: qualidade adequada do RNA, iniciadores e sondas específicas, transcrição reversa e eficiência de amplificação de PCR, genes controle apropriados para a padronização, sensibilidade, garantia da qualidade do ensaio, materiais de referência e controle internacional (BRANFORD, S *et al.*, 2006).

Como regra geral, o grupo Bethesda recomendou que a sensibilidade deveria ser de pelo menos 0,01% em IS, equivalente a uma redução de 4 log abaixo da linha de base padronizada, como indicado pelo número de transcritos de genes controle

na mesma quantidade de cDNA utilizada para a análise BCR-ABL1. A unidade básica de medida de DRM é a razão entre os transcritos de BCR-ABL1 e os de um gene de controle interno (ou controle endógeno - CE), este último servindo para normalizar variações na quantidade e qualidade do cDNA. Na ausência de um gene controle universal, o grupo Bethesda recomendou o uso de ABL, BCR ou GUSB como genes de controle interno, embora outros genes (por exemplo, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), beta 2- microglobulina (β 2M), porfobilinogênio desaminase (PBGD) ainda sejam utilizados em vários centros (MÜLLER *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2010).

O teste molecular deve ser realizado por RT-qPCR utilizando mais de 10mL de sangue periférico para medir o nível de transcritos BCR-ABL1, que é expresso como %BCR-ABL1/CE em Escala Internacional (IS) (BACCARANI *et al.*, 2013). A Resposta Molecular é relatada em uma escala logarítmica, em que 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% correspondem a uma diminuição de 1, 2, 3, 4, 4.5 e 5 logs, respectivamente, abaixo da linha de base padronizada em 100% IS definida no ensaio *International Randomized Study of Interferon versus STI571 (IRIS)* (Figura 1). Uma expressão de BCR-ABL1 \leq 0,1% corresponde a Resposta Molecular Maior (RMM) e tornou-se uma medida estabelecida, pois a realização da RMM está associada a uma maior probabilidade de resposta em longo prazo e a uma melhoria da sobrevida livre de progressão em doentes tratados com imatinibe (MÜLLER *et al.*, 2009).

Na LMC, a DRM refere-se aos níveis mais baixos de doença potencialmente compatíveis com uma resposta molecular profunda ou a recaída molecularmente definida após remissão de longo prazo (CHEREDA; MELO, 2015; CROSS, N. *et al.*, 2015). Uma resposta molecular profunda é definida como doença detectável com $<$ 0,01% de BCR-ABL1 IS (RM 4), doença detectável com 0,0032% de BCR-ABL1 IS (RM 4.5) ou BCR-ABL1 IS \leq 0,001% (RM 5). No entanto, a observação de transcritos BCR-ABL1 indetectáveis está diretamente relacionada à sensibilidade do método de PCR, bem como ao gene de controle utilizado, devendo ser definida de forma padronizada. O termo Resposta Molecular Completa deve ser evitada e substituída pelo termo *Leucemia Molecularmente Indetectável*, com especificação do número de cópias do gene controle (BACCARANI *et al.*, 2013).

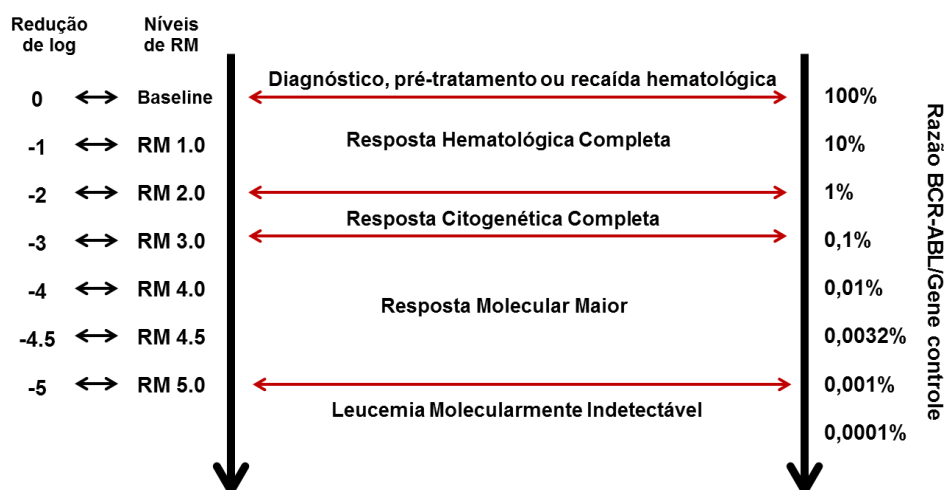


Figura 1: Níveis de Resposta Molecular (RM) e redução na escala logarítmica correspondente à razão de BCR-ABL/ gene controle na escala internacional. Adaptado de BACCARANI *et al.* (2006 e 2014).

O único mecanismo atualmente disponível pelo qual os laboratórios podem adotar a IS é estabelecer um fator de conversão (FC) específico para cada laboratório, usando um processo iniciado pelo laboratório de Adelaide, na Austrália. Uma vez validados, os valores IS podem ser obtidos pela multiplicação dos resultados locais pelo FC (MÜLLER *et al.*, 2009). Para que um laboratório de teste estabeleça um FC, uma série de amostras (tipicamente 20-30 amostras) é trocada com um laboratório de referência que abrange pelo menos 3 logs de doença detectável, mas não exceda um valor de IS de aproximadamente 10%. Estas amostras são então analisadas pelos laboratórios de referência e de teste durante um período de tempo, levando em conta variáveis intra-laboratoriais comuns, por exemplo, diferentes operadores e diferentes lotes de reagentes. Concluiu-se, a partir da experiência com este método, que a IS pode efetivamente fornecer uma comparação precisa das taxas de RMM entre as medidas de diferentes laboratórios (MÜLLER *et al.*, 2009). Embora este processo tenha funcionado geralmente bem, é evidente que o estabelecimento de FC é demorado, complexo, caro e está disponível apenas a um número limitado de laboratórios. Além disso, não está claro com que frequência um FC deverá ser revalidado. (WHITE *et al.*, 2010).

Mais recentemente, a OMS aprovou materiais de referência primários calibrados e acreditados para a análise de BCR-ABL1 por RT-qPCR, desenvolvendo um meio alternativo para que os laboratórios tivessem acesso a IS. Esses materiais

consistem em um painel de 4 níveis da linhagem de células K562 e14a2 positivas liofilizadas diluídas em células HL60 negativas para BCR-ABL. Os valores de referência atribuídos correspondem as razões médias em IS% obtidas por repetições múltiplas de 10 laboratórios padronizados para a IS e variam de 0,01% a 10%. Aproximadamente 3500 painéis de referência primários foram inicialmente fabricados e disponibilizados apenas para fabricantes. Para assegurar o fornecimento em longo prazo a centenas de laboratórios clínicos em todo o mundo foram desenvolvidos e validados painéis de referência secundários. Esses painéis são constituídos por *Armored RNA Quant (ARQ)* sintéticos resistentes a nucleases, transcritos de fusão e13a2 ou e14a2 em diluições seriadas dos transcritos BCR e ABL1 com índices IS% de lotes específicos baseados nos valores dos materiais de referência primários (WHITE *et al.*, 2013). Portanto, atualmente, existem duas estratégias para alinhar os métodos de quantificação dos transcritos BCR-ABL1: através de uma troca de amostras com um laboratório referência ou utilizando painéis de referência secundários disponíveis comercialmente.

Estas propostas foram concebidas para melhorar a comparabilidade dos resultados, permitindo aos laboratórios continuarem com os seus equipamentos e metodologias estabelecidas. O grupo de especialistas recomendou que a padronização internacional fosse alcançada através de uma troca de normas de referência com valores estabelecidos em laboratórios de referência. Estes padrões de referência avaliam a reprodutibilidade de cada método e chamam a atenção para técnicas inadequadas. Embora as amostras utilizadas para a definição da linha de base padronizada no estudo *IRIS* fossem limitadas em quantidade e rapidamente esgotadas, os dados detalhados de controle interno de qualidade, acumulados em intervalos regulares pelo laboratório em Adelaide, Austrália, proporcionam uma excelente rastreabilidade da IS para a escala *IRIS* (MÜLLER *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 2010).

