



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES
PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIB E SUA RELAÇÃO COM
ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO ESTROMA DA MEDULA ÓSSEA**

CAROLINE REGINA DE JESUS

FLORIANÓPOLIS

2007

CAROLINE REGINA DE JESUS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES
PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIB E SUA RELAÇÃO COM
ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO ESTROMA DA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.
Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cidônia de Lourdes Vituri

FLORIANÓPOLIS

2007

Aos meus pais, Eliane e Paulo, a quem devo a vida.

Aos meus irmãos, Vanessa e Rafael, de quem tenho
enorme orgulho.

AGRADECIMENTOS

“A Deus, Causa Primária de Todas as Coisas, Princípio Inteligente do Universo”.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Cidônia de Lourdes Vituri, por compartilhar de seu conhecimento, transmitindo conceitos teóricos e práticos relacionados ao assunto, que foram fundamentais na construção do trabalho. Pela sua compreensão, paciência e amizade, diante de meus momentos de dúvida e conflito interior. Pela sua disposição de ouvir, estimulando o desenvolvimento do meu raciocínio e de minhas próprias idéias. Por abrir os caminhos da pesquisa científica, me acompanhando desde as primeiras fases da graduação.

Aos pacientes, por permitiram o acesso aos seus prontuários e disponibilizaram suas amostras, permitindo a concretização do mesmo.

Aos meus pais, Paulo e Eliane, provedores dos recursos que possibilitaram o meu crescimento intelectual, pelo seu amor, carinho e apoio emocional. Pelo incentivo e persistência em não me deixar desistir.

Aos meus irmãos e melhores amigos, Vanessa e Rafael, com quem aprendi a compartilhar de atenção e carinho desde o início da vida, por torcerem por mais essa conquista.

As minhas colegas de trabalho, funcionárias do Laboratório de Patologia do CEPON, que souberam compreender meus momentos de ausência. Agradeço em especial, a Dr^a Lee I-Ching, pelo estímulo constante e pelos seus ensinamentos relacionados à morfologia da medula óssea. E também a técnica Marli dos Santos, a quem solicitei diversas vezes, pela sua enorme experiência e agilidade na confecção dos cortes histológicos.

Agradeço também a outros colaboradores do CEPON: aos funcionários do setor de prontuários (SAME), onde sempre fui bem recebida e orientada e aos funcionários da Farmácia, que sempre se dispuseram a ajudar, disponibilizando a lista dos pacientes que faziam uso de mesilato de imatinibe, assim como as referências bibliográficas relacionadas ao fármaco.

As colegas do Laboratório de Citologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Larissa, Carla, Pâmela e Elaine, que sempre me apoiaram com palavras de estímulo e sempre me receberam de braços abertos quando solicitei sua ajuda.

Aos meus amigos, que sempre me incentivaram, partilhando comigo tanto dos momentos de alegria, quanto de desespero.

A minha avó materna, principal incentivadora da educação na minha vida, a quem recorri desde a minha tenra idade aos seus ensinamentos (*in memoriam*).

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
SUMMARY	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Histórico da Leucemia Mielóide Crônica	20
3.2 Biologia Celular da Leucemia Mielóide Crônica	25
3.3 Quadro Clínico e Laboratorial	25
3.3.1 Fase crônica	25
3.3.2 Fase acelerada	28
3.3.3 Crise blástica	29
3.4 Estudo de Fatores de Prognóstico	30
3.5 Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica	31
3.5.1 Histórico	31
3.5.2 Agentes Citostáticos	32
3.5.2.1 Bussulfano	32
3.5.2.2 Hidroxiuréia	33
3.5.3 Interferon-alfa	33
3.5.4 Interferon e Citarabina	35
3.5.5 Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas	37
3.5.6 Mesilato de Imatinibe	38
3.5.6.1 Farmacodinâmica	39
3.5.6.2 Farmacocinética	40
3.5.6.3 Desenvolvimento do Modelo Clínico	40
4. METODOLOGIA	44
4.1 Aprovação na Comissão de Ética	45
4.2 Critérios de Inclusão	46

4.3 Delineamento Experimental	48
4.3.1 Levantamento dos Pacientes	48
4.3.2 Pesquisa nos Prontuários	49
4.3.3 Levantamento das Amostras	49
4.3.4 Procedimentos Técnicos	50
4.3.4.1 Inclusão em Parafina	50
4.3.4.2 Cortes Histológicos	51
4.3.4.3 Colorações	52
4.3.4.3.1 Hematoxilina-Eosina	52
4.3.4.3.2 Coloração de Gomori	53
4.3.4.4 Imuno-histoquímica	54
4.3.4.5 Montagem das Lâminas	56
4.3.4.6 Aquisição das Imagens	56
4.3.4.7 Estatística	57
5. RESULTADOS	58
5.1 Características da Amostra	59
5.2 Avaliação da Eficácia Terapêutica	61
5.2.1 Sobrevida Global	61
5.2.2 Resposta Hematológica Completa	62
5.2.3 Resposta Citogenética Maior	63
5.3 Avaliação da Medula Óssea	65
5.3.1 Celularidade	65
5.3.2 Linhagem Megacariocítica	68
5.3.3 Fibrose	70
5.3.4 Fibrose e Resposta Citogenética	76
5.3.5 Vascularização	78
5.3.6 Vascularização e Resposta Citogenética	83
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Translocação equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22	22
Figura 2.	Fusão dos genes BCR-ABL	24
Figura 3.	Mecanismo de ação do BCR-ABL e sua inibição pelo imatinib	39
Figura 4.	Sobrevida Global dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica em 2 anos de tratamento	61
Figura 5.	Manutenção da Resposta Hematológica em 24 meses de tratamento	62
Figura 6.	Sobrevida Livre de Progressão dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica em 2 anos tratamento	63
Figura 7.	Tempo para obtenção da Resposta Citogenética Maior em 2 anos de acompanhamento	64
Figura 8.	Corte histológico de amostra de medula óssea hipocelular	66
Figura 9.	Corte histológico de amostra de medula óssea normocelular	67
Figura 10.	Corte histológico de amostra de medula óssea hiper celular	68
Figura 11.	Análise do setor megacariocítico em conjunto com o grau de fibrose da medula óssea do diagnóstico	69
Figura 12.	Distribuição das amostras de medula óssea (antes e pós-tratamento) de acordo com o grau de reticulina	71
Figura 13.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau 0 de fibrose	72
Figura 14.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +1 de fibrose	73
Figura 15.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +2 de fibrose	73
Figura 16.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +3 de fibrose	74

Figura 17.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +4 de fibrose (100X)	74
Figura 18.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +4 de fibrose (400X)	75
Figura 19.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau +4 de fibrose (100X)	75
Figura 20.	Correlação entre o grau de fibrose da 1ª biópsia de medula óssea e a Resposta Citogenética	76
Figura 21.	Correlação entre o grau de fibrose da 2ª biópsia de medula óssea e a Resposta Citogenética	77
Figura 22.	Distribuição das amostras de medula óssea (antes e pós-tratamento) de acordo com o grau de vascularização	79
Figura 23.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau I de vascularização	80
Figura 24.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau II de vascularização	81
Figura 25.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau III de vascularização	81
Figura 26.	Corte histológico de amostra de medula óssea com Grau IV de vascularização	82
Figura 27.	Correlação entre o grau de vascularização da 1ª biópsia de medula óssea e a Resposta Citogenética	83
Figura 28.	Correlação entre o grau de vascularização da 2ª biópsia de medula óssea e a Resposta Citogenética	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Achados laboratoriais do sangue periférico de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica	27
Tabela 2.	Achados da medula óssea de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica	27
Tabela 3.	Critérios para o diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica em fase acelerada	28
Tabela 4.	Critérios para classificação da Resposta Hematológica Completa	47
Tabela 5.	Critérios para classificação da Resposta Citogenética	47
Tabela 6.	Critérios para construção da curva de Sobrevida Livre de Progressão	48
Tabela 7.	Características dos pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica	59
Tabela 8.	Características das amostras de medula óssea – celularidade	65
Tabela 9.	Análise do setor megacariocítico da 1ª biópsia de medula óssea	68
Tabela 10.	Análise da fibrose das amostras de medula óssea do diagnóstico e pós-tratamento	70
Tabela 11.	Análise da vascularização das amostras de medula óssea do diagnóstico e pós-tratamento	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ara-C – Citarabina

BCR-ABL – Breakpoint Cluster Region/Abelson

BMO – Biópsia de Medula Óssea

BU – Bussulfano

CB – Crise Blástica

FA – Fase Acelerada

FC – Fase Crônica

FISH - Hibridização in situ por Fluorescência

HY – Hidroxiuréia

IFN- α - Interferon-alfa

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

MEC – Matriz Extracelular

MO – Medula Óssea

Ph – Cromossomo Philadelphia

RCC – Resposta Citogenética Completa

RCM – Resposta Citogenética Maior

RCm – Resposta Citogenética Menor

RHC – Resposta Hematológica Completa

SG – Sobrevida Global

SLP – Sobrevida Livre de Progressão

SP – Sangue Periférico

TCTH – Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

RESUMO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal, responsável por 14% de todos os casos de leucemias. É caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) em células primordiais e suas descendentes. Este cromossomo, que é resultante de uma translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, está presente em aproximadamente 95% dos casos de LMC. A consequência molecular desta translocação é a geração de uma proteína híbrida BCR-ABL, com atividade tirosina-quinase aumentada. O mesilato de imatinib é um potente competidor seletivo inibidor desta proteína BCR-ABL. Os objetivos do presente estudo foram: análise das características dos pacientes portadores de LMC, cadastrados no Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina (CEPON/SC) e tratados com mesilato de imatinibe, avaliação da eficácia do referido fármaco. Esta última foi feita pela observação das sobrevidas global e livre de progressão, da resposta hematológica e da resposta citogenética dos indivíduos e pela análise das amostras de medula óssea (do diagnóstico e do pós-tratamento), dando enfoque especial na celularidade, fibrose e vascularização das mesmas. Foram avaliados 22 pacientes, os quais foram acompanhados durante 2 anos de tratamento com o imatinib. As características da população incluída no estudo foram compatíveis com os dados da literatura, no que diz respeito a indivíduos portadores de LMC em fase crônica. A sobrevida dos pacientes incluídos no estudo foi de 95,46%. A resposta hematológica completa foi alcançada em tempo médio de 1,5 meses, sendo que 72,73% mantiveram esta resposta durante os 2 anos de acompanhamento. A sobrevida livre de progressão da doença foi observada em 86,36% dos pacientes. O tempo médio para obtenção da resposta citogenética maior foi de 8,78 meses e foi alcançada por 63,64% dos pacientes. As amostras de medula óssea do diagnóstico de todos os pacientes apresentaram-se hiperclulares. Após o tratamento, apenas 18,18% deles mantiveram suas amostras nestas condições. A fibrose foi avaliada por meio da coloração de Gomori, demonstrando que a maioria dos pacientes (59,09%) apresentou um grau de fibrose elevado na primeira biópsia. Já após o tratamento, grande parte (72,73%) teve suas amostras normais com relação à fibrose. A vascularização foi avaliada pela marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-CD34, sendo que 54,55% dos pacientes apresentaram alteração importante na primeira biópsia de medula. Após o tratamento, 72,73% das amostras apresentaram uma diminuição na contagem de vasos. A resposta citogenética apresentou um alto grau de correlação com a fibrose (1ª BMO → $r = -0,919$ e $p = 0,0271$; 2ª BMO → $r = -0,917$ e $p = 0,028$), demonstrando que quanto maior o grau de fibrose, menor a possibilidade de se atingir a resposta citogenética. A vascularização também apresentou forte correlação com a resposta citogenética (1ª BMO → $r = -0,964$ e $p = 0,0092$; 2ª BMO → $r = -0,940$ e $p = 0,060$). Assim, da mesma forma que a fibrose, quanto maior o número de vasos, menor a possibilidade de a resposta citogenética ser alcançada. Este estudo vem fortalecer interferirem na resposta a hipótese de que o estroma da medula óssea de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica apresenta alterações significativas, a ponto de terapêutica e terem relação direta com a sobrevida dos indivíduos.

SUMMARY

The chronic myeloid leukemia (MLC) is a clonal myeloproliferative disease and represents 14% of all cases of adult leukemia. It is characterized by the presence of the Philadelphia chromosome in primordial and descendent cells. This chromosome, which is the result of a reciprocal and balanced translocation between the chromosomes 9 and 22, is present in approximately 95% of MLC cases. The molecular consequence of this translocation is the generation of a hybrid protein called BCR-ABL, which presents tyrosine kinase activity increased. The imatinib mesilate is a powerful competitive and selective inhibitor of this protein. The goals of this study were: to examine the features of patients diagnosed with MLC, registered in CEPON and treated with imatinib mesilate, to evaluate the efficacy of this drug, analyzing the global and progression-free survival, the hematologic and cytogenetic responses of the patients and through analysis of samples of bone marrow biopsy (BMB), obtained for diagnosis and after the treatment. These samples were evaluated on cellularity, degree of fibrosis and vascularization. 22 patients were evaluated and followed during 2 years of treatment with imatinib. The characteristics of the studied population were compatible with the data of literature, regarding MLC patients in chronic fase. The survival of patients included in the present study was 95,46%. The complete hematologic response was achieved in 1,5 months, on average, and 72,73% maintained this response during the 2 years of monitoring. The progression-free survival was observed in 86,36% of patients during the period. The medium time to get the higher cytogenetic response was 8,78 months and 63,64% of them reached this response. The samples of bone marrow from diagnostic of all patients showed hypercellularity. After treatment, only 18,18% of the samples were in the same conditions. The fibrosis was evaluated through of Gomory staining (silver impregnation method). Most patients (59,09%) presented a high degree of fibrosis in the first biopsy. After the treatment, large proportion of patients normalized their fibrosis samples. The vascularization was examined through immunohistochemistry staining, using the CD34 antibody. On the vascularization, 54,55% of patients presented an important amendment in the first bone marrow biopsy. After the treatment, 72,73% of the samples showed a decrease in the count of vessels. The cytogenetic response revealed a high degree of correlation with the fibrosis (1^a BMB → $r = - 0,919$ and $p = 0,0271$; 2^a BMB → $r = - 0,917$ and $p = 0,028$), showing that the higher the degree of fibrosis gets, the lower the possibility to reach the cytogenetic response is. The vascularization also presented strong correlation with the cytogenetic response (1^a BMB → $r = - 0,964$ and $p = 0,0092$; 2^a BMB → $r = - 0,940$ and $p = 0,060$), wich means that the higher the number of vessels, the lower the chance of cytogenetic response to be achieved is. This study strengthens the hypothesis that the bone marrow stromal of patients carriers of CML presents significant changes, interfering with the therapy response and consequently the survival of individuals.

1- INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa clonal, responsável por aproximadamente 15% de todos os casos de leucemias (D'ANTONIO, 2005), com uma incidência anual de aproximadamente um a dois casos para cada 100.000 habitantes (BRASIL, 2005). É caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph¹) em células primordiais e suas descendentes (FARDEL *et al.*, 1999). Essa anormalidade genética característica da LMC resulta de uma translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)] (NOWELL & HUNGEFORD, 1960; NOWELL & HUNGEFORD, 1961; ROWLEY, 1973). A consequência molecular desta translocação é a geração de uma proteína híbrida BCR-ABL de 210-kD, com atividade tirosina-quinase aumentada, presente em todos os casos de LMC. A atividade da proteína BCR-ABL é necessária e suficiente para a atividade oncogênica da fase inicial da LMC (DALEY *et al.*, 1990; PASTERNAK *et al.*, 1998; FARDEL *et al.*, 1999; GORDON *et al.*, 1999; GOLDMAN, 2004).