2.14 Quantificação de BCR-ABL1 por RT-qPCR: Metodologia *in house*

Descrita por Susan Branford e Timothy Hughes, de Adelaide, na Austrália, a metodologia *in house* utiliza sondas TaqMan® para quantificar sequências de ácidos nucléicos específicas e o sistema ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para detecção. O número de cópias é normalizado para o gene controle BCR

que compensa variações na eficiência da RT e o grau de degradação do RNA. Este ensaio avalia os transcritos e13a2 e e14a2. No entanto, para pacientes com LMC nos quais os transcritos habituais não são detectados, variantes da técnica abrangendo o éxon 1 de BCR e o éxon 3 de ABL são especificadas para detecção de transcritos atípicos (BRANFORD, SUSAN; HUGHES, 2006; BRANFORD, S; HUGHES; RUDZKI, 1999).

Para este ensaio, 10 a 20 mL de sangue periférico em EDTA são requeridos, o RNA é extraído em solução de Trizol™ (Invitrogen) e a síntese de cDNA é realizada utilizando a SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) em duplicata. A curva padrão para quantificação do transcrito BCR-ABL é construída por clonagem utilizando plasmídeos contendo um fragmento de cDNA dos genes a serem analisados. Para o transcrito e13a2 e o gene controle BCR uma linhagem de células que expressa a proteína e13a2 é utilizada (KCL22) e para a quantificação do transcrito e14a2 um plasmídeo é preparado a partir de células K562. Diluições seriadas são realizadas para construir a curva e os padrões BCR-ABL são diluídos de 10^6 a 10 cópias e o BCR em uma faixa de aproximadamente 10^6 a 10^3 cópias (BRANFORD, SUSAN; HUGHES, 2006; BRANFORD, S *et al.*, 1999).

As amostras de controle de qualidade são analisadas em cada corrida de RT-qPCR para monitorar o desempenho do ensaio, utilizando duas linhagens celulares BCR-ABL positivas (K562 para e14a2 e Molm-1 para e13a2) e uma linhagem celular negativa (HeLa). As reações RT-qPCR são preparadas separadamente para os transcritos e13a2 e e14a2 de BCR-ABL e o gene controle BCR, sendo os transcritos de BCR-ABL1 já identificados. Os três ensaios são processados na mesma placa de reação de 96 poços, pois as mesmas condições de reação de PCR são requeridas (BRANFORD, SUSAN; HUGHES, 2006; BRANFORD, S *et al.*, 1999).

2.15 Kits comerciais para o monitoramento de BCR-ABL

Os avanços no monitoramento molecular estão voltados para o enfrentamento dos desafios clínicos na LMC como o desenvolvimento de métodos mais eficientes que facilitem a quantificação na rotina laboratorial e a quantificação de baixos níveis de BCR-ABL1 (MARUM; BRANFORD, 2016). Paralelamente ao desenvolvimento de ITQ mais potentes e/ou de terapias de combinação adequadas que permitam que uma maior porcentagem de pacientes alcance uma sobrevida livre de progressão,

torna-se também necessário a simplificação da técnica, facilitando sua implantação, automatização e padronização dos resultados(MOROTTI; FAVA; SAGLIO, 2015).

O ensaio RT-qPCR mostrou ser um teste sensível, específico e rápido para detecção de translocações cromossômicas e vários estudos demonstraram que a RT-qPCR tem maior sensibilidade do que a citogenética convencional e FISH para detecção e monitoramento da DRM na LMC. Além disso, vários sistemas RT-qPCR multiplex na forma de kits comerciais tem sido desenvolvidos e disponibilizados para ser rotineiramente utilizados e facilitar a quantificação de BCR-ABL1. No entanto, estes kits possuem uma variabilidade na sua composição, execução e parâmetros analíticos, principalmente com relação à sensibilidade o que torna os resultados, muitas vezes, não comparáveis (LIMSUWANACHOT *et al.*, 2016). Por isso, diante das inúmeras opções disponíveis comercialmente, torna-se imprescindível utilizar calibradores para a IS ou estabelecer um FC com laboratório referência.

Desta forma, essa dissertação foi organizada na forma de dois manuscritos, o primeiro que buscou identificar as principais opções comerciais disponíveis para monitoramento de DRM em pacientes com LMC, suas especificidades analíticas, características do teste, vantagens e desvantagens. Já o segundo manuscrito comparou dois ensaios selecionados a partir da revisão bibliográfica com a metodologia de referência.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar ensaios comerciais de RT-qPCR para monitoramento de Doença Residual Mínima em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica ampla buscando identificar as principais opções comerciais disponíveis para monitoramento de DRM em pacientes com LMC;

- Comparar os ensaios *GeneXpert® BCR-ABL Assay (Cepheid)* e *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay (Asuragen)* frente à metodologia referência (*Susan Branford e Timothy Hughes*);

- Determinar o Fator de Conversão (FC) do kit da Asuragen utilizando painéis de referência secundários disponíveis comercialmente;

- Padronizar os resultados de acordo com a Escala Internacional (*International Standard - IS*) pela comparabilidade com a metodologia de referência disponibilizada e estabelecer coeficiente de correlação entre os métodos;

- Determinar as isoformas do transcrito BCR-ABL1 através da Eletroforese Capilar (EC) para as amostras analisadas pelo ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay*;

- Avaliar, diante dos aspectos analíticos e operacionais, qual a aplicabilidade de cada ensaio.

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 57 – 82 foi suprimida por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de artigo de revisão sobre opções de kits comerciais disponíveis para monitoramento molecular em leucemia mielóide crônica, seus aspectos analíticos, vantagens e desvantagens.

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal caracterizada pela presença de uma anormalidade cromossômica específica, gerando um transcrito molecular BCR-ABL1 que codifica uma tirosina quinase ativa. A introdução dos Inibidores da Tirosina Quinase (ITQ), o aperfeiçoamento de metodologias moleculares e a disponibilização de kits comerciais trouxe, por definitivo, a importância da adoção generalizada do monitoramento molecular na LMC. O objetivo desta revisão é fornecer uma visão ampla e comparativa das diferentes opções comerciais disponíveis para o monitoramento do gene BCR-ABL1. Foram selecionados artigos sem restrição de data e detalhados os 5 kits mais utilizados para o monitoramento de BCRABL1: *GeneXpert BCR-ABL Assay* (Cepheid), *Ipsogen® BCR-ABL1 Mbcf Fusion Quant Kit* (QIAGEN), *BCR-ABL1 Quant RUO Assay* (Asuragen), *LightCycler-t(9;22) Quantification Kit* (Roche Molecular Biochemicals) e *ODK-1201* (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.). Foram avaliados aspectos relacionados às suas características analíticas, desempenho, especificações técnicas, tempo de execução, destacando algumas vantagens e desvantagens. A partir deste estudo, observou-se que os kits possuem diferentes características quanto ao processamento de amostras, diferentes graus de sensibilidade analítica, tempo de execução, calibradores, volume da amostra, rendimento, tipo de transcritos detectados e controles endógenos, permitindo ao usuário uma ampla visão dos kits comerciais disponíveis atualmente, possibilitando avaliar o que melhor se adequa à rotina do laboratório. Também foram consideradas estratégias futuras para o monitoramento do BCR-ABL1.

Palavras-chave: BCR-ABL, monitoramento molecular, kits comerciais.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 85 – 108 foi suprimida por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de artigo original sobre a comparação de dois ensaios comerciais baseados na técnica de RT-qPCR com a técnica *in house*, denominada metodologia referência.

RESUMO

Introdução: Avanços no desenvolvimento de métodos eficientes baseados na RT-qPCR estão contribuindo com o desenvolvimento de diferentes opções comerciais para avaliação da expressão do BCR-ABL1 em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Entretanto, a escolha do melhor teste laboratorial que garanta uma adequada sensibilidade e especificidade com resultados reportados em escala internacional é ainda um desafio. Neste sentido, este estudo visa avaliar o desempenho e comparar os resultados dos ensaios *GeneXpert® BCR-ABL Assay (Cepheid)* e *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay (Asuragen)* com a metodologia de referência *in house*. **Materiais e métodos:** Foram comparadas amostras de 60 pacientes com LMC, em diferentes fases de resposta ao tratamento, entre dois ensaios comerciais e o método de referência *in house* considerando diferentes aspectos analíticos e operacionais. **Resultados:** Foi observada uma alta correlação entre o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL* (0,97) e *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay* (0,84) com a metodologia de referência. Para *GeneXpert® BCR-ABL* e *BCR-ABL1 Quant RUO™* a concordância de RMM e não-RMM foi de 88,0% e 93,3%, respectivamente. Na análise por faixas de RMM, o ensaio da *Cepheid* foi concordante em 34,3% das amostras enquanto que o ensaio da *Asuragen* apresentou resultado de 63,3%. **Conclusão:** Diante dos diferentes aspectos avaliados, o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL* parece adquirir melhor desempenho se utilizado como método de primeira análise – devido a rapidez porém baixa sensibilidade - enquanto o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* poderia ser um teste secundário a fim de confirmar resultados abaixo de uma RMM ou resultados não detectados.

Palavras-chave: BCR-ABL1, monitoramento molecular, doença residual mínima, kits comerciais.

A LMC é uma das neoplasias malignas mais bem estudadas, sendo a primeira doença a ser associada a uma anormalidade cromossômica específica (BACCARANI *et al.*, 2015; CHEREDA; MELO, 2015; JABBOUR; KANTARJIAN, 2016). Embora a LMC tenha sido reconhecida como uma forma distinta de leucemia na metade do século XIX, avanços na tecnologia para caracterizar os cromossomos humanos levaram à descoberta, em 1960, de que as células de leucemia abrigavam uma anormalidade cromossomal característica – o cromossomo *Philadelphia*. Durante os 30 anos subsequentes, a identificação e quantificação de metáfases positivas na medula-óssea foram valiosas para confirmar o diagnóstico e monitorar a resposta à terapia. No entanto, nos últimos 25 anos, a introdução de técnicas mais sensíveis e precisas permitiu identificar e quantificar os transcritos BCR-ABL1, e uma avaliação mais aprofundada acerca das respostas terapêuticas passou a ser realizada. (HUGHES *et al.*, 2006).

A introdução do primeiro ITQ estabeleceu o paradigma na terapia direcionada, transformando uma doença com elevada taxa de mortalidade em uma doença crônica gerenciável. O mesilato de imatinibe revolucionou o tratamento da LMC, demonstrando como a inibição específica de uma quinase poderia efetivamente restringir a leucemogênese e produzir taxas de remissão extremamente satisfatórias (DRUKER *et al.*, 2001). O estudo *IRIS* estabeleceu o imatinibe como uma terapia de primeira escolha e demonstrou a importância prognóstica dos níveis de BCR-ABL1 para avaliar as respostas terapêuticas. A partir disso, foram então estabelecidos critérios de resposta ao tratamento, com base em resultados citogenéticos e moleculares associadas à sobrevida livre de progressão da doença (BACCARANI *et al.*, 2006). Mesmo assim, apesar das altas taxas de resposta com o imatinibe, alguns pacientes desenvolvem resistência primária e secundária ou ainda, intolerância ao tratamento. Com a inserção de novos ITQ, diversas recomendações vêm sendo realizadas e são constantemente atualizadas (BACCARANI *et al.*, 2015; BACCARANI *et al.*, 2009; BACCARANI *et al.*, 2013; HUGHES *et al.*, 2006).

Crítérios importantes ajudam a determinar se um paciente está respondendo ou não ao tratamento. Definições de resposta são baseadas em recomendações do *ELN* e definidas como “ótimo”, “aviso” ou “falha” para ITQ de primeira e segunda geração, levando em consideração o tempo de tratamento de cada paciente (BACCARANI *et al.*, 2013). Esforços internacionais para padronização de

procedimentos de quantificação resultaram no desenvolvimento da IS, na qual quantificações de BCR-ABL1 em relação a um gene de referência interno são expressos em uma IS, com 100% de BCR-ABL1 IS correspondendo ao estudo IRIS (CROSS; HOCHHAUS; MÜLLER, 2015; FORONI *et al.*, 2011). O alcance de uma RMM é um marco importante para pacientes que utilizam os ITQ, com um nível de BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$ IS indicando uma resposta “ótima” aos 12 meses e a continuidade do tratamento (ZHEN; WANG, 2013).

O objetivo e evolução recente no monitoramento da DRM é melhorar a detecção de baixos níveis de células leucêmicas residuais. Com o aumento da sensibilidade de metodologias moleculares é possível realizar associações entre a DRM e sobrevida livre de progressão da doença, possibilitando, inclusive, estudos de descontinuação da terapia com os ITQ. No entanto, o grande desafio atual ainda é padronizar metodologias capazes de detectar esse pequeno número de células residuais. A adaptação de métodos convencionais de RT-qPCR e aplicação de novas tecnologias vêm sendo empregadas para melhorar a sensibilidade dos ensaios (CORTES *et al.*, 2012; MARUM; BRANFORD, 2016).

O acompanhamento do paciente com LMC pode prever aqueles com maior risco de progressão da doença. O uso da RT-qPCR para estimar a expressão de mRNA de BCR-ABL1 tornou-se essencial para avaliar a resposta do paciente, monitorar a DRM e detectar a recaída de forma precoce, indicando a necessidade de reavaliar a terapia (HUGHES *et al.*, 2006). No entanto, uma ampla variação nos procedimentos, desde a coleta de amostras até a escolha de um controle interno e o relato de resultados, têm dificultado a comparabilidade interlaboratorial dos resultados de RT-qPCR. Portanto, a padronização da RT-qPCR é imprescindível para o gerenciamento da LMC e, embora exista um esforço contínuo para implementar a padronização internacional, existem diversos ensaios RT-qPCR que diferem na coleta de amostras, preparação de células, isolamento de RNA, transcriptase reversa, seleção de controles internos, construção de curva padrão e forma de análise dos resultados que contribuem para a notável variação encontrada nos resultados de BCR-ABL1 (ZHEN; WANG, 2013). A fim de facilitar a padronização laboratorial vários sistemas RT-qPCR multiplex tem sido desenvolvidos e disponibilizados na forma de kits comerciais. Entretanto, os laboratórios ainda têm dificuldade de estabelecer qual a melhor opção a ser adotada

considerando os aspectos analíticos descritos anteriormente, além de fatores econômicos e operacionais que melhor se adaptem a sua rotina.

Desta maneira, nessa dissertação procuramos abordar o monitoramento molecular de BCR-ABL1 no paciente com LMC baseado na utilização de kits comerciais, objetivando avaliar diferentes opções comerciais frente à metodologia de referência utilizada mundialmente. Os resultados foram organizados na forma de dois artigos científicos com abordagens específicas.

No primeiro artigo científico elaborado foi realizada uma revisão da literatura no qual analisamos e identificamos 15 estudos relacionados com o uso de kits comerciais disponíveis para o monitoramento molecular de BCR-ABL1. Sendo assim, identificamos 5 kits comerciais principais: *GeneXpert® BCR-ABL Assay* (Cepheid), *Ipsogen® BCR-ABL1 Mbc Fusion Quant Kit* (QIAGEN), *BCR-ABL1 Quant RUO Assay* (Asuragen), *LightCycler-t(9;22) Quantification Kit* (Roche Molecular Biochemicals) e *ODK-1201* (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.). Realizamos uma avaliação individual de cada um visando fornecer uma avaliação global abordando aspectos relativos às suas características analíticas, desempenho, especificações técnicas, tempo de execução, destacando-se algumas vantagens e desvantagens. A partir disso, observamos que os kits apresentam características distintas em relação ao processamento de amostras com graus variados de sensibilidade analítica, tempo de execução, calibradores, volume de amostra, rendimento, tipo de transcritos detectados e controles endógenos utilizados. Muitos estudos tem abordado o uso de kits comerciais na validação, implantação, avaliação e padronização de resultados para BCR-ABL1, porém, nenhum abordou o tema como uma revisão aprofundada sobre os kits comerciais mais comumente utilizados. Além disso, consideramos também as estratégias futuras para monitoramento de BCR-ABL e que permitam ao usuário uma visão ampla das alternativas comerciais disponíveis e que melhor se adaptem à rotina laboratorial.