A doença geralmente apresenta três fases definidas: fase crônica, fase acelerada e crise blástica. Durante a fase crônica ocorre uma expansão clonal maciça de células mielóides, que mantém a capacidade de diferenciação e que são bem controladas com terapias citorrredutoras, como o bussulfano (BU) e a hidroxiureia (HY). Com o decorrer do tempo, este clone perde a capacidade de diferenciação e a doença progride para fase aguda, na qual o paciente geralmente mostra-se resistente à terapia convencional (CORTES *et al.*, 1996; FARDEL *et al.*, 1999).

A terapia com interferon alfa (IFN- α) aumenta a sobrevida em até 2 anos, quando comparado à terapia com HY, e ainda pode reduzir o número de células Ph¹ positivas, o que está claramente associado a uma maior sobrevida (SILVER *et al.*; 2003). Entretanto, mesmo quando associado à terapia com citarabina (Ara-C), não foi observada remissão molecular, ou seja, a eliminação dos transcritos BCR-ABL detectados pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) (KANTARJIAN *et al.*, 2003). Por isso, o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) tem sido considerado o único tratamento curativo para LMC. Provavelmente, 65% dos pacientes transplantados com medula óssea de doador relacionado e completamente compatível serão curados. No entanto, a mortalidade e a toxicidade relacionadas ao TCTH aumentam com a idade. Apenas 45% dos pacientes com LMC têm idade inferior a 60 anos de idade ao diagnóstico. Destes pacientes, apenas 30% tem doador aparentado HLA compatível (PEGGS *et al.*, 2003).

O grande avanço no tratamento da LMC ocorreu com a introdução do mesilato de imatinibe (Glivec[®], Basel, Suíça), um agente oral bem tolerado. O imatinibe ocupa o local de ligação do ATP de várias moléculas de tirosina quinase e previne a fosforilação de substratos que são envolvidos na regulação do ciclo celular (DRUKER *et al.*,1996; DEININGER *et al.*,1997; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*,1997). Um maior conhecimento da atividade desses agentes contra a oncoproteína levou aos estudos de fase I e II envolvendo pacientes com LMC resistentes ao IFN- α ou em fases avançadas da doença. Ambas as respostas, hematológica e citogenética, se mostraram superiores quando comparadas às respostas obtidas com outras modalidades terapêuticas até então disponíveis (DRUKER *et al.*,2001 a,b).

O presente trabalho foi realizado através de dados laboratoriais e clínicos de 22 pacientes portadores de LMC em fase crônica, tratados com mesilato de imatinibe e acompanhados pelo serviço de onco-hematologia do Centro de Pesquisas Oncológicas, instalado no Complexo Oncológico Alfredo Daura Jorge. Os mesmos foram avaliados durante o período de 24 meses de tratamento com o fármaco, analisando-se os seguintes parâmetros: idade, sexo, tempo de doença diagnosticada, tratamento prévio e achados laboratoriais do primeiro hemograma. A eficácia terapêutica foi investigada pela análise da sobrevida global, taxa de resposta hematológica e sua manutenção, sobrevida livre de progressão da doença e taxa de resposta citogenética. As amostras de medula óssea (antes e após o tratamento) foram avaliadas quanto à celularidade (detendo-se também na avaliação particular da série megacariocítica), ao grau de fibrose e ao grau de vascularização, correlacionando-se estes dois últimos com a resposta citogenética.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar as alterações estromais observadas na BMO de pacientes com LMC, decorrentes do tratamento com mesilato de imatinib, correlacionando com outros parâmetros laboratoriais e clínicos.

2.2 Específicos:

- Avaliar o perfil dos pacientes com LMC, observando as seguintes características: sexo, idade, tempo de doença diagnosticada, tratamento prévio, presença de esplenomegalia e achados laboratoriais do primeiro hemograma;
- Analisar a eficácia do fármaco em pacientes portadores de LMC, durante dois anos de tratamento através da:
 - avaliação da sobrevida global dos pacientes;
 - avaliação da manutenção da resposta hematológica, observada trimestralmente;
 - avaliação da sobrevida livre de progressão da doença;
 - avaliação da resposta citogenética;
- Analisar as amostras de medula óssea (antes e após o tratamento), quanto:
 - à celularidade geral
 - à distribuição da série megacariocítica (associando-a com o grau de fibrose);
 - ao grau de fibrose;
 - ao grau de vascularização;
- Verificar se existe correlação entre o grau de fibrose da medula óssea (do diagnóstico e pós-tratamento) e a resposta citogenética;
- Verificar se existe correlação entre vascularização da medula óssea (do diagnóstico e pós-tratamento) e a resposta citogenética.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A seqüência de eventos dos primeiros relatos da LMC foi descrita com detalhes em uma revisão publicada por GEARY, 2000. Os primeiros relatos de pacientes portadores da LMC foram observados quase ao mesmo tempo por dois jovens médicos, John Hugues Bennet, em 1845 em Edimburgo e Robert Virchow, em Berlim, em 1858. Apesar de algumas observações terem sido feitas em 1825 sobre pacientes com aumento do volume do baço e sangue espesso, o marco relevante na descrição surgiu a partir das publicações feitas por esses dois médicos, nas quais combinaram detalhes clínicos e *post-mortem* com detalhes microscópicos, além de noções de fisiopatologia. Em 1847, VIRCHOW utilizou o termo “sangue branco”, ou “leukäemie” para descrever a aparência pouco característica do sangue de seu paciente, e a inversão da proporção usual de células brancas e vermelhas. Bennet propôs o termo leucocitemia após uma revisão de um trabalho composto por 37 casos, publicado em uma monografia em Edimburgo em 1852.

Nos 10 anos seguintes, VIRCHOW publicou inúmeros estudos com especulações a respeito da patologia da doença. Segundo essas rudimentares observações, porém de grande importância, a leucocitose aparecia de maneira autônoma, progressiva, caracterizada não apenas pelo aumento do número de células brancas, mas também pela diminuição do número de células vermelhas, associadas às mudanças no baço e fígado. Segundo ele, a causa da doença estaria no tecido responsável pela produção de células brancas. Em 1870, a medula óssea passou a ser reconhecida como um importante local para produção de células sanguíneas. Esta observação foi feita por meio da autópsia de uma paciente que havia falecido com leucemia, pois a medula óssea apresentava um aspecto amarelo-esverdeado escuro, muito diferente da aparência vermelha normal. Em 1878, o pesquisador NEWMANN publicou uma nota na qual ele acreditava que a produção de células vermelhas era independente da produção de células brancas. O próximo passo importante na classificação das leucemias foi a introdução de métodos de coloração a partir de 1879, por Paul Ehrlich. A partir da identificação do mieloblasto como precursor da série granulocítica em 1900, do uso de esfregaço de sangue periférico e da introdução da coloração com peroxidase, o diferencial dos elementos da LMC ficou mais consistente. Em 1920, já se sabia que a doença cursava com basofilia e trombocitose. Muitos estudos foram publicados entre 1900 e 1930, com séries relativamente grandes de pacientes portadores de LMC. A mediana de sobrevida destes casos era de três anos sem nenhum tratamento, embora houvesse relatos de sobrevida maior que 10

anos. Por volta de 1930, tinha-se a impressão de que o aumento do número de mieloblastos estava relacionado com a morte no final da doença, embora ainda não se falasse em crise blástica. Esta fase dramática foi chamada de “metamorfose” até 1959, um ano antes da descoberta do cromossomo Ph. Praticamente nada se sabia sobre a etiologia da LMC, apenas alguns relatos de exposição ao benzeno e à irradiação e de trabalhadores da área de saúde expostos ao raio-X nos anos 20, até à seqüela hematológica das duas bombas atômicas no Japão. A LMC foi uma das conseqüências daquela catástrofe (GEARY, 2000).

No final de 1960, dois cientistas, NOWELL e HUNGERFORD, que trabalhavam na cidade de Philadelphia, EUA, descreveram um cromossomo muito pequeno em células cultivadas a partir de sangue de sete pacientes com LMC. Esse achado, que parecia uma deleção do braço longo do cromossomo 22 (22q-) foi prontamente confirmado por outros pesquisadores. E este cromossomo anormal se tornou conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph¹). Em princípio, foi chamado de Ph¹ porque eles achavam que este seria o primeiro de uma série de anomalias encontradas em diferentes tipos de leucemia. Entretanto, por mais de uma década, este foi o único cromossomo anormal correlacionado a uma específica neoplasia (GEARY, 2000).

Em 1973, ROWLEY mostrou que a deleção do cromossomo 22 era, na verdade, uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (Figura 1). Técnicas de sincronização e bandamento de alta resolução permitiram, por fim, a identificação dos “pontos de quebra” cromossômicos, sendo o cromossomo Ph caracterizado como t(9;22)(q34.1;11.21) (SAWERS, 1999).

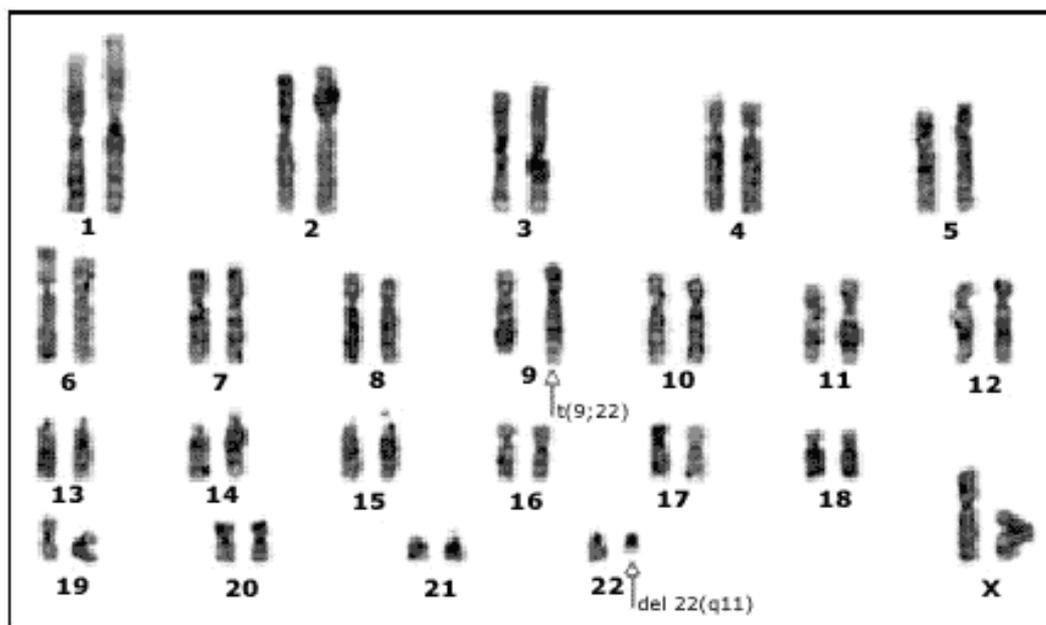


Fig. 1- G-banding karyotype showing 46, XX, t(9;22) (q34;q11)

Figura 1: Translocação equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22

A suposição de Rowley de que a $t(9;22)(q34.1;11.21)$ era recíproca, foi confirmada em 1982 por meio da demonstração de que o cromossomo Ph^1 representava, em nível gênico, a transposição do oncogene C-ABL de sua posição normal no cromossomo 9q34 para o cromossomo 22q11, em uma região de DNA, de 5 a 6 kd, chamado de breakpoint cluster region (BCR) gene (DE KLEIN *et al.*, 1982). O mecanismo pelo qual ocorre esta translocação e o tempo necessário para a transformação na doença propriamente dita é desconhecido. Sabe-se que pessoas expostas a altas doses de irradiação têm um aumento significativo do risco de desenvolvimento de leucemia. Tem sido proposto também, que a proximidade dos genes BCR-ABL nas células hematopoiéticas na interfase pode favorecer translocações entre dois genes (HUNTLY *et al.*, 2001). O gene BCR-ABL no cromossomo Ph^1 é expresso em praticamente todos os pacientes com LMC. Já o ABL-BCR, que se encontra no braço longo do cromossomo 9 (9q+), é expresso em apenas 70% dos casos.

Além do cromossomo Ph^1 , outra característica dos portadores de LMC é a presença de anormalidades clonais e citogenéticas adicionais. Estas anormalidades são outras alterações cromossômicas, presentes em 10-30% dos pacientes com LMC em fase crônica e em cerca de 80% dos portadores de LMC agudizada (JOHANSSON *et al.*, 2002). Duas cópias do cromossomo 22q- ou duplo Ph , trissomia do cromossomo 8, isocromossomo 17q, trissomia do cromossomo 19, são consideradas anormalidades mais comuns, ou maiores. Alterações menos comuns são: perda do cromossomo Y, $t(3;21)(q26;q22)$, monossomia do 7, monossomia e trissomia do 17 e trissomia do 21 (MALOISEL *et al.*, 1999). Frequentemente é atribuído um

prognóstico reservado à presença de uma dessas alterações, principalmente o duplo cromossomo Ph¹ e anormalidades do cromossomo 17 (MARKTEL *et al.*, 2003). Entretanto, elas não parecem encerrar um pior prognóstico quando são evidenciadas ao diagnóstico (JOHANSSON *et al.*, 2002). Aparentemente, esta influência só se manifesta negativamente quando acompanhado de outros sinais clínicos e laboratoriais de aceleração, como o aumento do número de blastos (O'DWYER *et al.*, 2002). Na crise blástica, o valor prognóstico é menos claro. É relativamente bem estabelecido que não existe diferença prognostica entre pacientes agudizados que apresentam ou não anormalidades citogenéticas adicionais. Provavelmente, o ponto principal na interpretação da existência das anormalidades citogenéticas adicionais seja o fato delas determinarem uma vantagem seletiva a um clone geneticamente instável, fazendo com que apenas as células que possuem a nova alteração sobrevivam (DEININGER, 2003).

A primeira evidência de envolvimento de mecanismo molecular em leucemia humana foi a formação do gene híbrido, no caso o BCR-ABL no cromossomo 22q- (OWEN, 2001). O gene normal *abl* (*c-abl*) localizado no cromossomo 9 é homólogo a um oncogene viral, encontrado em leucemias murinas (Abelson murine leukemia vírus, *v-abl*). Posteriormente, foi demonstrado que o gene híbrido BCR-ABL no cromossomo Ph tinha capacidade de transformar células em cultura e de ser oncogênico em experimentos de transfecção em ratos (MELO, 1999). O gene normal *abl* codifica uma tirosina quinase, que é ativa na transdução de sinais. O gene quimérico BCR-ABL codifica uma tirosina quinase aberrante de peso molecular maior do que a codificada pelo ABL (Figura 2) (BAIN, 2002).

t (9;22) (q34;q11)

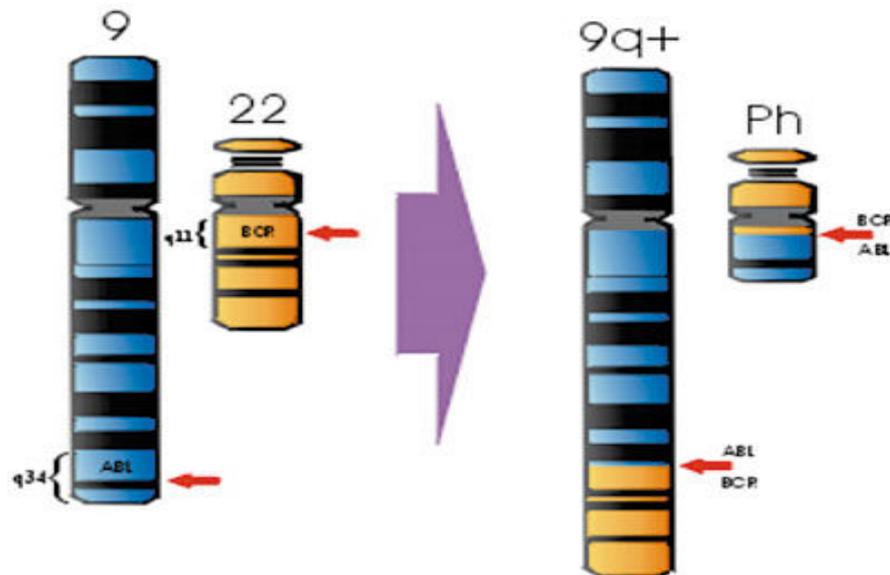


Figura 2: Fusão dos genes BCR-ABL com conseqüente produção da proteína BCR-ABL, com atividade tirosina quinase alterada

Na LMC, a clássica fusão dos genes BCR-ABL é a b2a2 ou b3a3, na qual se funde o exon 2 (b2) ou o exon 3 (b3) do BCR ao exon 2 (a2) do ABL, gerando uma oncoproteína de peso molecular de 210 kd (p210). Nos casos de leucemia linfóide aguda Ph¹ positiva, ocorre uma fusão com a produção de uma oncoproteína de menor peso molecular, a p190. O terceiro tipo de translocação gera uma oncoproteína de 230 kd (p230), associada a uma rara leucemia neutrofílica, com poucas células jovens circulantes (BAIN, 2002; SATTLE & GRIFFIN, 2003).