O *GeneXpert® BCR-ABL Assay* foi o kit comercial encontrado com maior número de estudos relacionados. A sua facilidade de manuseio, uso de pequena quantidade de amostra, e o sistema fechado associado a um tempo de execução inferior aos demais torna esse ensaio extremamente atrativo. O uso de curvas de calibração específicas, certificados de análise, aplicação de FC por lote e controles

internos evita a necessidade de uso de curvas padrão realizadas no laboratório e validação de um FC específico através de trocas com laboratório referência ou utilizando painéis de referência secundários calibrados para a IS. Em contrapartida, críticas com relação à redução de sensibilidade em amostras com baixo número de transcritos ou transcritos em excesso podem acarretar em divergência de resultados, bem como a baixa reprodutibilidade em níveis abaixo de 0,01% IS (4-log) (CAYUELA *et al.*, 2011; JOBBAGY *et al.*, 2007; O'DWYER *et al.*, 2014). Embora o *GeneXpert*[®] *BCR-ABL* seja reconhecido como um ensaio para o monitoramento molecular, pois permite a detecção de uma RMM, cada vez mais pacientes tem alcançado níveis mais profundos de resposta molecular e, para o monitoramento dessas células residuais, se fazem necessárias metodologias capazes de alcançar um baixo número de transcritos. Já o ensaio Ipsogen[®] *BCR-ABL1 Fusion Quant Mbc* avalia a DRM em um nível de RM 4.5, dependendo do número de cópias de ABL e o fornecedor disponibiliza mais de uma versão deste ensaio, sendo um deles calibrado para a IS com resultados relatados em função de uma RMM. Entretanto, observamos que poucos estudos avaliaram este kit em relação a uma metodologia referência sugerindo sua menor aplicação na rotina laboratorial.

O kit *BCR-ABL1 Quant RUO Assay*[®] foi o único ensaio associado com produtos de PCR compatíveis com EC para a identificação dos subtipos de transcritos de fusão, permitindo identificar além de e13a2 e e14a2 (p210), o transcrito e1a2 (p190), o que reflete uma vantagem importante deste ensaio. O transcrito e1a2 representa 70% dos casos de t(9;22) na Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). No entanto, foram demonstrados recentemente casos raros de pacientes com LMC expressando apenas e1a2, associados a respostas inferiores na terapia com os ITQ (VERMA *et al.*, 2009). Estudos de validação do teste foram abordados com uma linearidade de 5-log, apresentando resultados em relação aos subtipos de transcritos individualmente (BROWN *et al.*, 2011).

Já quando avaliamos o ensaio *LightCycler-t(9;22) Quantification Kit* observamos que utiliza uma tecnologia de detecção diferente dos demais, através de sondas de hibridização FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Além disso, a reação de PCR é adaptada para capilares de vidro tornando-a mais rápida na comparação com outras alternativas metodológicas. Salienta-se que foi o único ensaio a quantificar transcritos de fusão raros (e13a3 e e14a3). Levando-se em

consideração que o ponto de ruptura de ABL ocorre mais frequentemente no éxon 2, transcritos de fusão com pontos de interrupção no éxon 3 de ABL são raros, ocorrendo com uma incidência de 0,3% (JINAWATH *et al.*, 2009). A principal particularidade encontrada neste kit foi com relação ao controle endógeno utilizado, a G6PDH. Atualmente, este controle endógeno não está entre os três genes controles mais adequados para acompanhamento de DRM em pacientes com LMC (BEILLARD *et al.*, 2003).

Por fim, relatamos também, nesta revisão, um novo kit para a quantificação de BCR-ABL1, denominado ODK-1201, ainda em estudos clínicos. Apesar das informações limitadas acerca do ensaio, estudos demonstraram elevada sensibilidade (<RM 5.0) (YOSHIDA *et al.*, 2016). Novas alternativas metodológicas já são apresentadas como perspectiva para acompanhamento da DRM na LMC, principalmente porque prometem ampliar a sensibilidade dos ensaios. Exemplo disso é a PCR digital (dPCR) na qual as reações de amplificação são particionadas e geradas por emulsão em câmaras de reação de nanoescala. A quantidade absoluta de moléculas pode ser determinada sem a necessidade de uma curva padrão. Estudos demonstraram que a dPCR tem potencial para detectar BCR-ABL1 com maior sensibilidade e precisão do que a RT-qPCR empregada atualmente (WHALE *et al.*, 2012). Portanto, a aplicação desta tecnologia para monitoramento molecular na LMC deve ser crescente na pesquisa da LMC (MARUM; BRANFORD, 2016).

Considerando as diferentes opções avaliadas, observamos que a escolha de um ensaio comercial deve atender às necessidades de cada laboratório, mas que, fundamentalmente, estejam alinhadas às recomendações internacionais de quantificação, baseados principalmente em uma detecção rápida da doença, de forma sensível e, quando possível, de menor custo.

No segundo artigo científico elaborado nesta dissertação apresentamos a comparação de dois ensaios comerciais, *GeneXpert® BCR-ABL Assay (Cepheid)* e *BCR-ABL1 Quant RUO™ Assay (Asuragen)*, com a metodologia referência descrita por *Branford e Hughes*(BRANFORD, SUSAN; HUGHES, 2006). Estes dois ensaios foram selecionados em função de apresentarem propostas distintas como teste de escolha para monitoramento do BCR-ABL1 em um serviço de referência. As dúvidas

estavam relacionadas à comparabilidade dos resultados em si, capacidade de identificar RMM, fluxo de trabalho e custo para realização de cada amostra. O objetivo maior desta avaliação foi determinar qual seria o teste comercial mais adequado para implantação em uma unidade de diagnóstico personalizado e que garantisse resultados alinhados à IS para acompanhamento dos pacientes a longo prazo sem dificuldades de comparação de resultados.

Observamos uma concordância global ótima para os dois ensaios com coeficientes de correlação adequados na análise conjunta das amostras, com uma tendência dos resultados *GeneXpert® BCR-ABL* apresentar valores ligeiramente inferiores à metodologia de referência com comportamento contrário para o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™*. Considerando este primeiro critério, aparentemente os testes teriam o mesmo desempenho, com uma discreta vantagem para o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL*. No entanto, o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* apresentou níveis de concordância em função do alcance ou não de uma RMM superiores (93,3%) ao ensaio da *GeneXpert® BCR-ABL* (88%), quando comparados aos resultados da metodologia de referência. Como se sabe, a importância de atingir uma RMM correta no paciente em tratamento com os ITQ está diretamente relacionada à maior sobrevida global e a sobrevida livre de progressão da doença (YEUNG, C. C. *et al.*, 2016). Desta forma, nesta análise mais específica, o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* obteve mais resultados na mesma faixa de RMM, com um menor número de amostras discordantes para respostas moleculares profundas, fato este claramente observado na análise das amostras categorizadas para uma RMM. Um ponto importante que poderia explicar esse achado é a quantidade de amostra utilizada neste ensaio em comparação com o *GeneXpert® BCR-ABL*. Para o ensaio da *Asuragen*, pelo menos 10 milhões de células devem ser extraídas (aproximadamente 5-10 mL, ou mais, quando a contagem de leucócitos é baixa). No ensaio da *Cepheid*, apenas 200 µL de sangue são utilizados, o que pode reduzir a sensibilidade do teste em pacientes com baixo número de transcritos de BCR-ABL1.

O advento dos ITQ de segunda e terceira geração tem proporcionado a pacientes com resistência ou intolerância ao tratamento com o imatinibe o alcance de respostas cada vez mais profundas (JABBOUR; KANTARJIAN, 2016). Com base nisso, avaliamos os níveis mais profundos de resposta, a fim de identificar a capacidade dos testes em alcançar baixo número de transcritos ou transcritos

indetectáveis. Observamos uma divergência de resultados superior no ensaio da *Cepheid*, como descrito na literatura (DUFRESNE *et al.*, 2007; JOBBAGY *et al.*, 2007; O'DWYER *et al.*, 2014). De forma geral, o ensaio da *Asuragen* confirmou uma melhor taxa de concordância em níveis mais baixos (63,3%), corroborando nossa impressão inicial.

Identificamos com sucesso os subtipos de transcritos em 91,1% das amostras analisadas e com tamanho de fragmentos muito próximos ao descrito na literatura (BROWN *et al.*, 2011; PFIRRMANN *et al.*, 2017). Apesar de não termos encontrado uma relação entre resultados concordantes/discordantes e o subtipo de transcrito, a possibilidade de identificação a partir do ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* é uma vantagem frente a outros kits, principalmente para acompanhamento de respostas e estudos que buscam identificar diferenças nos padrões de resposta de cada paciente, nas características biológicas, mutações/resistência e estudos de epidemiologia. Existem diversos trabalhos na literatura que apoiam a ideia de que o subtipo de transcrito esteja relacionado ao melhor desempenho do paciente frente ao ITQ (BRAEKELEER, 2015; DMYTRENKO *et al.*, 2015; LUCAS *et al.*, 2009; PFIRRMANN *et al.*, 2017). Cabe ao laboratório certificar-se que um aparente melhor resultado não esteja relacionado à melhor ou pior capacidade do kit em identificar determinados transcritos. Considerando-se a prevalência mundial destes transcritos, confirmada também em nossa realidade, os dois ensaios mostraram o mesmo desempenho e são aplicáveis para a grande maioria dos pacientes. Entretanto, é necessária ainda a avaliação de transcritos raros como e1a2, que não foram identificados em nosso estudo, para que novamente se avalie o desempenho para este tipo de condição analítica.

Com relação ao tempo de processamento e liberação de resultados, o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL*, incontestavelmente, apresenta vantagens, pois cada amostra é processada em um cartucho, não dependendo da necessidade de corridas em batelada, com um tempo médio de 2,5 horas já com a etapa de pré-extração manual. Contrariamente, o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* pode ser processado em um tempo médio um pouco superior, no entanto, requer a amostra já extraída, o que aumenta o tempo de liberação do resultado. Outro aspecto importante para este kit é a otimização do ensaio para redução do custo por teste, fazendo-se necessário completar um kit para a realização da análise. Mesmo dentro

dessas particularidades, ainda assim, seria possível relatar o resultado em um prazo inferior ao da metodologia referência.

A possibilidade de operação em um sistema fechado para o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL* reduz, substancialmente, riscos de contaminação entre as amostras analisadas. Isso se deve, principalmente, por este sistema já possuir a maioria dos reagentes liofilizados no interior do cartucho. Além disso, não requer uma infraestrutura robusta, podendo ser realizada por pessoal tecnicamente menos treinados. Deste ponto de vista, ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™* é mais laborioso e requer cuidados adicionais na sua execução.

Por fim, observamos que o entendimento e caracterização da LMC ao longo dos anos permitiu o desenvolvimento de terapias direcionadas e, associado a isso, a necessidade de metodologias de monitoramento cada vez mais sensíveis e precisas. Desde a descoberta dos ITQ a quantificação de BCR-ABL1 assumiu grande relevância clínica, destacando a necessidade da padronização dessas metodologias (MARUM; BRANFORD, 2016). Os resultados obtidos evidenciaram que inúmeras opções comerciais estão disponíveis no mercado atualmente, apresentando diferentes propostas, com algumas vantagens e desvantagens já bem estabelecidas. No entanto, avaliações acerca da metodologia que melhor se adapte a uma rotina e implantação de um teste de monitoramento de BCR-ABL1 estão diretamente relacionados às necessidades de cada laboratório, infraestrutura, padronização e custos de cada ensaio.

Baseado em todos os resultados e análises realizadas, entendemos que o ensaio *GeneXpert® BCR-ABL* pode ser considerado um bom método alternativo, levando-se em conta a sua facilidade de execução, tempo de manuseio e análise, a padronização por lote e o FC pré-estabelecido, facilitando a implantação da quantificação de BCR-ABL1 em laboratórios que realizam um número limitado de amostras. Desta forma, sugerimos que, devido ao seu desempenho, pode ser utilizado como teste primário a ser realizado de forma rápida em pacientes que iniciaram o tratamento recentemente ou em casos onde há suspeita da perda de RM devido a sintomas clínicos. Já o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO™*, por apresentar resultados associados a uma maior sensibilidade, poderia ser um teste secundário, a fim de confirmar resultados abaixo de uma RMM ou resultados não detectados.

7. Conclusões Gerais

Os resultados encontrados nessa dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. Identificamos cinco kits comerciais como principais opções disponíveis para monitoramento de BCR-ABL1 na LMC. Avaliamos individualmente cada um deles, com relação as suas características analíticas e especificações técnicas. Abordamos ainda, vantagens, desvantagens e informações técnicas inerentes, que possibilitam a tomada de decisão na escolha de um teste para rotina laboratorial;

2. A partir da comparação da avaliação técnica e operacional entre os ensaios *GeneXpert*[®] *BCR-ABL* e *BCR-ABL1 Quant RUO*[™] com a metodologia referência proposta por *Susan Branford e Timothy Hughes* para o monitoramento de DRM em pacientes com LMC, observamos que as metodologias apresentaram resultados adequados, com o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO*[™] mostrando-se mais adequado para monitoramento de pacientes que atingiram RMM mais profundas;

3. Para alinhar os resultado à IS, determinamos um FC específico para o laboratório, através de uma das estratégias recomendadas para métodos de quantificação de BCR-ABL1, utilizando painéis de referência secundários disponíveis comercialmente. Ainda, confirmamos a estabilidade deste FC a fim de padronizar os resultados com a IS;

4. Determinamos as isoformas do transcrito BCR-ABL1 através da técnica de Eletroforese Capilar (EC) a partir do amplicon do kit da *Asuragen* identificando as isoformas mais prevalentes em pacientes com LMC. A partir disso, realizamos a comparação dos resultados concordantes e discordantes da metodologia de referência, não evidenciando um perfil característico entre os ensaios testados;

5. Diante dos aspectos técnicos e operacionais avaliados, observamos que o ensaio *GeneXpert*[®] *BCR-ABL* pode ser considerado um bom teste primário a ser realizado em pacientes que iniciaram o tratamento recentemente ou em casos onde há suspeita da perda de RM devido a sintomas clínicos. Já o ensaio *BCR-ABL1 Quant RUO*[™], por ter demonstrado melhor comparabilidade com RMM em análises de respostas moleculares profundas, poderia ser um teste secundário, a fim de confirmar resultados abaixo de uma RMM ou resultados não detectados.

Diante dos resultados encontrados e visando o aprofundamento e melhor entendimento das relações estabelecidas para os ensaios avaliados, algumas perspectivas podem ser estabelecidas:

1. De maneira geral, aumentar o número amostral para as diferentes faixas de resposta molecular, a fim de avaliar de forma mais ampla o desempenho das metodologias. Uma das limitações impostas na análise de nossos resultados foi a não homogeneidade em todas as faixas de RMM, mesmo com uma coleta de amostras realizadas prospectivamente por quase dois anos;
2. A partir do desenvolvimento de novas metodologias mais sensíveis, como a PCR digital, avaliar novas amostras sem comparação com a metodologia referência, porém sempre com a mesma ótica apresentada neste trabalho, considerando uma relação de aplicabilidade para serviços locais;
3. Realizar o acompanhamento do paciente em relação ao ITQ utilizado, tempo de tratamento, alcance de RMM, monitoramento de DRM a partir da implantação do kit de escolha no serviço. A partir disso, observar junto aos clínicos sua funcionalidade, desempenho e ganho de qualidade na tomada de decisão.

9. Referências

BACCARANI, M. et al. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. **Annals of hematology**, v. 94, n. 2, p. 141-147, 2015.

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

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

BACCARANI, M. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1809-1820, 2006.

BAUER, S.; ROMVARI, E. Interpreting Molecular Monitoring Results and International Standardization in Chronic Myeloid Leukemia. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 3, n. 3, p. 151, 2012.

BEILLARD, E. et al. 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**, v. 17, n. 12, p. 2474-2486, 2003.

BENNOUR, A. et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. **Medical oncology**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2013.

BENNOUR, A.; SAAD, A.; SENNANA, H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 97, p. 263-274, 2016.

BERGER, U. et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. **Leukemia**, v. 19, n. 6, p. 984-989, 2005.

BRAEKELEER, M. D. BCR-ABL1 b3a2 AND b2a2 TRANSCRIPTS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: DOES IT MATTER? **European journal of haematology**, 2015.

BRANFORD, S. et al. Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. **Leukemia**, v. 20, n. 11, p. 1925-1930, 2006.

BRANFORD, S.; HUGHES, T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. **Myeloid Leukemia: Methods and Protocols**, p. 69-92, 2006.

BRANFORD, S.; HUGHES, T.; RUDZKI, Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. **British journal of haematology**, v. 107, n. 3, p. 587-599, 1999.

BRASIL. **Ministério da Saúde - ESTIMATIVA 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro.: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: 45-46 p. 2015.