A ativação constante da tirosina quinase, por meio de uma oligomerização da proteína BCR-ABL, causa ativação constante de várias etapas de sinalização. Apesar da identificação de muitas destas etapas, tem sido difícil correlacionar um específico evento sinalizador com um específico evento biológico. Entre as etapas de sinalização, as mais importantes ativadas cronicamente pelo BCR-ABL são: RAS, PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), ROS (reactive oxygen species) e STAT (signal transducer and activator of transcription). O BCR-ABL

também induz expressão de proteínas anti-apoptóticas mitocondriais, tipo BCLx (SATTLER & GRIFFIN, 2003; GOLDMAN & MELO, 2003).

3.2 BIOLOGIA CELULAR DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Na LMC, progenitores mielóides se expandem em vários estágios de maturação, são liberados prematuramente no sangue periférico e podem alocar-se em sítios extra-medulares. A expansão desordenada das células progenitoras mielóides parece ser resultado de alterações na sua capacidade proliferativa e no balanço entre auto-renovação e diferenciação, aumentando o número de células progenitoras e reduzindo o número de células tronco. As células-tronco tornam-se parte do compartimento proliferativo, fazendo com que a população de células neoplásicas se expanda exponencialmente na maturação final, tornando-se menos responsivo a sinais reguladores de crescimento tanto das citocinas, quanto do microambiente da medula óssea. Um defeito na aderência das células hematopoiéticas imaturas ao estroma medular pode facilitar a liberação destas células no sangue periférico. Células progenitoras hematopoiéticas normais se aderem à matriz extracelular ou são imobilizadas por citocinas reguladoras do crescimento. A ligação é mediada por receptores de superfície celular, especialmente as integrinas, que são glicoproteínas de superfície celular compostas por duas subunidades, α e β . Enquanto a cadeia α determina a especificidade da ligação, a cadeia β inicia as etapas de transdução de sinais. O defeito da citoadesão das células da LMC pode ser restaurado pela incubação de células Ph¹ positivas com oligonucleotídeos antisense contra a p210, inibidores da tirosino quinase e com interferon alpha. A supressão de etapas da apoptose tem sido implicada na patogênese da LMC. Células progenitoras hematopoiéticas que expressam a p210 são capazes de escapar da dependência de fatores de crescimento (FADERL *et al.*, 1999).

3.3 QUADRO CLÍNICO E LABORATORIAL

3.3.1 Fase Crônica

A LMC é uma doença progressiva que evolui em fases, sendo o diagnóstico usualmente feito na fase crônica, que é comumente caracterizada por um curso indolente e por um fácil controle terapêutico. O principal achado do exame clínico é a esplenomegalia, presente em cerca de 80% dos pacientes ao diagnóstico (FADERL *et al.*, 1999). Os sintomas

típicos apresentados ao diagnóstico são: letargia e outros relacionados à anemia. É comum também o paciente sentir desconforto abdominal devido à esplenomegalia. Sudorese e perda de peso não são raras, enquanto que febre é menos comum nesta fase, bem como sintomas relacionados à disfunção plaquetária, tais como sangramentos ou trombozes. Da mesma maneira, manifestações relacionadas a hiperviscosidade, como priapismo e distúrbios visuais, são raras. Contudo, em cerca de 20% a 30% dos casos, o diagnóstico é feito em indivíduos assintomáticos, após exames laboratoriais de rotina. A característica fundamental dos exames laboratoriais no diagnóstico é a leucocitose com desvio escalonado encontrada no hemograma. A contagem de leucócitos geralmente está entre 100.000 e 300.000/mm³, podendo chegar a 500.000/mm³. A contagem de plaquetas acima de 700.000/mm³ é encontrada em cerca de 30% dos casos. A anemia, resultado de uma eritropoiese ineficiente e sobrevida eritróide diminuída por seqüestro esplênico, pode ser discreta com padrão normocrômico e normocítico. Raramente observa-se aumento da massa eritrocitária semelhante à vista na policitemia vera. O exame citológico do sangue periférico permite verificar a presença de células de linhagem mielóide em todos os estágios de diferenciação, com predomínio de mielócitos e neutrófilos segmentados. É típico também o encontro de basofilia e eosinofilia. Na análise citológica da medula óssea, observa-se uma densa população de células mielóides, com diferenciação preservada, e uma relação mielóide:eritróide média de 25:1. Os megacariócitos estão presentes em número elevado e com certo grau de displasia. Na biópsia, observa-se intensa hiperplasia às custas de células da linhagem mielóide. A linhagem megacariocítica também pode estar hiperplasiada, com elementos ectópicos e a rede reticulínica geralmente encontra-se aumentada (SAWYERS, 1999) (Tabelas 01 e 02).

Tabela 1: Achados laboratoriais do sangue periférico de pacientes portadores de LMC em fase crônica

Sangue periférico
Elevado número de leucócitos (> 25.000/mm ³)
Elevado número de plaquetas
Elevado número de basófilos
Reduzida atividade da fosfatase alcalina leucocitária
Todos os estágios de diferenciação granulocítica visível em esfregaço de sangue periférico

Tabela 2: Achados da medula óssea de pacientes portadores de LMC em fase crônica

Medula Óssea
<p>Hipercelularidade</p> <p>Reduzida gordura intramedular</p> <p>Aumento do número de megacariócitos</p> <p>Menos de 10% de blastos e promielócitos</p> <p>Aumento da relação de células mielóides em relação às eritróides</p>

Em aproximadamente 90% dos casos de LMC, a translocação 9;22 é detectada através da análise do cariótipo através da citogenética convencional. Esta técnica é o teste diagnóstico de escolha para LMC, pois é o único método capaz de detectar anormalidades cariotípicas adicionais. Entretanto, esta técnica requer tempo, é trabalhosa e apenas 20 a 25 células podem ser examinadas (KAEDA *et al.*, 2002). Além disso, em cerca de 5% dos casos, o cariótipo pode ser normal e o paciente ser classificado como Ph¹ negativo. Nestes casos, a fusão BCR-ABL pode ser detectada por meio de técnicas moleculares, tais como FISH e PCR (SAWYERS, 1999).

3.3.2 Fase acelerada

A fase acelerada é um estágio intermediário, no qual os pacientes apresentam sinais de progressão da doença. Esta fase é caracterizada por um agravamento de sintomas constitucionais, esplenomegalia progressiva, refratariedade ao tratamento com progressiva leucocitose e/ou trombocitose. Anemia e trombocitopenia também são frequentemente observadas. Acompanhando essa proliferação celular, observa-se um aumento da porcentagem de blastos, promielócitos e basófilos na medula óssea e/ou no sangue periférico. Os pacientes podem desenvolver cariótipos com anormalidades citogenéticas adicionais (O'DWYER *et al.*, 2002).

Tabela 3: Critérios para o diagnóstico da leucemia mielóide crônica em fase acelerada

CRITÉRIOS USADOS NA PRÁTICA CLÍNICA
<p>Blastos na MO ou SP > 10%</p> <p>Basófilos e eosinófilos na MO ou SP > 20%</p> <p>Frequente pseudo Pelger-Huet em neutrófilos, células vermelhas nucleadas ou fragmentos nucleares</p> <p>Aumento da reticulina na MO</p> <p>Leucocitose acima de 50.000/mm³</p> <p>Anemia (hematócrito < 25%)</p> <p>Trombocitopenia (< 100.000/mm³) não controlada por terapia antileucêmica</p> <p>Progressiva esplenomegalia não responsiva ao tratamento</p> <p>Febre e dor óssea sem causa</p> <p>Aumento da dosagem do medicamento em questão</p>
CRITÉRIOS DERIVADOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA
<p>Blastos periféricos > 15%</p> <p>Blastos e promielócitos periféricos > 30%</p> <p>Basofilia periférica > 20%</p> <p>Trombocitopenia (< 100.000/ mm³) não relacionada à terapêutica</p> <p>Evolução citogenética clonal</p>

3.3.3 Crise blástica

Durante o curso da LMC, após um intervalo médio de 3 a 6 anos, ocorre uma mudança relativamente abrupta no curso da doença. Observa-se um acúmulo progressivo de elementos celulares imaturos (mieloblastos e promielócitos) no sangue periférico ou na medula óssea.

Quando o número de blastos é superior a 30%, ou evidencia-se a presença de um sarcoma granulocítico, o diagnóstico de fase aguda ou crise blástica é estabelecido. Os blastos podem apresentar fenótipo mielóide (60% a 70% dos casos, incluindo as raras agudizações megacariocíticas, eritróides e basofílicas), linfóide (25% a 30%) ou mesmo serem bifenotípicas (5% a 10%) (SILVER, 2003). Cerca de 30% dos pacientes desenvolvem a crise

blástica diretamente a partir da fase crônica. Diferentemente da fase crônica, a crise blástica encerra prognósticos extremamente reservados, apresentando uma resposta precária às diversas manobras terapêuticas utilizadas (SUREDA *et al.*, 2003).

3.4 ESTUDO DE FATORES DE PROGNÓSTICO

Apesar de todos os pacientes de LMC evoluírem para agudização, observa-se uma grande heterogeneidade no tempo que se leva para atingi-la, ou seja, na duração da fase crônica. A completa caracterização deste fenômeno se deu com a estratificação dos pacientes em vários grupos prognósticos, de acordo com os achados clínicos e laboratoriais apresentados ao diagnóstico (FARDEL *et al.*, 1999).

O trabalho que primeiro definiu os subgrupos foi o Grupo Internacional de Estudo Prognóstico da LMC (SOKAL *et al.*, 1984). Dados clínicos, laboratoriais e evolutivos de 678 pacientes portadores de LMC Ph¹ positivo, em fase crônica, formaram a base para a criação desta classificação prognostica. Uma análise estatística multivariada regressiva desses dados permitiu a identificação de quatro variáveis de importância prognostica: idade, tamanho do baço, contagem de plaquetas e percentual de blastos no sangue periférico, com as quais foi construído um modelo matemático. Este modelo, atribuindo peso contínuo a cada uma das variáveis, permitiu a classificação dos portadores de LMC em três grupos: pacientes de baixo risco, intermediário e alto risco, que apresentam uma sobrevida média em dois anos de 93%, 80% e 65%, respectivamente. A estimativa de mediana de sobrevida calculada pelo método de Kaplan-Meier foi de 30 meses para pacientes de alto risco e de 60 meses para os de baixo risco. O escore de Sokal que foi utilizado até os anos 90 foi baseado em dados estatísticos de pacientes que receberam BU e HY, sendo, portanto, pouco reprodutível quando aplicados a pacientes tratados com IFN- α . Por esta razão, o Grupo Internacional Colaborativo de Fatores de Prognóstico para LMC, desenvolveu e validou um novo escore através da análise de 1.300 pacientes tratados com IFN- α provenientes de vários estudos prospectivos (HASFORD *et al.*, 1998). Esse novo escore, também conhecido como Escore Europeu utiliza: idade, tamanho do baço (medido desde a margem costal esquerda), basófilos, plaquetas, eosinófilos e blastos, observadas ao diagnóstico. Três grupos foram identificados. O grupo de baixo risco (escore \leq 780), que compreendeu 41% dos pacientes, mostrou uma mediana de tempo de sobrevida de 96 meses e a probabilidade de sobrevida, em 9 anos, de 41%. O grupo de risco intermediário (escore $>$ 780 e \leq 1.480), comprometeu 45% dos pacientes e apresentou mediana de sobrevida de 65 meses e a sobrevida, em 9 anos, de 0,16%. O grupo de alto risco (escore $>$ 1.480), com 14% dos pacientes, apresentou uma mediana de sobrevida de 42 meses, sendo que nenhum paciente permaneceu vivo no final de 9 anos (HASFORD *et al.*, 2003).

3.5 TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

3.5.1 Histórico

Segundo a revisão histórica da LMC publicada por GEARY em 2000, o primeiro caso de “leucocitemia” foi tratado com ferro e quinina, sem nenhum resultado. Em 1865, uma paciente com o mesmo diagnóstico foi tratada com arsênico em baixas doses, combinado com iodo e cloreto de potássio. Em relatos da época, houve grande melhora do estado da paciente, como diminuição do tamanho do baço, diminuição do número de células brancas e melhora da anemia por alguns meses. O arsênico, introduzido por Thomas Fowler em 1786, foi utilizado na medicina em concentrações de 1% para febres, dores de cabeça e como tônico. CUTLER & BRADFORD, no hospital de Boston, foram os primeiros pesquisadores a estudarem cientificamente os efeitos do arsênico em amostras de sangue de controles normais e de doentes. Essas preparações com arsênico foram utilizadas no tratamento da LMC até 1903, época da introdução da radioterapia. O benzeno também foi utilizado, particularmente por médicos alemães, de 1912 até 1935, quando teve seus primeiros relatos comparados à radioterapia. Em 1903, o valor terapêutico dos raios-x em esplenomagelia foi demonstrado pelo professor Nicholas Senn. Ele percebeu uma rápida diminuição no tamanho do baço e uma pequena queda no número de leucócitos. Os pacientes que iniciaram o tratamento com radioterapia tiveram uma melhora tão evidente que, pela primeira vez, o termo “remissão” começou a ser utilizado. Entretanto, a evolução fatal era inexorável, apesar do tratamento. Em 1950, alguns trabalhos publicados mostravam uma mediana de duração da doença de três anos. E esse tempo de sobrevida não era modificado pela radioterapia. A esplenectomia foi descrita pela primeira vez em 1863, tendo sido um desastre, pois o controle do sangramento pós-operatório tornava a cirurgia fatal. Posteriormente, a cirurgia era indicada em pacientes tratados previamente com radioterapia, sendo que as complicações pós-operatórias melhoraram significativamente. Após 40 anos, este tipo de tratamento provou ser pouco justificável, já que não prolongava a vida do paciente, sendo definitivamente abandonada no final da década de 60. A primeira droga citotóxica utilizada em LMC foi a mostrada nitrogenada, desenvolvida na época da Primeira Guerra Mundial. Em 1947, foi demonstrada uma enorme queda no número de leucócitos, por meio de infusão intravenosa. Apesar da melhora clínica observada em alguns pacientes com LMC, também não houve impacto na sobrevida deles (GEARY, 2000).