BROWN, J. et al. Establishment of a standardized multiplex assay with the analytical performance required for quantitative measurement of BCR-ABL1 on the international reporting scale. **Blood cancer journal**, v. 1, n. 3, p. e13, 2011.

CAYUELA, J.-M. et al. Cartridge-based automated BCR-ABL1 mRNA quantification: solving the issues of standardization, at what cost? **Haematologica**, v. 96, n. 5, p. 664-671, 2011.

CHEREDA, B.; MELO, J. V. Natural course and biology of CML. **Annals of hematology**, v. 94, n. 2, p. 107-121, 2015.

CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 569-584, 2004.

CORTES, J.; GOLDMAN, J. M.; HUGHES, T. Current issues in chronic myeloid leukemia: monitoring, resistance, and functional cure. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 10, n. Suppl 3, p. S-1-S-13, 2012.

CROSS, N. et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 999-1003, 2015.

CROSS, N. C.; HOCHHAUS, A.; MÜLLER, M. C. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. **Annals of hematology**, v. 94, n. 2, p. 219-225, 2015.

DE, I.; URA, T. HELVÉCIO MIRANDA MAGALHÃES JÚNIOR ANEXO PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA DO ADULTO 1. METODOLOGIA DE BUSCA E AVALIAÇÃO DA LI.

DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DMYTRENKO, I. et al. Assessment of response to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia with e13a2 and e14a2 transcripts of BCR/ABL1 gene. **Problemy radiatsiinoi medytyny ta radiobiolohii**, v. 20, p. 328-340, 2015.

DONNÉ, A. **Cours de microscopie complémentaire des études médicales: anatomie microscopique et physiologie des fluides de l'économie**. JB Bailliére, 1844.

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

DUFRESNE, S. D. et al. Quantitative assessment of the BCR-ABL transcript using the Cepheid Xpert BCR-ABL Monitor assay. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 131, n. 6, p. 947-950, 2007.

EGAN, D.; RADICH, J. Monitoring disease burden in chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. **American Journal of Hematology**, 2016.

FORONI, L. et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia. **British journal of haematology**, v. 153, n. 2, p. 179-190, 2011.

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

GLOBOCAN. **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base**. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data> p. 2014.

HAYHOE, F. G. J. **Leukaemia: research and clinical practice**. Little, Brown, 1960.

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

HUET, S. et al. 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**, v. 9, n. 9, p. e106250, 2014.

HUGHES, T. et al. 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**, v. 108, n. 1, p. 28-37, 2006.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 2, p. 252-265, 2016.

JIANG, H. et al. Allogeneic hematopoietic SCT in combination with tyrosine kinase inhibitor treatment compared with TKI treatment alone in CML blast crisis. **Bone marrow transplantation**, v. 49, n. 9, p. 1146-1154, 2014.

JINAWATH, N. et al. A rare e14a3 (b3a3) BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia: diagnostic challenges in clinical laboratory practice. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 359-363, 2009.

JOBBAGY, Z. et al. Evaluation of the Cepheid GeneXpert BCR-ABL assay. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 2, p. 220-227, 2007.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta haematologica**, v. 107, n. 2, p. 76-94, 2002.

KALEEM, B. et al. Chronic Myeloid Leukemia-Prognostic Value of Mutations. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 17, p. 7415-7423, 2015.

KOLIBABA, K. S. Molecular monitoring of response in patients with chronic myeloid leukemia. **Manag Care**, v. 22, n. 7, p. 40, 50-61, Jul 2013.

LICHTMAN, M. A. **Williams hematology**. McGraw-Hill New York, 2006. ISBN 0071435913.

LIMSUWANACHOT, N. et al. Multiplex RT-PCR Assay for Detection of Common Fusion Transcripts in Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia Cases. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 2, p. 677-684, 2016.

LUCAS, C. M. et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. **Haematologica**, v. 94, n. 10, p. 1362-1367, 2009.

MARUM, J. E.; BRANFORD, S. Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 7, n. 5, p. 237, 2016.

MATSUMURA, I. et al. Odk-1201, One-Step RT-qPCR Major BCR-ABL/ABL mRNA Kit for the International Scale, with High Sensitivity to Detect Deeper MR. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 1805-1805, 2014.

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

MOROTTI, A.; FAVA, C.; SAGLIO, G. Milestones and monitoring. **Current hematologic malignancy reports**, v. 10, n. 2, p. 167-172, 2015.

MUGHAL, T. I. et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. **Haematologica**, v. 101, n. 5, p. 541-558, 2016.

MÜLLER, M. et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. **Leukemia**, v. 23, n. 11, p. 1957-1963, 2009.

NOWELL, P. C. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497-1501, 1960.

O'DWYER, M. E. et al. Nilotinib 300mg BID as frontline treatment of CML: Prospective analysis of the Xpert BCR-ABL Monitor system and significance of 3-month molecular response. **Leukemia research**, v. 38, n. 3, p. 310-315, 2014.

PAIETTA, E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? **Bone marrow transplantation**, v. 29, n. 6, p. 459-465, 2002.

PFIRRMANN, M. et al. No influence of BCR-ABL1 transcript types e13a2 and e14a2 on long-term survival: results in 1494 patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, p. 1-8, 2017.

PICON, P. D.; BELTRAME, A. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas. **CD-ROM Diretrizes Terapêuticas**, 2002.

RADICH, J. P. How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 114, n. 16, p. 3376-3381, 2009.

REA, D. et al. Long term follow-up after imatinib cessation for patients in deep molecular response: the update results of the STIM1 study. **Blood**, v. 122, n. 21, p. 255-255, 2013.

ROHRBACHER, M.; HASFORD, J. Etiology and epidemiology of chronic myeloid leukemia. In: (Ed.). **Neoplastic Diseases of the Blood**: Springer, 2013. p.11-17.

ROSS, D. M. et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. **Blood**, v. 122, n. 4, p. 515-522, 2013.

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

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SHAH, K.; PARIKH, S.; RAWAL, R. Tyrosine Kinase Inhibitors in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia Therapy: a Review. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 7, p. 3025, 2016.

SWEET, K. L.; HAZLEHURST, L. A.; PINILLA-IBARZ, J. The one-two punch: combination treatment in chronic myeloid leukemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 88, n. 3, p. 667-79, Dec 2013.

TASHFEEN, S. et al. Real time polymerase chain reaction in diagnosis of chronic myeloid leukemia. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 24, n. 3, p. 190-193, 2014.

TATAR, K.; IONITA, H. Particularities of Real-Time Polymerase Chain Reaction Technique (RT-PCR) in the Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia Patients—A Brief Overview. 2009.

TEFFERI, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 50-58, 2016.

VAN DER VELDEN, V. et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, v. 17, n. 6, p. 1013-1034, 2003.

VERMA, D. et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. **Blood**, v. 114, n. 11, p. 2232-2235, 2009.

WANG, Y. L. et al. Molecular monitoring of chronic myelogenous leukemia: identification of the most suitable internal control gene for real-time quantification of BCR-ABL transcripts. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 2, p. 231-239, 2006.

WEISSER, M. et al. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 9, p. 1551-1553, 2004.

WHALE, A. S. et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 11, p. e82-e82, 2012.

WHITE, H. E. et al. Establishment and validation of analytical reference panels for the standardization of quantitative BCR-ABL1 measurements on the international scale. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 6, p. 938-948, 2013.

WHITE, H. E. et al. Establishment of the 1st World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. **Blood**, p. blood-2010-06-291641, 2010.

YEUNG, C. C.; EGAN, D.; RADICH, J. New Methodologies in the Molecular Monitoring of CML. **Current hematologic malignancy reports**, v. 11, n. 2, p. 94-101, 2016.

YEUNG, D. T.; PARKER, W. T.; BRANFORD, S. Molecular methods in diagnosis and monitoring of haematological malignancies. **Pathology**, v. 43, n. 6, p. 566-579, 2011.

YOSHIDA, C. et al. Validation of a rapid one-step high sensitivity real-time quantitative PCR system for detecting major BCR-ABL1 mRNA on an International Scale. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2016.

ZHEN, C.; WANG, Y. L. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: international standardization of BCR-ABL1 quantitation. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 5, p. 556-564, 2013.

10.1 Anexo I

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética - Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA/ UFRGS – Projeto 1.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VALIDAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO REMOTO PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOÍDE

Pesquisador: Diogo André Pilger

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39251114.6.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 933.717

Data da Relatoria: 13/01/2015

Apresentação do Projeto:

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia, resultante da translocação da região do gene BCR do cromossomo 22 com a região do gene ABL do cromossomo 9 t(9;22) q(34;11). Esta anomalia cromossomal ocasiona a produção de uma proteína híbrida com atividade aumentada da enzima tirosina quinase, responsável pela proliferação das células tumorais. A Doença Residual Mínima (DRM) é definida como a presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica da doença. O monitoramento periódico da resposta do paciente à terapia tornou-se um componente essencial, permitindo possíveis modificações na dosagem de drogas, inclusão de outros agentes quimioterápicos ou mudança para outras modalidades terapêuticas, incluindo o transplante de medula óssea alogênico.

Métodos capazes de detectar células tumorais residuais ou recidivas precoces sem manifestações clínicas tem sido amplamente implementados, na tentativa de instituir a terapêutica adequada o mais rápido possível. Nos últimos anos, foram desenvolvidas muitas metodologias capazes de detectar a t(9;22) e seus respectivos transcritos. O acompanhamento regular da eficácia das terapias dos Inibidores da tirosina quinase é importante para garantir o tratamento ideal para pacientes com LMC. Atualmente, as diretrizes internacionais dos Estados Unidos e da União

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (51)359-7640 **Fax:** (51)359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Página 01 de 06

Continuação do Parecer: 033.717

Europa recomendam a avaliação de rotina dos níveis de BCR-ABL1 usando um teste molecular, porque apenas estes testes fornecem a sensibilidade e nível de quantificação necessária para o monitoramento preciso. Desta forma, são realizados testes moleculares analiticamente sensíveis baseados, principalmente, na quantificação através de PCR em Tempo Real (Transcriptase Reversa) (RT-PCR). O ensaio Xpert BCR-ABL (GeneXpert) fabricado pela Cepheid Innovation é uma técnica RT-PCR em tempo real que auxilia no monitoramento do transcrito BCR-ABL no sangue periférico de pacientes com LMC. É um teste automatizado que quantifica BCR-ABL/ABL integrando a purificação de amostras, a amplificação de ácidos nucleicos e a detecção de sequências alvo em amostras de sangue periférico. Para o ensaio utiliza-se sangue periférico (200 microlitros) em EDTA e as amostras devem ser conservadas de 2 a 8°C e devem ser processadas em até 48 h após a coleta. Os resultados são reportados em IS e foi validado um fator de conversão de acordo com a metodologia de consenso publicada pela literatura.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Realizar a validação de um teste rápido remoto (GeneXpert) para monitoramento de Doença Residual Mínima em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

Objetivo Secundário:

- Determinar a exatidão, precisão, linearidade, intervalo de referência, limite de detecção e especificidade do ensaio Xpert BCR-ABL (GeneXpert) fabricado pela Cepheid Innovation;
- Estabelecer limites de sensibilidade analítica do teste rápido para uso como teste de triagem;
- Estabelecer coeficiente de correlação entre o ensaio Xpert BCR-ABL (GeneXpert) e o método de referência utilizado atualmente pelo HCPA (manual, desenvolvido pelo INCA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Como o estudo não fará coleta adicional de material biológico, utilizando o mesmo material da rotina de análise dos pacientes, não são conhecidos riscos pela participação no projeto.

Benefícios: Por se tratar de um teste rápido, é possível reportar ao profissional de saúde um resultado em apenas 2 horas após o processamento da amostra, sendo esta, uma das maiores vantagens deste teste.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores objetivam validar esta nova tecnologia e testá-la frente aos resultados

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 933.717

fornecidos pelo Hospital de Clínicas de São Paulo, que utiliza a metodologia manual referência e possui certificação Internacional. Por se tratar de um teste rápido, é possível reportar ao profissional de saúde um resultado em apenas 2 horas após o processamento da amostra, sendo esta, uma das maiores vantagens deste teste.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores propõem dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) justificando que o estudo não fará coleta adicional de material biológico, utilizando o mesmo material da rotina de análise dos pacientes, não sendo necessária a utilização de TCLE. Na Plataforma Brasil consta adicionado o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas e o Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais (TCUD).

Recomendações:

Reforçar o referencial bibliográfico utilizado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Não está clara a metodologia utilizada para a validação do método; visto que, para tal, deve-se considerar o mesmo sujeito nos dois métodos. O autor descreve que "amostras de sangue periférico em EDTA serão realizadas através do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre" e que "Objetivamos validar esta nova tecnologia e testá-la frente aos resultados fornecidos pelo Hospital de Clínicas de São Paulo". No caso de serem consideradas medidas repetidas, o que o autor pretende testar com os resultados fornecidos pelo Hospital de Clínicas de São Paulo?

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Foi adicionado ao projeto o Item 9.7 referente a metodologia que pretende ser realizada. Há descrição da metodologia a ser validada, da metodologia manual e da forma como serão comparadas as metodologias. Destaca-se que serão utilizados os mesmo sujeitos para os diferentes métodos e os resultados serão comparados conforme descrito no item de metodologia.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Os critérios de exclusão não devem ser o contrário dos de inclusão, mas, aqueles que uma vez presentes, ainda que preenchidos os critérios de inclusão, impedem a pessoa de participar do estudo.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Os critérios de inclusão e exclusão foram alterados e destacados

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 933.717

no texto.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. A metodologia de análise de dados apresentada não contempla os objetivos descritos.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Os dados serão analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk, e comparados pelo teste T de Student, teste Mann-Whitney ou Coeficiente de correlação de Pearson, quando apropriado. A análise estatística será realizada com o software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os resultados também serão plotados em um gráfico de diferenças (Bland-Altman) para identificar possíveis discrepâncias. O nível de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. Realizaremos, também, a análise de correlação e regressão linear, exatidão e tendência (bias).
PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. A referência utilizada para o tamanho amostral não está adequadamente citada. Se esta for "Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2010;23(3):550-76." O tamanho amostral descrito não está de acordo com a referência a qual descreve apenas que "não existe um número mínimo recomendado".

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: A referência foi alterada, pois, de fato, não contemplava o número amostral preconizado. Conforme orientação do CLSI e Regras de Westgard são realmente necessárias 40 amostras para a comparação entre métodos quantitativos. Ambas as referências foram incluídas no projeto.
PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

5. O documento intitulado "Delegação de Funções" menciona "aplicar instrumentos de coleta de dados"; no entanto, nada consta no projeto.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Com relação à análise de coleta de dados, a adição do Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais, os dados a serem buscados serão descritivos da amostra como: idade, sexo, procedência, tempo de tratamento e uso de medicamentos de cada paciente incluído no estudo.
PENDÊNCIA ATENDIDA.

6. Os pesquisadores propõem dispensa do TCLE; porém, para tanto, é necessária uma melhor descrição da metodologia empregada, esclarecendo as questões apontadas neste parecer.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cepcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 933.717

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: O recrutamento dos pacientes será realizado de acordo com a demanda de solicitações dos exames de monitoramento de BCR/ABL realizadas pelos médicos. Semanalmente envia-se 8 a 9 amostras de sangue periférico ao INCA para realização dos testes pelo método convencional. Serão selecionados todos os pacientes prospectivamente, desde que preencham os critérios de inclusão no estudo.

Estes pacientes, que necessitam de monitoramento de BCR-ABL realizam a coleta através do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para envio para São Paulo e demais exames da rotina laboratorial deste paciente. A proposta deste projeto é que utilizaríamos o mesmo material da rotina de análise destes pacientes, não necessitando coleta adicional, uma vez que este método requer apenas 200 microlitros de sangue periférico. Desta forma entende-se que o TCLE é dispensável. As questões metodológicas foram explicitadas no item específico.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

7. Revisar a área temática especial cadastrada na Plataforma Brasil. O projeto parece não enquadrar-se nesta área.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Conforme solicitado, a área temática cadastrada anteriormente foi verificada, não estando esta correta, pois trata-se de equipamentos já desenvolvidos que serão validados.
PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 24/12/2014 e demais documentos submetidos até a presente data, que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto. Para que possa ser realizado o mesmo deverá estar cadastrado no sistema WebGPPG em razão das questões logísticas e financeiras.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG. Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 933.717

para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra a versão vigente aprovada. A comunicação de eventos adversos ocorridos no estudo deverá ser realizada através do Sistema GEO – Gestão Estratégica Operacional, disponível na Intranet do HCPA.