Uma vez confirmado o diagnóstico de LMC, o tratamento está indicado em todos os pacientes. Os recursos terapêuticos disponíveis para uso clínico são agentes citostáticos, IFN- α associado ou não à citarabina, transplante de células-tronco hematopoiéticas e mesilato de imatinibe.

3.5.2 Agentes Citostáticos

Os dois principais agentes citostáticos utilizados no tratamento dos pacientes com LMC são Hidroxiuréia (HY) e Bussulfano (BU). Durante a fase crônica, a terapia de citorredução é recomendada para a maioria dos pacientes a fim de diminuir a quantidade de massa tumoral existente e diminuir o risco de complicações trombóticas decorrentes da leucocitose. As células da LMC são bastante sensíveis às drogas quimioterápicas orais e cerca de 90% dos pacientes tratados com HY ou BU obtêm remissão hematológica completa.

De maneira geral, o BU e a HY são eficazes em controlar os sintomas e sinais relacionados à doença capazes de normalizar os parâmetros hematológicos em 50% a 80% dos casos. Entretanto, a obtenção de remissão citogenética ou molecular é excepcional com essas drogas e, quando ocorre, é de curta duração.

Dessa forma, ambos os dois não são capazes de evitar a progressão da doença e o benefício da utilização dessas drogas na sobrevida dos pacientes com LMC é mínimo.

3.5.2.1 Bussulfano

O Bussulfano, introduzido para uso clínico em 1950, é uma droga de administração oral, de baixo custo e eficaz no controle dos parâmetros hematológicos. Foi a primeira droga efetiva no controle da LMC, demonstrando uma ação mais seletiva no tecido hematopoiético e, particularmente sobre a série granulocítica. Os efeitos adversos mais relevantes incluem uma mielossupressão prolongada em até 10% dos pacientes, além de fibrose pulmonar, mielofibrose e endomiocardiofibrose. O BU apresentou melhores resultados do que a radioterapia, apesar de não atuar sobre o retardo da crise blástica. Essa droga praticamente não é mais utilizada em razão dos graves efeitos adversos e da influência negativa nos resultados obtidos nos pacientes submetidos posteriormente a transplante (OSAROGIAGBON, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

3.5.2.2 Hidroxiuréia

A Hidroxiuréia, introduzida em 1972 no tratamento da LMC, tornou-se a droga de escolha para o controle da doença com taxas de resposta hematológica completa de até 80%. O composto tem a capacidade de interferir na síntese de DNA pela inibição da enzima ribonucleotídeo-redutase, sendo menos tóxico do que o BU, pois não produz mielotoxicidade irreversível. A HY é uma droga de fácil utilização e de ser bem tolerada por via oral. No entanto, o indivíduo pode apresentar alguns efeitos adversos, tais como: anemia megaloblástica e úlceras de mucosa (OSAROGIAGBON, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Apesar da HY ter demonstrado uma superioridade na sobrevida dos pacientes quando comparada ao BU, ambas as terapias não induzem à remissão citogenética ou previnem a progressão para crise blástica (HEHLMANN *et al.*, 1993).

3.5.3 Interferon Alfa

Os interferons são glicoproteínas produzidas por células eucarióticas em resposta a estímulos antigênicos como aqueles que ocorrem em infecções virais e doenças malignas. Primeiramente foram descritos como potentes agentes retrovirais. Posteriormente foi demonstrado que este agente promovia um efeito no controle da proliferação celular e na modulação do sistema imune (FADERL *et al.*, 1999). A descoberta de que os interferons inibiam o crescimento de células normais e malignas do tecido hematopoiético *in vitro* e *in vivo* levaram a um estudo piloto utilizando-se IFN- α . O real mecanismo de envolvimento no controle da proliferação de células malignas pelo IFN- α na LMC ainda permanece obscuro. O IFN- α pode exibir efeitos diretamente antiproliferativos em uma variedade de tipos celulares. Os mecanismos incluem: controle da transição do ciclo celular, modulação da apoptose e indução de genes interferons-dependentes envolvidos diretamente no controle de crescimento. Além disso, em células hematopoiéticas precursoras, o IFN- α tem demonstrado efeitos inibitórios no crescimento clonogênico e tem se mostrado profundamente envolvido na regulação de moléculas de adesão (FADERL *et al.*, 1999).

O IFN- α foi introduzido no tratamento da LMC no início dos anos 80. Os resultados do M.D. Anderson Câncer Center, Houston, entre 1982 e 1990, mostraram que quando o IFN- α era utilizado na fase inicial da doença na dose de 5 milhões U/m²/d, as taxas de resposta

hematológica completa (RHC) e resposta citogenética completa (RCC) era de 80% e 25%, respectivamente (TALPAZ, 2001).

Vários estudos comparativos demonstraram que as taxas de resposta citogenética eram significativamente mais altas em pacientes tratados com IFN- α do que com a terapia convencional (HELHLMAN *et al.*, 1994; ALLAN *et al.*, 1995; OHNISHI *et al.*, 1995; BENELUX CML STUDY GROUP, 1998; ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP ON CML, 1998). O tratamento com IFN- α modificou a história da LMC. Pela primeira vez, uma droga poderia prolongar a vida e induzir ao desaparecimento do cromossomo Ph¹ (BACCARANI *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados promissores do tratamento, pouco se sabia a respeito do prognóstico dos pacientes que apresentavam resposta citogenética e sobre o impacto que isto tinha na sobrevida deles. KANTARJIAN publicou um estudo no qual são analisados 512 pacientes LMC Ph positivos que foram tratados com IFN- α , entre 1981 e 1995. A resposta citogenética completa foi atingida em 27% dos pacientes, sendo que a sobrevida deste grupo com resposta completa em 10 anos foi de 78%. A análise do RT-PCR em 78 pacientes com RCC mostrou que 46 apresentaram pelo menos um episódio de remissão molecular ao longo do seguimento. Esses dados mostraram que pacientes com remissão citogenética e/ou molecular podem ter uma sobrevida bem superior, mesmo sem transplante (KANTARJIAN *et al.*, 2003).

Entretanto, a terapia com IFN- α leva aos efeitos colaterais constitucionais em praticamente todos os pacientes. A frequência da toxicidade com IFN- α é maior do que com BU e HY. A taxa de toxicidade causada pelo IFN- α pode levar à suspensão do tratamento em 20% dos casos (OZER *et al.*, 1993). Um grande número de pacientes tem sintomas de gripe, dores musculares, fadiga, perda de peso. Além desses efeitos, podem ocorrer alterações neuropsiquiátricas e auto-imunes, como hipotireoidismo e hipertireoidismo. Esse tratamento pode levar a um sério comprometimento da qualidade de vida (HAHN & GLENDENNING, 2003).

O principal objetivo do tratamento é a obtenção da resposta hematológica seguida da remissão citogenética. Entretanto, estes dois parâmetros podem ser afetados por algumas variáveis, tais como: risco prognóstico, tempo do diagnóstico até o início do tratamento, dose, duração do tratamento e uso de terapia coadjuvante. Após tantos anos de experiência com o tratamento com IFN- α , pode-se afirmar que:

- As taxas de resposta hematológica e citogenética são mais altas quanto mais cedo o paciente for tratado;
- As taxas de resposta hematológica e citogenética são mais altas em pacientes de baixo risco do que em pacientes de alto risco;
- A resposta citogenética é precedida pela resposta hematológica;
- Geralmente os pacientes que apresentam resposta citogenética têm o número de leucócitos inferior a $4 \times 10^9/L$;
- Resposta citogenética maior (RCM) (< 35% de células Ph positivas) e RCC geralmente são observadas após 12 meses ou mais;
- Pacientes que apresentam RCM têm uma sobrevida maior quando comparados àqueles com respostas menores ou aos que não responderam;
- A RCC e a RCM deve ser sustentada por mais de 6 a 12 meses para que seja observado algum impacto na sobrevida;
- A monitorização de doença residual mínima por meio de técnicas quantitativas de PCR em pacientes com RCC vai delinear aqueles que vão recidivar;
- Pacientes que não obtêm resposta hematológica com dose total de IFN- α tem um prognóstico ruim e pouco a ganhar com a continuidade do tratamento (BACCARINI *et al.*, 2003).

A melhora da expectativa de vida para pacientes que receberam IFN- α quando comparada com a daqueles que foram tratados com HY ou BU, aumenta em torno de 20 meses. Quanto maior a resposta citogenética, maior é a expectativa de vida. Desta forma, entende-se que a resposta citogenética seja considerada como um marcador de sobrevida (BACCARINI *et al.*, 2003).

3.5.4 Interferon e Citarabina

Droga que foi mais investigada na associação com IFN- α foi a Citarabina. Este agente antineoplásico é um nucleosídeo arabinosídeo que pertence à classe dos antimetabólitos. O seu efeito antineoplásico é maximizado durante a fase de síntese do ciclo celular, sendo seu espectro de atividade restrito às células que se encontram em divisão. Além de ser uma substância potente no tratamento da leucemia mielóide aguda, demonstrou em ensaios laboratoriais, uma inibição na formação de colônias granulocíticas-macrofágicas. Essas

observações levaram ao desenvolvimento de projetos clínicos envolvendo associações deste agente com IFN- α no tratamento da LMC (ROSTI *et al.*, 2001). O primeiro resultado clínico do emprego da Citarabina em LMC foi reportado por SOKAL em dois pacientes com 100% das células Ph¹ positivas. Após dois ciclos, o número de metáfases positivas caiu para 8% no primeiro paciente e para 44% no segundo paciente. Após quatro ciclos, um dos pacientes obteve RCC e o outro obteve RCM. Neste momento, o fármaco foi suspenso e os pacientes passaram a receber HY em doses altas. Logo após, o número de células Ph¹ positivas começou a aumentar. Com isso, este estudo concluiu que a droga específica para LMC era a Citarabina, e não a HY (SOKAL *et al.*, 1988).

Estudos não comparativos começaram a utilizar diferentes doses de IFN- α associado à Citarabina no tratamento da LMC, mostrando que estas combinações eram bastante efetivas (KANTARJIAN *et al.*, 1992). Em 1997, um grupo francês publicou um trabalho randomizado com 721 pacientes em fase crônica precoce. Neste estudo, metade dos pacientes recebeu IFN- α a 5 milhões U/m² e a outra metade recebeu IFN- α combinado com a Citarabina na dose de 40 mg/dia, durante 10 dias, ou 15 dias nos casos de resposta hematológica não completa. Os pacientes que se encontravam no grupo do IFN- α apenas e que não obtiveram resposta hematológica completa após 6 meses ou menos de 33% de Ph¹ negativo após 12 meses, poderiam ser transferidos para o outro grupo. A resposta hematológica completa foi atingida em 66% dos pacientes no grupo da combinação, contra 55% dos pacientes que só receberam IFN- α . A superioridade do tratamento combinado também foi evidente na resposta citogenética, onde 41% dos pacientes tratados com IFN- α e Citarabina atingiram a RCC, enquanto 21% dos pacientes tratados apenas com IFN- α apresentaram RCC. A sobrevida global também se mostrou superior, sendo de 85,7% em 3 anos contra 79,1% (GUILHOT *et al.*, 1997).

Entretanto, um grande trabalho conduzido por um grupo italiano não mostrou um melhor resultado na resposta citogenética e sobrevida dos pacientes quando a Citarabina foi adicionado ao tratamento com IFN- α . Neste estudo, que incluiu 538 pacientes randomizados para o tratamento com IFN- α ou IFN- α e Citarabina, as diferenças na sobrevida global e na RCM entre os dois grupos e nos diferentes grupos de risco (alto, intermediário e baixo), não foram estatisticamente significantes (BACCARINI *et al.*, 2002).

Os efeitos positivos da combinação do Ara-C e IFN- α têm que ser comparados à toxicidade que os mesmos produzem. Nenhum dos estudos publicados foi específico na avaliação da qualidade de vida. Quando os efeitos colaterais são avaliados, torna-se difícil

distinguir qual droga é responsável por qual efeito, já que as reações adversas se sobrepõem (BACCARINI *et al.*, 2003).

3.5.5 Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH)

A LMC era invariavelmente fatal até 1970. Essa realidade foi modificada após a introdução do TCTH, em 1986. Apesar dos pacientes serem geralmente mais velhos do que a idade ideal para transplante, essa modalidade terapêutica ainda é considerada o único tratamento curativo para a LMC (GOLDMAN & DRUKER, 2001). O potencial curativo do TCTH de células tronco, parece ser dependente de um efeito imunológico da doença do enxerto contra o hospedeiro. No entanto, esta modalidade terapêutica tem sido utilizada como prática freqüente no tratamento da LMC há mais de 20 anos. O registro internacional de 5.816 pacientes com LMC transplantados entre 1994 e 1999 mostrou uma sobrevida de $69\% \pm 2\%$, no grupo de pacientes transplantados em fase crônica com um ano de diagnóstico, e $57\% \pm 3\%$ entre os pacientes que se encontravam na fase crônica com mais de um ano de diagnóstico (BARRET, 2003). Entretanto, a toxicidade do transplante de células tronco e associação com o risco de morte aumentam com a idade. Apenas 45% dos pacientes com LMC têm menos de 60 anos ao diagnóstico. Destes pacientes, apenas 30% têm doador aparentado HLA compatível. Desta forma, o transplante é uma opção terapêutica para aproximadamente 40% dos pacientes com LMC. Doador não aparentado, idade superior a 40 anos, fase avançada da doença, demora de mais de um ano entre o diagnóstico e o transplante e par doador feminino e receptor masculino são fatores de pior prognóstico na evolução do transplante (GRATWOHL *et al.*, 1993).

3.5.6 Mesilato de Imatinibe

A partir de estudos em modelo animal, ficou bem estabelecido que o gene híbrido BCR-ABL funciona como um oncogene leucêmico. Este oncogene funciona como um ativador natural da proteína tirosina quinase. Esta proteína liga-se ao ATP e transfere fosfato do ATP para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Essas proteínas, agora fosforiladas, tornam-se responsáveis por toda uma série de etapas que levam aos defeitos fisiopatológicos observados na LMC. Por essa razão, se a ligação do ATP com essa tirosina for bloqueada, toda a série de etapas envolvidas também será bloqueada (Figura 3). Esse mecanismo foi essencial para o desenvolvimento de uma terapia efetiva e seletiva para a LMC (DRUKER *et al.*, 2000; FARDEL *et al.*, 2000). Em 1988, YAISH & COLABORADORES publicaram uma série de componentes conhecidos como tyrfostinas, as quais demonstraram ser inibidores específicos da tirosina quinase. Com base nessas premissas, em 1993, BRIAN J. DRUKER & COLABORADORES testaram vários inibidores da tirosina quinase sintetizados por um grupo de farmacêuticos da Novartis Pharmaceuticals (CAPDEVILLE *et al.*, 2003). A partir destes testes, o mesilato de imatinibe surgiu como o melhor composto capaz de eliminar de forma específica as células da LMC (GOLDMAN, 2000). Basicamente, o imatinibe funciona como um inibidor competitivo do ATP, pois ele se liga nos sítios de fosforilação do BCR-ABL, bloqueando a atividade tirosina quinase (SAVAGE & ANTMAN, 2002).

O mesilato de imatinibe é um inibidor da tirosina quinase capaz de inibir a proliferação das células de diferentes linhagens da LMC e das células progenitoras hematopoiéticas. Essa droga, liberada para uso clínico desde 1998, é administrada por via oral, com doses terapêuticas entre 300 e 800 mg/dia, com boa tolerância e poucos efeitos colaterais. Tem mostrado boa eficácia em todas as fases da doença, particularmente nos pacientes com diagnóstico recente de LMC em fase crônica.

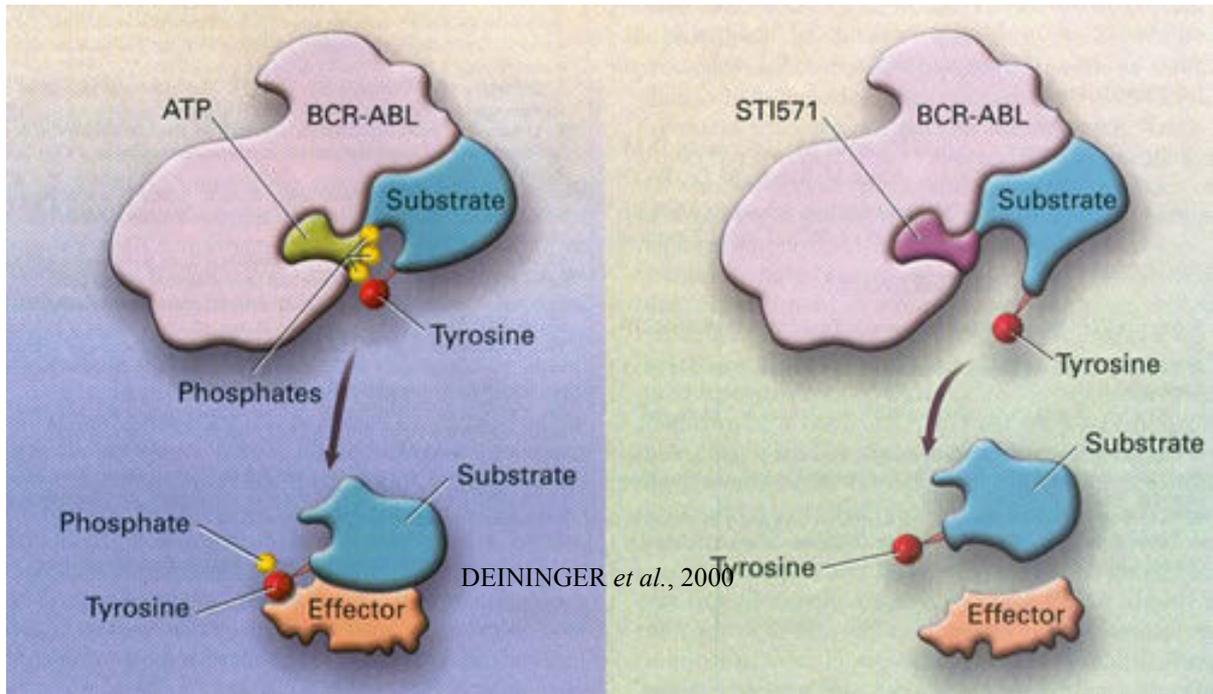


Figura 3: Mecanismo de ação do BCR-ABL e a sua inibição pelo imatinibe, através do bloqueio no sítio de fosforilação da tirosina quinase BCR-ABL

3.5.6.1 Farmacodinâmica

Em ensaios laboratoriais, a proliferação de células que expressavam o BCR-ABL foi inibida pelo imatinibe *in vitro*. A concentração do imatinibe requerida para inibir a fosforilação da tirosina celular a 50% (IC_{50}) foi de $0,25\mu\text{M}$ em linhagens celulares que expressavam BCR-ABL. A inibição foi progressiva e dose dependente. A incubação com imatinibe na concentração de $1\mu\text{M}$ resultou em uma diminuição de 92% a 98% no número de colônias positivas formadas em amostras de sangue periférico ou medula óssea de culturas de pacientes com LMC. Esta droga inibe a proliferação de células leucêmicas que expressam ambas as proteínas p210 e p190, mas tem mínima atividade na proliferação de células BCR-ABL negativas. O imatinibe inibe três tirosinas quinases: ABL, c-kit e o receptor do fator de crescimento plaquetário (PDGF). Todas as formas conhecidas do oncogene ABL (BCR-ABL, TEL-ABL e v-ABL) também são inibidas pela droga (LYSENG-WILLIAMSON & JARVIS, 2001).

3.5.6.2 Farmacocinética

A absorção do imatinibe é rápida, com concentração plasmática máxima atingida em 2 a 4 horas, e biodisponibilização de 98% na fórmula capsular. A meia-vida é de aproximadamente 18 horas. A maior enzima responsável pelo metabolismo do imatinibe é o citocromo P450 (CYP3A4), ainda que outras isoenzimas (CYP102, CYP2D6, CYP2C9 e CYP2C19) desempenhem um papel menor. Ao fim de sete dias, 81% da dose marcada é eliminada nas fezes (68%) e na urina (13%). A concentração plasmática do imatinibe pode ser alterada quando a droga é administrada com inibidores ou indutores da atividade da CYP3A4. Quando o imatinibe é administrado com drogas que inibem a CYP3A4 (cetoconazol, itraconazole, eritromicina, claritromicina), o metabolismo pode ser diminuído. Drogas que induzem a atividade da CYP3A4 (dexametasona, fenitoína, carbamazepina, rifampicina, fenobarbital) podem aumentar o metabolismo do imatinibe. Substratos da CYP3A4 (sinvastatina, ciclosporina) podem ter suas concentrações plasmáticas aumentadas pelo imatinibe (LYSENG-WILLIAMSON & JARVIS, 2001).

3.5.6.3 Desenvolvimento do modelo clínico

Os testes clínicos de fase I começaram em 1998, e o grupo escolhido para o tratamento com o imatinibe incluía pacientes com LMC na fase crônica que eram refratários ou intolerantes ao IFN- α . Em seguida, o estudo foi expandido para pacientes em crise blástica. Os pacientes foram tratados com imatinibe em doses que variavam entre 25 mg até 1.000 mg diariamente. E foi com a dose de 300mg/dia ou mais que se observou resposta clínica. Entre os pacientes de fase crônica que haviam falhado com IFN- α , 53 de 54 (98%) atingiam a RHC. Em pacientes com crise blástica mielóide, 21 de 38 (55%) apresentaram resposta clínica. Um modelo matemático foi aplicado, relacionando dose e resposta hematológica, até se chegar na dose ideal de 400 mg/dia ou mais. Com base nestes resultados, a dose diária de 400 mg ou mais foi recomendada para estes pacientes em fase crônica (DRUKER, 2001).

Como os resultados da fase I foram excepcionais, rapidamente iniciaram-se estudos de fase II em seis países. Três grandes estudos foram realizados com 532 pacientes em fase crônica tardia que não responderam ao tratamento com IFN- α , 235 pacientes da fase acelerada e 260 pacientes em crise blástica mielóide. Entre os pacientes da fase crônica que

falharam com a terapia com IFN- α , 95% atingiram RHC e 60% tiveram resposta citogenética, definida como na porcentagem de células Ph¹ positivas para menos do que 35%. As análises mostraram que na medida em que se alcançava remissão hematológica e/ou citogenética, aumentava a sobrevida global e sobrevida livre de progressão. No estudo de fase crônica, no qual a mediana de tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento com imatinibe foi de 32 meses, a estimativa de sobrevida livre de progressão em 18 meses foi de 89,2%. Apenas 13% dos pacientes em fase crônica recidivaram. Os resultados de fase II na fase acelerada foram bem promissores. Entre os 235 pacientes, 34% apresentaram RHC, 24% atingiram RCM, com 17% de RCC. O tratamento com imatinibe também se mostrou promissor em pacientes que evoluíram para crise blástica. Dos 260 pacientes acompanhados, 52% apresentaram resposta hematológica e 31% sustentaram esta resposta por 4 semanas. Resposta citogenética maior foi observada em 16% e RCC em 7%. Aos 18 meses, 20% dos pacientes que se encontravam na crise blástica estavam vivos. Os efeitos colaterais foram facilmente manejados e poucos efeitos adversos graves ocorreram, tais como retenção hídrica e toxicidade hepática (OTTMANN *et al.*, 2002).

Com esses dados de alta resposta e baixa toxicidade, em 10 de março de 2001, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou a terapia com imatinibe em pacientes com LMC em todos os estágios (DEININGER, 2003).

Quase que concomitante ao estudo de acesso expandido, o imatinibe foi aprovado como tratamento de primeira linha para todos os pacientes com LMC. A partir de então, foi iniciado o estudo IRIS (International Randomized IFN vs STI571), um ensaio clínico randomizado comparando o IFN- α + Citarabina ao imatinibe, com 1.106 pacientes com LMC na fase crônica, recém diagnosticados. Não houve diferença significativa nos fatores de prognóstico pré-tratamento nos dois braços. Com uma mediana de seguimento de 19 meses, os pacientes que foram randomizados para o imatinibe tiveram resultados significativamente melhores do que os tratados com IFN- α + Citarabina em todos os parâmetros utilizados, incluindo taxas de RHC (97% v 56%, $P < 0.001$), RCM e RCC (85% e 75% v 22% e 8%, $P < 0.001$). Com imatinibe, mais de 50% dos pacientes obtiveram RCC em 3 meses (DRUKER, 2003). A partir deste estudo, todos os pacientes que obtiveram a RCC e não a resposta molecular foram submetidos à técnica real time PCR para BCR-ABL. A proporção de pacientes que tiveram uma redução significativa de mais de três logaritmos ao final de três meses foi muito superior no grupo do imatinibe do que no grupo do IFN- α + Citarabina.

Conseqüentemente, o primeiro grupo teve um risco de progressão desprezível (HUGHES *et al.*, 2003).

Após estes resultados promissores, o grupo do M.D. Anderson, resolveu investigar o papel do aumento de dose de imatinibe na resposta hematológica e citogenética. Foram incluídos neste estudo 36 pacientes com LMC em fase crônica que falharam anteriormente ao tratamento com IFN- α . Todos receberam 800 mg/dia de imatinibe. Em 95% dos pacientes observou-se RCM, sendo que 89% atingiram a RCC. A resposta molecular dói atingida em 41% dos pacientes. Além disso, não houve aumento da toxicidade (CORTES *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados fantásticos do tratamento da LMC com imatinibe, 10% dos pacientes se tornam resistentes ao tratamento. Uma das mais úteis categorizações dos mecanismos de recaída tem sido separar os pacientes em duas categorias, aqueles com inibição persistente da quinase BCR-ABL e aqueles com reativação persistente da quinase BCR-ABL na recaída. Pacientes com inibição persistente são mais propensos a adquirirem anormalidades moleculares adicionais além do BCR-ABL. Por outro lado, pacientes com atividade persistente da BCR-ABL são mais propensos a mecanismos de insensibilidade ao imatinibe. A primeira categoria está ligada a mecanismos de efluxo da droga e a segunda com mutações no BCR-ABL, que fazem com que esta proteína se torne não responsiva ao imatinibe. Métodos que examinam a proteína fosforilada têm mostrado que a maioria dos pacientes que respondem ao imatinibe e depois recaem têm reativação da tirosina quinase BCR-ABL (MELLO, 2002). Nestes estudos, mais de 50% dos pacientes que recaem apresentam mutações pontuais (point mutations) em pelo menos 13 aminoácidos diferentes no sítio de domínio da ABL. Já em pacientes com resistência primária, ou seja, pacientes que não respondem desde o início da terapêutica com imatinibe, o mais provável é que tenham anormalidades independentes ao BCR-ABL (GORRE *et al.*, 2001; TIPPING *et al.*, 2001; DRUKER, 2003; ROTHEBERG, 2003; MOHAMED *et al.*, 2003, GOLDMAN, 2004). Estudos experimentais têm sugerido que o imatinibe como droga única pode não ser suficiente para erradicar todo o clone Ph positivo. Portanto, novas estratégias terapêuticas têm sido investigadas, tais como aumento da dose de imatinibe ou a adição de outra droga, como o Ara-C (GARDEMBAS *et al.*, 2003).

No início de 2000, um estudo denominado Programa de Acesso Expandido foi desenvolvido. Participaram deste estudo, 115 centros distribuídos em 38 países, onde o Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HM-FMUSP) fez parte. Este programa teve como principais objetivos:

- 1) definir melhor o papel do imatinibe no tratamento da LMC, avaliando-se a eficácia por meio da análise do cariótipo e a segurança, através de uma rigorosa coleta de dados de efeitos adversos;
- 2) proporcionar um maior acesso a pacientes sem alternativas de tratamento;
- 3) explorar o papel da atividade do c-kit e do PDGFR em outras doenças.

Em maio de 2002, o estudo de acesso expandido foi encerrado e o imatinibe foi registrado no Brasil (Glivec[®]) como tratamento de segunda linha da fase crônica e de primeira linha das fases de transformação ou blástica. A partir desta data, ele passou a ser custeado pela Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina.

4 - METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA

Esta dissertação é resultado do projeto “Efeito do mesilato de imatinibe (STI571) sobre o microambiente hematopoiético em portadores de leucemia mielóide crônica“, que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina, tendo sido aprovado em 03 de março de 2006, sob o número 015/CEP/2005; e ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, aprovado em 29 de agosto de 2005, sob o número 264/04.

Esta pesquisa foi realizada através:

- De uma coleta de dados de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, diagnosticados em fase crônica e atendidos no Complexo Oncológico Alfredo Daura Jorge, pertencente ao Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina (CEPON/SC);
- Em conjunto com procedimentos experimentais aplicados em amostras de medula óssea destes pacientes, que foram utilizadas tanto para o diagnóstico definitivo, quanto para o acompanhamento da resposta terapêutica. Estas amostras encontravam-se arquivadas no Laboratório de Anatomia Patológica do CEPON.

Como foi um estudo retrospectivo, não houve a necessidade de agendamento ou coleta de material extra dos pacientes.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes de ambos os sexos, portadores de leucemia mielóide crônica em fase crônica, cromossomo Ph¹ positivos, que são (ou que foram) tratados com mesilato de imatinibe.

Os critérios utilizados para definir a fase crônica da doença foram:

- Ter menos do que 10% de blastos em sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO)
- Ter menos do que 20% de basófilos em SP ou MO
- Ter menos do que 30% de blastos e promielócitos em SP ou MO
- Ter contagem plaquetária de pelo menos 100.000/mm³
- Estar sem tratamento com HY há pelo menos 7 dias
- Estar sem tratamento com IFN- α ou Ara-C há pelo menos 14 dias

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os itens considerados no estudo, relacionados às características da amostra foram: sexo, idade, achados laboratoriais do primeiro hemograma, presença de esplenomegalia no primeiro exame físico, assim como tratamento prévio.

Para avaliação da eficácia do tratamento com o imatinibe foram utilizadas como parâmetros as taxas de resposta hematológica, assim como a sua manutenção (Tabela 4), taxas de resposta citogenética (Tabela 5), curva de sobrevida livre de progressão (Tabela 6), curva de sobrevida global, observados no período de 24 meses após o início do tratamento com o fármaco.

Tabela 4: Critérios para classificação da resposta hematológica completa (BRASIL, 2001).

Resposta Hematológica Completa
Contagem normal de leucócitos: < 10.000/UI
Contagem normal de plaquetas: < 450.000/UI
Diferencial normal: ausência de formas imaturas

Tabela 5: Critérios para classificação da resposta citogenética (BRASIL, 2001)

Resposta Citogenética
Resposta Citogenética Maior: Resposta citogenética completa: 0% de células Ph ¹ positivas Resposta citogenética parcial: 1% a < 35% de células Ph ¹ positivas
Resposta Citogenética Menor: 35% a 90% de células Ph ¹ positivas
Ausência de Resposta Citogenética: > 90% de células Ph ¹ positivas

No presente estudo, considerou-se como Resposta Citogenética satisfatória aqueles pacientes que alcançaram Resposta Citogenética Maior, ou seja, aqueles que apresentaram menos de 35% de células cromossomo Ph¹ positivas. Assim, os pacientes que apresentaram no exame citogenético mais de 35% de células cromossomo Ph¹ positivas não obtiveram uma resposta satisfatória.