PORTO ALEGRE, 16 de Janeiro de 2015

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Página 06 de 06

10.2 Anexo II

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética - Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA/ UFRGS – Projeto 2.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VALIDAÇÃO DE UM KIT COMERCIAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE BCR-ABL1 EM ESCALA INTERNACIONAL.

Pesquisador: Diogo André Pilger

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39055814.3.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 933.722

Data da Relatoria: 13/01/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa que visa validar o kit comercial Asuragen (BCR/ABL1 QUANT™ KIT) na detecção e quantificação do cromossomo Philadelphia (Ph+) em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC), através de técnicas de PCR-RT.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Realizar a validação do kit comercial Asuragen (BCR/ABL1 QUANT™ KIT) e padronização em Escala Internacional (IS) para verificar a qualidade do kit frente à metodologia referência.

Objetivo específico

- Determinar a exatidão, precisão, linearidade, intervalo de referência e limite de detecção quantitativo do kit comercial Asuragen (BCR/ABL1 QUANT™ KIT) conforme regulamentação da CLIA; Realizar também a determinação de sensibilidade e especificidade analítica;
- Padronizar os resultados de acordo com a Escala Internacional (IS) pela comparabilidade com metodologia de referência disponibilizada pelo INCA e estabelecer coeficiente de correlação entre os métodos;
- Verificar a comparabilidade da curva de calibração em IS com método referência internacional.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)359-7640

Fax: (51)359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 033.722

- Avaliar a possibilidade de redução do volume de material coletado, passando de 4 tubos de 4 mL (metodologia referência manual - INCA) para 2 tubos de 4 mL.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios estão associados à redução dos custos para detecção do Ph+ em nosso meio, além da diminuição de variáveis pré-analíticas envolvidas no processo.

Os riscos são desprezíveis e estão associados à quebra de sigilo das informações dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Atualmente, os testes moleculares para monitoramento da Doença Residual Mínima (DRM) em pacientes do HCPA com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica (LMC) são realizados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). Semanalmente, o hospital envia ao Instituto de 8 a 9 amostras de sangue periférico de pacientes portadores de LMC para que possam ser monitorados. Estes resultados podem levar até 15 a 20 dias para ficarem prontos. A validação e padronização do kit Asuragen como ferramenta de monitoramento de pacientes em tratamento para LMC pode trazer benefícios aos pacientes e aos profissionais da saúde nesta instituição de saúde. A agilidade na entrega de um resultado de qualidade ao profissional da saúde é de suma importância para avaliação da terapêutica do paciente, sendo possível reportar um resultado em no máximo 1 semana após o processamento da amostra. São necessários 4 tubos de 4 mL de sangue periférico em EDTA atualmente, sendo que temos como objetivo, também, a redução no número de tubos de sangue, para 2 tubos de 4 mL. Asuragen BCR/ ABL1 Quant™ é um kit comercial, ferramenta de pesquisa em tempo real utilizando RT-PCR quantitativo para proporcionar a detecção simultânea dos transcritos de fusão BCR/ABL (especificamente e13a2, e14a2 e E1A2) e ABL1 (controle endógeno) em uma única reação e em um único poço. O ensaio multiplex deste kit leva à eficiência operacional e de custos não sendo necessária a adição de reagentes. O limite de quantificação do teste é >95% de positividade, com uma razão de 0,005%. O limite de detecção com >50% de positividade foi obtido com uma razão de 0,001%. A linearidade do teste é de 6 log. Este kit possui fácil padronização e validação, permitindo reprodutibilidade dos resultados. Para realizar a validação e padronização em escala Internacional do kit Asuragen serão comparados os valores obtidos por esta ferramenta frente aos valores fornecidos pelo Hospital de Clínicas de São Paulo, que já possui certificação Internacional de acordo com a metodologia referência. (10) Adicionalmente, acreditamos que o Hospital de Clínicas de Porto Alegre, um hospital-escola referência no país deve dispor de metodologias de ponta implantadas em sua rotina com resultados reportáveis em padrão Internacional buscando beneficiar tanto seu corpo clínico, mas

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7540 Fax: (51)359-7540 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 933.722

fundamentalmente os pacientes em tratamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Autores pedem dispensa do TCLE por não haver coleta adicional de material biológico. Termo de Compromisso para Uso de Dados (TCUD), Termo de Compromisso para Uso de Material Biológico e formulário de delegação de funções estão presentes e assinados pelos pesquisadores.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As seguintes pendências devem ser respondidas:

COMENTÁRIO DO CEP:

1) Avallar a redação de forma a torná-la mais clara.

RESPOSTA PESQUISADOR:

A redação foi avallada e encontra-se alterada e destacada ao longo do texto. Foi acrescentado o tópico metodologia (9.7) a fim de tornar mais clara a forma como serão realizados os experimentos laboratoriais.
PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

2) Adequar os critérios de exclusão e inclusão.

RESPOSTA PESQUISADOR:

Os critérios de inclusão foram alterados e encontram-se destacados no texto (9.2 e 9.3).

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

3) Esclarecer por que este é um projeto de pesquisa e não de desenvolvimento.

RESPOSTA PESQUISADOR:

O presente projeto trata-se de um projeto de pesquisa e não de desenvolvimento por utilizar um kit comercial de monitoramento de Doença Residual Mínima já disponível no mercado, fazendo

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)359-7640

Fax: (51)359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 033.722

uso desta como ferramenta laboratorial a ser validada e adequada à rotina. Não será desenvolvida nenhuma metodologia, mas sim validada em escala internacional.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

4) Estabelecer o tamanho amostral (30 ou 40?).

RESPOSTA PESQUISADOR:

O tamanho amostral do presente projeto será de 40 pacientes de acordo com critérios definidos pelo CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) e descritos por White et. al.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

5) Explicar como será feito o recrutamento aleatório dos pacientes.

RESPOSTA PESQUISADOR:

O recrutamento dos pacientes será realizado de acordo com a demanda de solicitações dos exames de monitoramento de BCR/ABL realizadas pelos médicos. Como descrito no projeto, semanalmente envia-se 8 a 9 amostras de sangue periférico ao INCA para realização dos testes pelo método convencional. Serão selecionados todos os pacientes prospectivamente, desde que preencham os critérios de inclusão no estudo.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

6) Explicar por que foi anexado TCUD. Quais informações serão buscadas?

RESPOSTA PESQUISADOR:

O Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais foi anexado no presente projeto para a busca de dados descritivos da amostra como: idade, sexo, procedência, tempo de tratamento e uso de medicamentos.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

7) Apresentar quais as variações, em relação à "metodologia referência" serão aceitos para se considerar o kit como validado.

RESPOSTA PESQUISADOR:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 91.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)359-7640

Fax: (51)359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 933.722

Os resultados reportados pelo Hospital de Clínicas de São Paulo são em número de transcritos ABL (controle endógeno), número de transcritos BCR-ABL e a razão BCR/ABL em porcentagem. Este valor é multiplicado por um fator de conversão previamente determinado por cada laboratório. O valor a ser obtido no nosso experimento, através do kit Asuragen, será comparado ao valor da metodologia referência em uma escala de padronização Internacional, e deverá estar dentro do limite da escala logarítmica, conforme a figura abaixo. Os resultados de ambas metodologias devem estar no mesmo nível de queda na escala logarítmica para que estes possam ser considerados comparáveis.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

COMENTÁRIO DO CEP:

8) Revisar a área temática cadastrada.

RESPOSTA PESQUISADOR:

Conforme solicitado, a área temática cadastrada anteriormente foi verificada, não estando esta correta, pois trata-se de equipamentos já desenvolvidos que serão validados.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

O projeto não apresenta pendências e esta em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão do projeto de 12/12/2014 e demais documentos submetidos até a presente data, que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Projeto cadastrado no sistema WebGPPG sob número 14-0683.

O projeto somente poderá ser iniciado após aprovação final da Comissão Científica, através do Sistema WebGPPG.

Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada. A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



Continuação do Parecer: 033.722

Inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na Intranet do HCPA.

PORTO ALEGRE, 16 de Janeiro de 2015

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7640 Fax: (51)359-7640 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Página 06 de 06