Tabela 6: Critérios para construção da curva de sobrevida livre de progressão (KANTARJIAN *et al.*, 2002; O'DWYER *et al.*, 2004)

Curva de Sobrevida Livre de Progressão
<p>Data do início do tratamento com imatinibe até um dos seguintes eventos:</p> <p style="padding-left: 40px;">Data da perda da RHC (dois hemogramas com intervalo de 1 mês) ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data da suspensão do tratamento (para aqueles que não apresentaram RHC, ou seja, eram resistentes primários) ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data do desenvolvimento de fase acelerada definido em critérios de inclusão ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data do desenvolvimento de crise blástica definido em critérios de inclusão ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data da perda da resposta citogenética ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data da suspensão do tratamento por efeito não satisfatório do imatinibe (toxicidade) ou</p> <p style="padding-left: 40px;">Data do óbito por qualquer causa durante o tratamento</p>

As biópsias de medula óssea, obtidas no diagnóstico e após o tratamento com o fármaco, foram avaliadas quanto à celularidade, à distribuição da série megacariocítica, ao grau de fibrose e ao grau de vascularização, sendo que estes dois últimos itens foram correlacionados com a resposta citogenética. Uma correlação também foi feita entre o grau de fibrose e o setor megacariocítico das amostras.

4.3.1 Levantamento dos pacientes

Primeiramente, foi realizado o levantamento de todos os pacientes (cadastrados no Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina – CEPON/SC) que se enquadravam dentro do perfil traçado para a realização do estudo, ou seja, indivíduos portadores de LMC em fase crônica, tratados com mesilato de imatinibe. Esse levantamento foi feito através da aquisição da lista de todos os pacientes que retiravam mensalmente o medicamento da farmácia do CEPON. Como o imatinibe também é utilizado no tratamento de pacientes portadores de tumor gastrointestinal c-kit positivos (GIST), foi tomado o devido cuidado de separar os dois grupos.

Através da relação, que continham 67 pacientes, foi resgatado no setor de arquivo o número dos respectivos prontuários para a posterior análise dos mesmos.

4.3.2 Pesquisa nos prontuários

Os prontuários dos 67 pacientes foram cuidadosamente estudados. Foram considerados para o estudo, pacientes que continham em seu prontuário ao menos dois laudos anatomo-patológicos de medula óssea, sendo um do diagnóstico e o outro após determinado tempo de tratamento com o fármaco.

Como muitos pacientes da lista não realizaram duas biópsias com o decorrer do tratamento, um número considerável foi excluído da pesquisa. A não realização de uma segunda biópsia se deve principalmente ao fato de ser um procedimento considerado invasivo para o paciente. Dessa forma, a partir do início de 2006 o acompanhamento passou a ser realizado apenas com hemograma, mielograma e análise citogenética. Outro fator que prejudicou a amostragem foi o extravio de laudos dos pacientes, assim como a proveniência de alguns pacientes externos, com laudos de laboratórios de outras cidades e/ou estados.

Foi observado também, que um grupo de 15 pacientes tinha em seus prontuários, laudos de duas ou mais coletas de medula óssea. No entanto, a segunda não foi realizada após o tratamento com imatinibe, apenas após o uso de IFN- α . Por isso, estes também tiveram que ser descartados da amostragem.

Após analisar rigorosamente todos os critérios, 22 pacientes preenchiam todos os requisitos necessários para o estudo completo.

4.3.3 Levantamento das amostras

Após o levantamento dos dados dos pacientes selecionados para o estudo, foi realizada a busca das amostras que se encontravam arquivadas no Laboratório de Patologia do CEPON. Estas amostras encontram-se incluídas em parafina, que conserva o material biológico indefinidamente. A procura dos blocos de parafina foi facilitada pelo fato do material se encontrar devidamente arquivado em ordem numérica.

4.3.4 Procedimentos técnicos

4.3.4.1 Inclusão em parafina (MICHALANY, 1980)

Como algumas das amostras analisadas destes pacientes foram recebidas durante o período do estudo, tornou-se necessário o entendimento do processo de inclusão do material. Os cortes de peças incluídas em parafina são os mais usados em técnica histológica. Por ser uma substância quimicamente inativa, conserva-se indefinidamente. A parafina usada em histologia é um corpo sólido cuja temperatura de fusão varia entre 56° e 58°C, tornando-se um líquido incolor nessas temperaturas. À medida que a parafina fundida se resfria, ela vai se solidificando, fenômeno caracterizado por sua cristalização.

No entanto, antes das peças serem incluídas em parafina, elas precisam ser preparadas. E no caso da medula óssea, a primeira operação consiste na descalcificação. As amostras recebidas em formol a 10% foram primeiramente retiradas do líquido fixador e imersas em uma solução pré-preparada de descalcificador à base de EDTA e ácido clorídrico durante duas horas. Após esse processo, elas foram macroscopicamente analisadas, medindo seu tamanho e avaliando seu aspecto e coloração. Em seguida, as amostras foram colocadas em cápsulas de plástico resistentes aos solventes orgânicos e imersas em álcool etílico absoluto por duas horas, para sua desidratação. A desidratação é uma das etapas mais importantes da inclusão na parafina. Um tecido mal desidratado não permite a penetração suficiente de parafina, prejudicando a execução de bons cortes e de boas colorações.

As cápsulas contendo as amostras e devidamente numeradas, foram posteriormente colocadas no aparelho processador de tecidos (histotécnico), que é composto por uma bateria de oito cubas de álcool etílico absoluto, três de xilol e duas de parafina líquida. O aparelho é diariamente programado para que as amostras fiquem imersas em cada uma dessas cubas durante uma hora. Assim, esse procedimento leva mais da metade de um dia. Por isso, o padrão é colocar as amostras no equipamento sempre no final do dia, para que sejam retiradas no início da manhã do dia seguinte.

No dia seguinte, após o processamento das amostras no aparelho, as mesmas foram incluídas em parafina. A inclusão é normalmente realizada com auxílio de moldes de metal, próprios para isso. As cápsulas foram abertas e, com o auxílio de uma pinça, as biópsias foram colocadas nos moldes. A parafina líquida foi cuidadosamente despejada sobre as peças e as cápsulas, com o devido registro numérico dos casos, foram rapidamente sobrepostas. Para

a solidificação da parafina, os moldes foram colocados sobre a bancada de mármore. Após o endurecimento da parafina, os moldes foram acomodados em uma superfície de gelo, que auxilia o desacoplamento dos mesmos. Em seguida, após a separação dos blocos de parafina de seus respectivos moldes, os mesmos ficaram prontos para serem cortados.

4.3.4.2 Cortes Histológicos (MICHALANY,1980)

Para que a análise ao microscópio pudesse ser realizada foi necessário que as biópsias fossem reduzidas a porções muito delgadas, denominadas cortes histológicos. Os cortes foram obtidos por meio de um aparelho chamado micrótomo, munido de navalha com gumes extremamente afiados. A primeira etapa para realização dos cortes é o encaixe do bloco de parafina no suporte próprio, com a peça virada para onde se encontra a navalha. Dessa forma, após o bloco ter sido devidamente encaixado, a navalha foi presa no micrótomo de tal forma que ela chegasse no bloco num ângulo de 90°. Como nos micrótomos de parafina é o bloco com a peça que vai de encontro à faca, o carro porta-objeto possui dois movimentos: um vertical de cortar (ascendente e descendente) e outro horizontal de avançar, sendo que estes dois movimentos são conjugados. Como a face da peça a ser cortada geralmente possui uma camada de parafina, convém desbastá-la até que a superfície da peça fique exposta. Assim, o micrótomo foi programado anteriormente para realizar cortes de 20 µm até a exposição da peça. Posteriormente, a navalha foi trocada para se obter os cortes para as colorações. Após a verificação do ângulo de inclinação da navalha e o ajuste do bloco, a espessura do corte foi selecionada. Quanto mais finos os cortes de parafina, mais perfeitas são as colorações. A espessura dos cortes destinados para as colorações de Hematoxilina & Eosina e de Reticulina foi de 3 µm, enquanto que os cortes destinados para a reação imuno-histoquímica foi de 5 µm.

Quando se iniciou a execução dos cortes, verificou-se que eles vão se colando uns aos outros de tal modo a formar uma fita. À medida que essa fita se alongava, com a ajuda de uma pinça ela era estendida e transportada para uma cuba contendo água destilada para ser colada na lâmina por capilaridade. Os cortes foram então colados no centro da lâmina, com certa distância das margens laterais. Posteriormente, a mesma foi submersa em uma cuba elétrica contendo água a uma temperatura média de 40°C com a finalidade de estender e fixar melhor os cortes na lâmina. As lâminas destinadas para realização da reação imuno-histoquímica são diferenciadas das lâminas usadas nas colorações. Elas devem ser silanadas, ou seja, cobertas

por uma camada à base de silano que proporciona maior aderência e fornecendo maior resistência do corte às diversas etapas da reação, principalmente à etapa de reativação antigênica, na qual as lâminas ficam submersas por 30 minutos em um banho de aproximadamente 90°C a 95°C. Por isso, no momento do corte foi necessário já ter o cuidado de separar devidamente as lâminas. Posteriormente, as mesmas foram identificadas com seu número de registro interno, distribuídas verticalmente em um suporte de madeira e colocadas em uma estufa a 60°C para sua secagem e desparafinização. Após 30 minutos na estufa, as lâminas já estão prontas para serem coradas.

4.3.4.3 Colorações

É a operação que submete os tecidos à ação de substâncias capazes de tingir seus constituintes. Os corantes são geralmente empregados em soluções aquosas e mais raramente em soluções alcoólicas. Por este motivo, os cortes devem estar sempre hidratados. Para os cortes de parafina, é indispensável eliminar essa substância dos cortes e substituí-la pela água. Assim, para que o corte entre em contato com a solução de corante, é preciso realizar a desparafinização. Para isso, procede-se primeiro à eliminação da parafina dos cortes pelo xilol. Em seguida, à alcoolização pelo álcool etílico absoluto, destinada a eliminar o solvente e, finalmente, à hidratação, operação que substitui o álcool pela água. Esta etapa inicial é comum às duas colorações usadas nesse estudo, que se encontram descritas abaixo:

4.3.4.3.1 Hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1980)

Esta técnica foi utilizada com o intuito de se avaliar a celularidade das amostras dos pacientes. E como entre os objetivos do trabalho foi realizar uma avaliação da linhagem megacariocítica correlacionada com a presença/ausência de esplenomegalia ao exame físico, justifica-se novamente a necessidade de proceder esta coloração.

É a mais antiga coloração combinada e a mais difundida em todos os laboratórios de anatomia patológica. A hematoxilina, por si mesma, não age como corante, mas sim o seu produto de oxidação, a hemateína. A oxidação natural produz-se pela oxidação à luz e ao ar, e a oxidação química pela ação do iodato de potássio e o óxido de mercúrio. Por sua vez, para corar o tecido, a hemateína necessita de mordente (sais de alumínio, ferro e tungstênio) prévio ou incorporado na própria solução de hematoxilina.

Os reagentes necessários para preparar uma solução de Hematoxilina de Harris são: hematoxilina (0,5 g), álcool etílico absoluto (5,0 mL), alúmen de potássio (10,0 g), óxido vermelho de mercúrio (0,25 g) e água destilada (100,0 mL). Para seu preparo é necessário primeiramente dissolver a hematoxilina no álcool e o alúmen a quente na água. Posteriormente, misturar as duas soluções e levar a mistura à ebulição o mais breve possível. Após remover do fogo, acrescentar o óxido de mercúrio. Em seguida, aquecer novamente a solução até ficar de cor escura, durante 1 minuto. E finalmente, remover do fogo o recipiente e deixá-lo esfriar rapidamente em água fria ou na geladeira. A solução, após resfriada, encontra-se pronta para o uso.

Os reagentes necessários para preparar uma solução de Eosina Amarela são: eosina amarela hidrossolúvel (0,5 g), água destilada (10,0 mL), álcool 95° (90,0 mL) e ácido acético (1 gota). O seu preparo requer apenas dissolução da eosina em água destilada e, em seguida, o acréscimo do álcool. A adição do ácido acético aumenta a intensidade da coloração, mas diminui a durabilidade do corante.

O diferenciador usado nessa coloração é à base de álcool 95° (100,0 mL) e ácido clorídrico (5 gotas).

Depois do preparo prévio dos reagentes, as lâminas foram coradas. Após os processos de desparafinização, alcoolização e hidratação, explicados anteriormente, as lâminas foram submersas na solução de hematoxilina durante 2 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente durante 1 minuto, depois rapidamente submersas no diferenciador (2 banhos) e colocadas novamente na água corrente por 3 minutos. Finalmente, as lâminas foram submersas na solução de eosina durante 2 minutos e, a seguir, transferidas para a bateria de álcool e xilol, para serem então montadas.

4.3.4.3.2 Coloração de Gomori (MICHALANY, 1980)

Esta coloração permite avaliar a rede reticular dos tecidos, através da impregnação pela prata. Fibras reticulares são fibras de colágeno tipo III, fracamente refringentes em microscopia de luz, podendo ser evidenciadas através da impregnação argêntica. Estas fibras possuem baixa afinidade pelos sais de prata, requerendo um tratamento apropriado com agente redutor para aumentar a seletividade da impregnação. Este método baseia-se na oxidação de glicoproteínas que se encontram associados às fibras com consequente formação de radicais redutores (provavelmente aldeídos), que reduzem a prata da solução de prata amoniacal. As fibras aparecem sob forma de uma delicada trama negra.

Apesar de simples, engloba uma bateria grande de reagentes, sendo eles: permanganato de potássio (0,5%), ácido oxálico (5%), alúmen de ferro (5%), cloreto de ouro (0,2%), tiosulfato de sódio (5%), formaldeído (10%) e solução de Gomori, composta por nitrato de prata (10%), hidróxido de potássio (10%) e hidróxido de amônio.

Após o preparo prévio dos reagentes, nas suas devidas proporções, as lâminas foram inicialmente desparafinadas, alcoolizadas e hidratadas para serem coradas. As lâminas foram então submersas durante 2 minutos em cada uma das soluções a seguir, intercalando-se com dois banhos em água destilada. Assim, a seqüência da coloração é a seguinte: permanganato de potássio, água destilada, ácido oxálico, água destilada, alúmen de ferro, água destilada, solução de Gomori e água destilada. A seguir, as lâminas foram rapidamente imersas no formol e deixadas durante 2 minutos na água corrente. Depois elas foram submersas no cloreto de ouro, na água destilada e no tiosulfato de potássio, sendo 3 banhos em cada uma dessas últimas soluções. E finalmente, as mesmas foram transferidas para a bateria de álcool e xilol, para serem então montadas.

4.3.4.4 Imuno-histoquímica (DABBS, 2006)

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) tem a capacidade de detectar moléculas (antígenos) teciduais, sendo de grande valor nos diagnósticos anátomo-patológicos e na investigação científica. O mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo associado a diversos tipos de processos de visualização. Portanto, trata-se de uma reação imunológica onde o anticorpo primário não conjugado liga-se ao antígeno contido na amostra. Atualmente há disponibilidade de grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos parafina, permitindo o estudo de blocos arquivados por longos períodos.

Neste estudo, a técnica foi aplicada com o objetivo de se estimar a vascularização da medula óssea dos pacientes através do uso do anticorpo anti-CD34, que tem a propriedade de marcar vasos e células progenitoras hematopoiéticas. Neste caso, o que foi levado em consideração a visualização dos vasos. Foram analisadas tanto as amostras do diagnóstico, quanto àquelas obtidas após o tratamento.

O procedimento foi então realizado em cortes de medula óssea aderidos em lâminas silanadas. As lâminas foram inicialmente desparafinadas, alcoolizadas e hidratadas, da mesma forma que nas duas colorações anteriores. Posteriormente, as lâminas foram imersas durante

20 minutos, em um frasco envolvido por papel alumínio e contendo 3,0 mL de peróxido de hidrogênio e 200,0 mL de álcool metílico, solução que proporciona o bloqueio da peroxidase endógena. Após a lavagem das lâminas em três banhos de tampão PBS (pH = 7,2), as mesmas foram imersas em uma solução pré-preparada de reativação antigênica a temperatura de aproximadamente 95° C, durante 40 minutos. Depois deste período, as lâminas foram retiradas do banho-maria para esfriarem em temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após o seu resfriamento, as lâminas foram lavadas novamente em três banhos de tampão PBS. A seguir, os cortes foram demarcados com uma caneta hidrofóbica específica para delimitação da área de incubação dos anticorpos. O anticorpo anti-CD34 foi diluído na proporção 1:200, utilizando-se um líquido diluidor específico. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo previamente diluído, armazenadas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8° C e deixadas “over night”. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em três banhos de tampão PBS e logo incubadas em câmara úmida com o anticorpo secundário, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as mesmas foram lavadas em dois banhos de tampão PBS e incubadas em câmara úmida com o complexo peroxidase-streptavidina, igualmente durante 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em dois banhos de tampão PBS de 5 minutos cada. Enquanto isso, a solução de cromógeno denominado diaminobenzidina (DAB) foi preparada diluindo-se o numa proporção de 1 gota para cada mililitro de diluente. Após seu preparo, as lâminas foram dispostas em uma superfície plana e branca para que o cromógeno pudesse ser gotejado sobre elas. As lâminas foram retiradas da superfície à medida que foi se observando a formação de um precipitado acastanhado, promovido pelo cromógeno. Após a observação desse precipitado, as lâminas foram sendo colocadas, uma a uma, em um frasco contendo água destilada, para serem posteriormente contra-coradas. Assim, as lâminas foram submersas na solução de hematoxilina durante 2 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente durante o mesmo período. A seguir, elas foram rapidamente submersas na solução diferenciadora e logo deixadas na água corrente novamente. E finalmente, foram transferidas para a bateria de álcool e xilol, para serem então montadas.

A análise da vascularização foi realizada inicialmente pela visualização das lâminas em um aumento de 100x no microscópio óptico, através da qual foi possível selecionar os 3 pontos com maior número de vasos (“hot spots”). As lâminas foram então avaliadas em um aumento de 400X para que os vasos pudessem ser contados nas áreas pré-determinadas. Os vasos calibrosos ou aqueles próximos ao periósteo foram descartados da contagem. A densidade de vascularização foi então estimada pela média de vasos encontrada nos 3 pontos

selecionados de contagem. Após a obtenção da média de todas as amostras, uma classificação foi estabelecida, onde foram determinados 4 níveis de vascularização (Grau I ao Grau IV). As amostras que continham em média até 5 vasos, foram classificadas no grau I; aquelas que tinham entre 6 e 10 vasos, no grau II; as que continham em média entre 11 e 15 vasos, foram classificadas como pertencentes ao grau III e, finalmente, as amostras que continham entre 16 e 20 vasos, foram graduadas em IV.

4.3.4.5 Montagem das lâminas (MICHALANY, 1980)

Após a finalização tanto das colorações, quanto da reação imuno-histoquímica, as lâminas estavam prontas para serem montadas. Para que as lamínulas fossem devidamente fixadas nas lâminas, uma solução específica, semelhante a uma resina, e própria para esta finalidade foi utilizada, sendo esta denominada Entellan[®]. As lâminas foram então retiradas do último xilol da bateria e dispostas em um papel branco. Sobre cada lâmina, foi depositada 1 gota de entellan e, em seguida, as lamínulas foram sobrepostas às lâminas. Com o auxílio de uma pinça, as lamínulas foram delicadamente pressionadas contra suas respectivas as lâminas, a fim de se eliminar as bolhas. O excesso de entellan das bordas foi retirado com a ajuda de uma gaze. Posteriormente, as lâminas foram distribuídas em um suporte de madeira para secarem. E finalmente, após estarem secas, as mesmas foram analisadas ao microscópio.

4.3.4.6 Aquisição das Imagens

A aquisição das imagens foi executada utilizando-se câmera digital modelo Sony Cybershot 5.1 Megapixels acoplada à lente objetiva do microscópio óptico Leica BX41 com iluminação halógena. As imagens foram captadas utilizando-se a objetiva de 10X, 20X e 40X. Os campos selecionados foram digitalizados e as imagens foram transmitidas a um computador Pentium III 750 MHz com 128 MB de memória RAM, através de um cabo com entrada USB. Para o armazenamento das imagens foram disponibilizados 2GB de memória.

4.3.4.7 Estatística

Alguns dos resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa INSTAT-2. A análise da correlação foi verificada com o teste não-paramétrico de Spearman r , onde $r > 0,8$ foi considerado como bom índice de correlação.

5- RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Entre os 22 pacientes avaliados na fase crônica, exatamente metade eram do sexo masculino e metade do sexo feminino, ou seja, a relação foi de 1:1. A mediana de idade foi de 42,36 anos, variando entre 18 e 69 anos.

Todos os pacientes, quando incluídos no estudo, já tinham seu diagnóstico definido há mais de 1 ano. E todos fizeram tratamento prévio com IFN- α , sendo que 68,18% fizeram uso desta substância por mais de 1 ano. A ausência de resposta hematológica e/ou citogenética foi o motivo pelo início do tratamento com imatinibe em 54,54% dos pacientes. Já a intolerância ao IFN- α ocorreu em 31,82% dos pacientes. Apenas 3 pacientes iniciaram o tratamento com imatinibe por outros motivos, não esclarecido nos prontuários.

O aumento do baço foi observado em menos da metade dos pacientes (45,46%). No entanto, este valor provavelmente está subestimado, pois a esplenomegalia foi analisada apenas no momento do diagnóstico, sendo ignorada a manifestação da mesma com o decorrer do tratamento.

Com relação aos achados laboratoriais do primeiro hemograma, 63,64% dos pacientes apresentaram anemia leve, com valores de hemoglobina próximos ao limite inferior de referência. A leucocitose da maioria dos pacientes (68,18%) esteve na faixa de 10.000 a 50.000/mm³, sendo que a visualização de blastos ocorreu em 63,64%. No entanto, nenhum paciente apresentou na contagem diferencial, mais de 10% de mieloblastos e promielócitos, contados conjuntamente. A plaquetose foi observada em 40,91% dos pacientes.

A tabela abaixo (Tabela 7) traz os resultados citados anteriormente, distribuindo o número de pacientes e seu percentual equivalente, de acordo com cada parâmetro avaliado.

Tabela 7: Características dos pacientes portadores de LMC em fase crônica

CARACTERÍSTICAS	VALORES
Sexo	nº de pacientes (%)
Masculino	11 (50)
Feminino	11 (50)
Idade	Anos
Mediana	42,36
Variação	18 a 69

História da Doença – Uso de INF-α	n° de pacientes (%)
Resistência hematológica/citogenética	12 (54,54)
Intolerância	7 (31,82)
Sem motivo	3 (13,64)
Tempo de tratamento com INF-α	n° de pacientes (%)
> 1 ano	15 (68,18)
< 1 ano	7 (31,82)
Esplenomegalia (no decorrer do estudo)	n° de pacientes (%)
Presença	10 (45,46)
Ausência	12 (54,54)
Tempo de doença diagnosticada (no início do tratamento com Imatinib)	n° de pacientes (%)
< 1 ano	0 (0)
> 1 ano	22 (100)
Hemoglobina (diagnóstico)	n° de pacientes (%)
< 12,0 g/dl	14 (63,64)
> 12,0 g/dl	8 (36,36)
Leucócitos (diagnóstico)	n° de pacientes (%)
< 10.000/mm ³	0 (0)
10.000-50.000/ mm ³	15 (68,18)
> 50.000/ mm ³	7 (31,82)
Plaquetas (diagnóstico)	n° de pacientes (%)
< 450.000/ mm ³	13 (59,09)
> 450.000/ mm ³	9 (40,91)
Blastos em sangue periférico (1ª consulta)	n° de pacientes (%)
Presente	14 (63,64)
Ausente	8 (36,36)

5.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA

5.2.1 Sobrevida global

Ao final do estudo, apenas 1 paciente foi a óbito. Desta forma, 95,46% dos pacientes se mantiveram vivos durante os dois anos de acompanhamento (Figura 4). O único óbito aconteceu no sétimo mês de tratamento com imatinibe. Este paciente já havia manifestado uma série de reações adversas (infecções de repetição) com o tratamento prévio, portanto se encontrava significativamente debilitado quando iniciou a terapia com o fármaco.

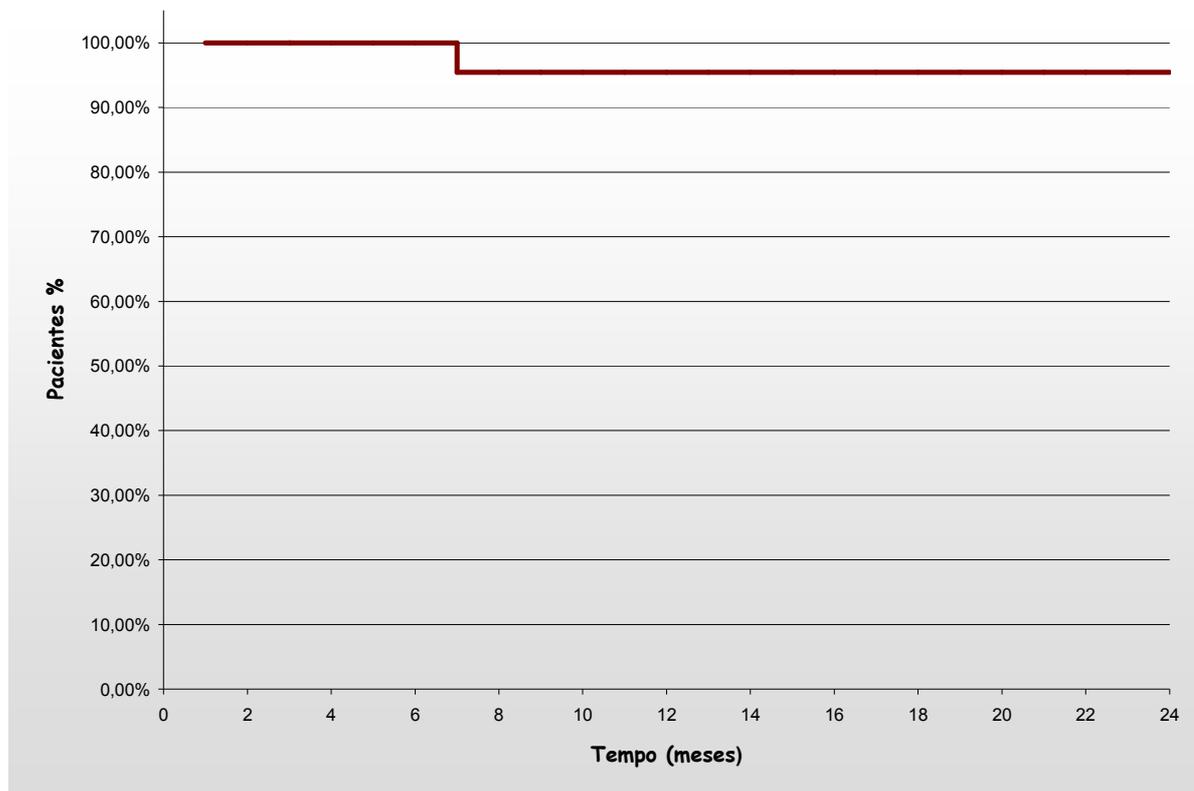


Figura 4: Sobrevida global dos pacientes com leucemia mielóide crônica a fase crônica, em 2 anos de tratamento.

5.2.2 Resposta Hematológica Completa

Entre os 22 pacientes estudados, todos apresentaram resposta hematológica completa (RHC). A mediana de tempo para atingi-la foi de 1,5 meses. A manutenção desta resposta, analisada trimestralmente no período de 24 meses após o início do tratamento, foi observada em 72,73% dos pacientes (Figura 5).

Apesar de 27,27% pacientes terem apresentado alterações importantes no hemograma (leucocitose e/ou plaquetose), a progressão para fase acelerada da doença foi observada apenas na metade deles (13,64%). Desta forma, a taxa de sobrevivência livre de progressão (SLP) em 24 meses foi de 86,36%. Entre os pacientes que progrediram para a fase acelerada, revelaram esta evolução no 2º, 3º e 7º mês de tratamento (Figura 6).

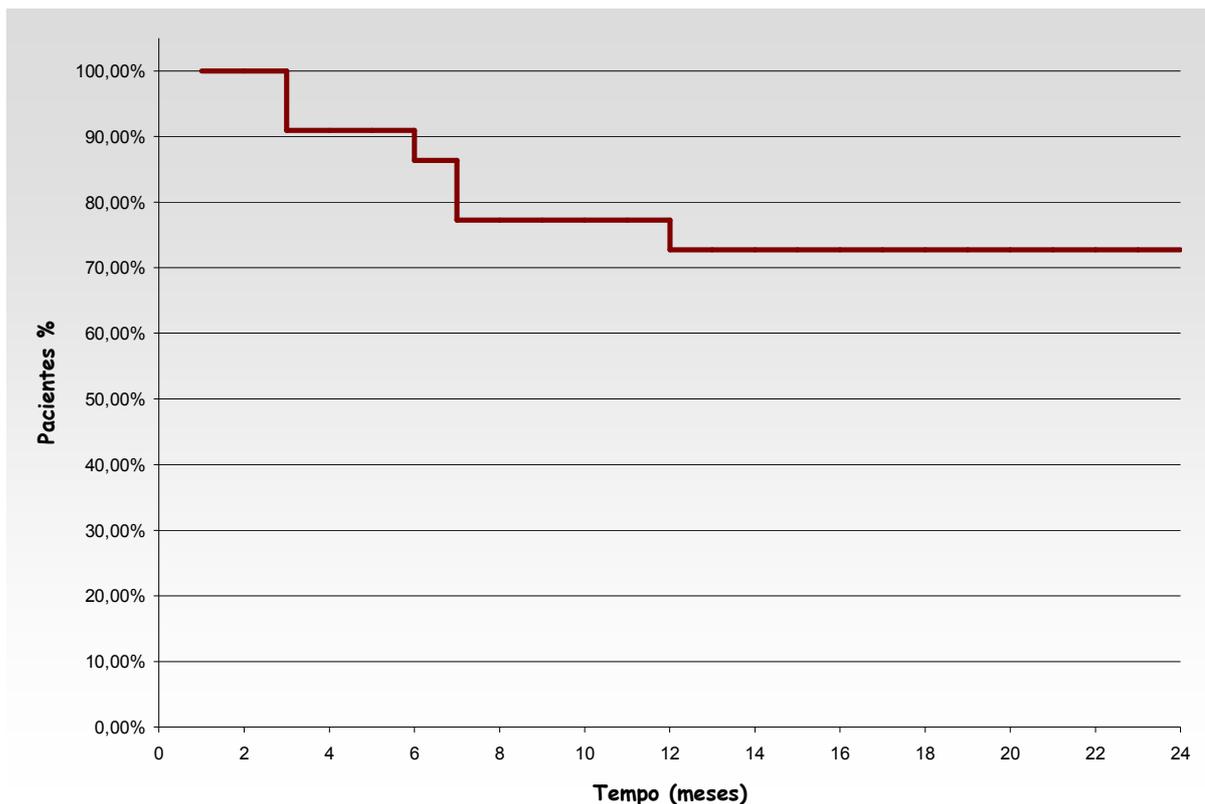


Figura 5: Manutenção da Resposta Hematológica em 24 meses de tratamento

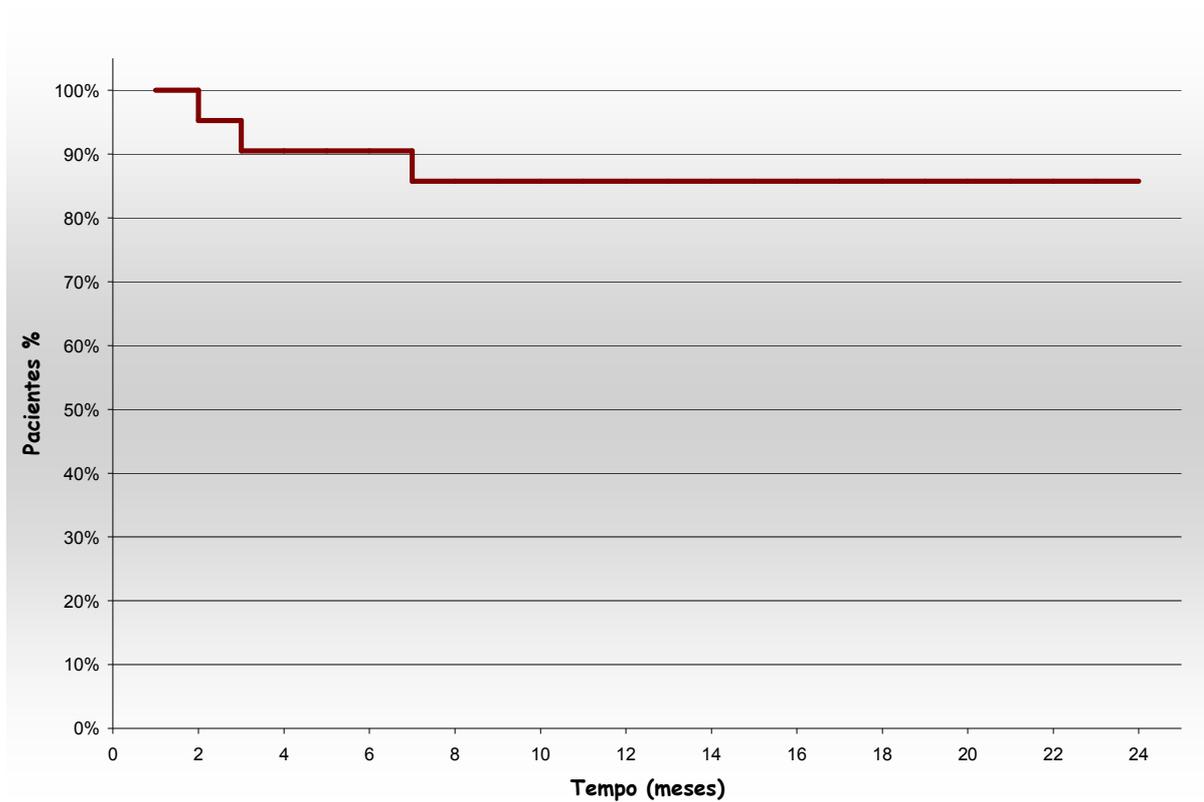


Figura 6: Sobrevida livre de progressão dos pacientes com leucemia mieloide crônica em fase crônica, em dois anos de tratamento.

5.2.3 Resposta Citogenética Maior

Dos 22 pacientes incluídos no estudo, 63,64% obtiveram resposta citogenética maior (RCM), ou seja, atingiram a resposta considerada satisfatória, em 24 meses de tratamento (Figura 7). Os pacientes refratários ao tratamento, ou seja, que mantiveram em seus exames citogenéticos a presença do cromossomo Ph¹ em mais de 35% das metáfases analisadas do aspirado medular, somaram 36,36%. A mediana de tempo para obtenção da RCM foi de 8,78 meses. Todos os pacientes que atingiram a remissão citogenética mantiveram-na até o final do estudo.

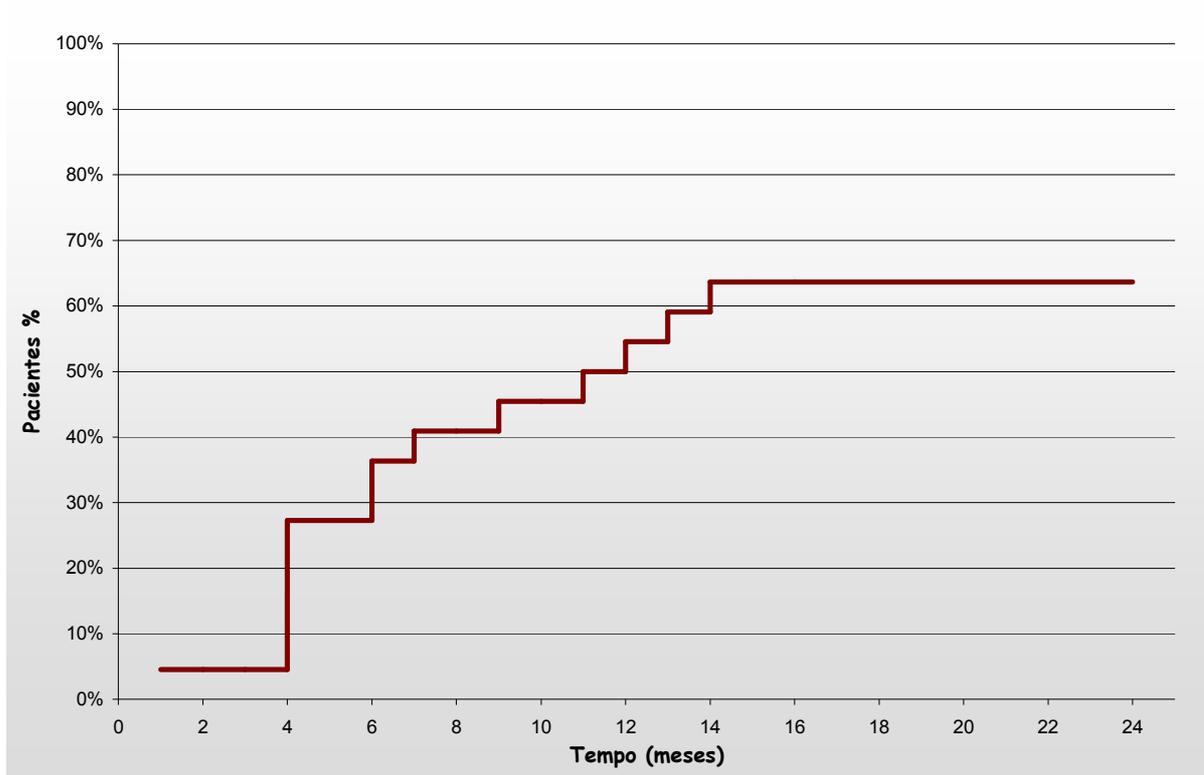


Figura 7: Tempo para obtenção da resposta citogenética maior nos pacientes com leucemia mieloide crônica, em 2 anos de acompanhamento

O acesso aos prontuários dos pacientes possibilitou a verificação da manutenção da resposta citogenética, mesmo após os dois anos de tratamento. Os pacientes que não obtiveram RCM durante o estudo, mantiveram esta resposta insatisfatória, ou seja, permaneceram refratários ao imatinibe.

E, dentre aqueles que alcançaram a RCM durante o estudo, dois deles manifestaram resistência após este período. A mesma foi observada no 32º e 51º mês de tratamento com o fármaco. Ambos foram incluídos no protocolo de estudo de outro agente inibidor de tirosina-quinase, denominado nilotinibe (AMN107).

5.3 AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA

5.3.1 Celularidade

A visualização da celularidade da medula óssea (MO) dos pacientes foi possibilitada pela coloração de H&E (elucidada na metodologia). Através dela, foi possível analisar todas as linhagens celulares constituintes do tecido hematopoiético.

Os resultados (Tabela 8) demonstram que todas as amostras se revelaram hipercelulares antes do tratamento. Entre as amostras obtidas após o tratamento, 50% se apresentaram hipocelulares e 31,82% foram normocelulares.

Tabela 8: Características das amostras de MO dos pacientes, em relação à celularidade.

Celularidade	nº de pacientes (%)	
	1ª BMO	2ª BMO
Hipocelular	0 (0)	11 (50)
Normocelular	0 (0)	7 (31,82)
Hipercelular	22 (100)	4 (18,18)

As fotos a seguir (Figuras 8-10) possibilitam a visualização de cortes histológicos de medula óssea, classificados como hipo, normo ou hiper celular.

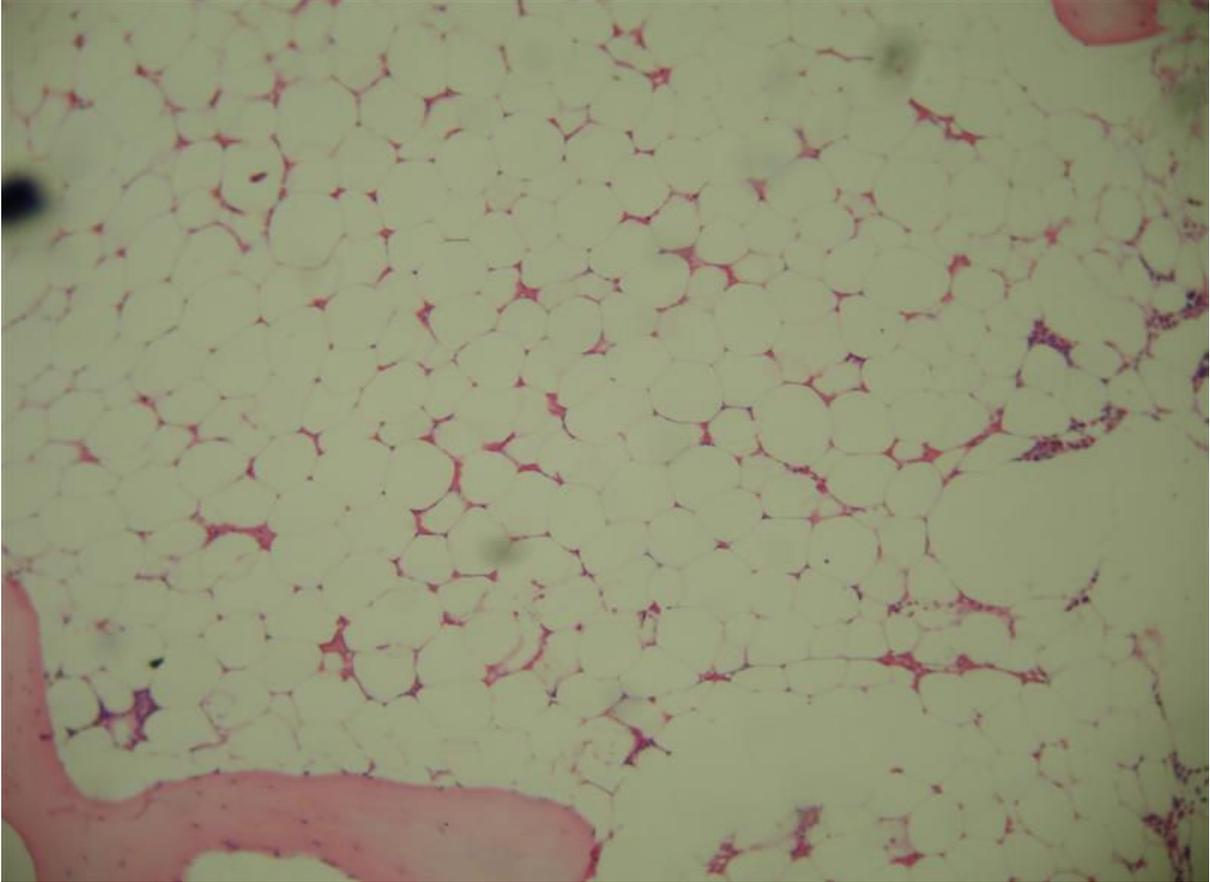


Figura 8: Corte histológico de amostra de medula óssea hipocelular - corada pelo método HE (aumento de 100X).

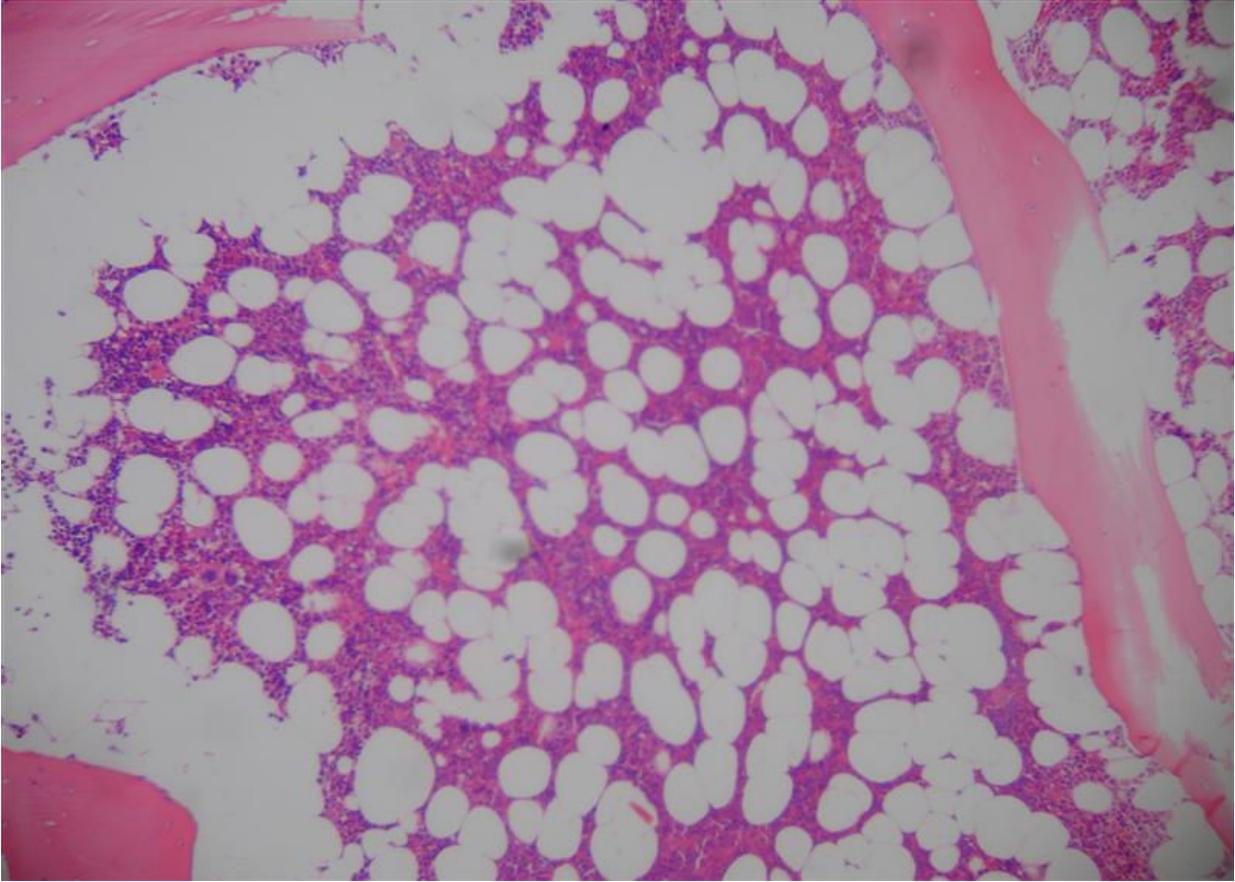


Figura 9: Corte histológico de amostra de medula óssea normocelular – corado pelo método HE (aumento de 100X).

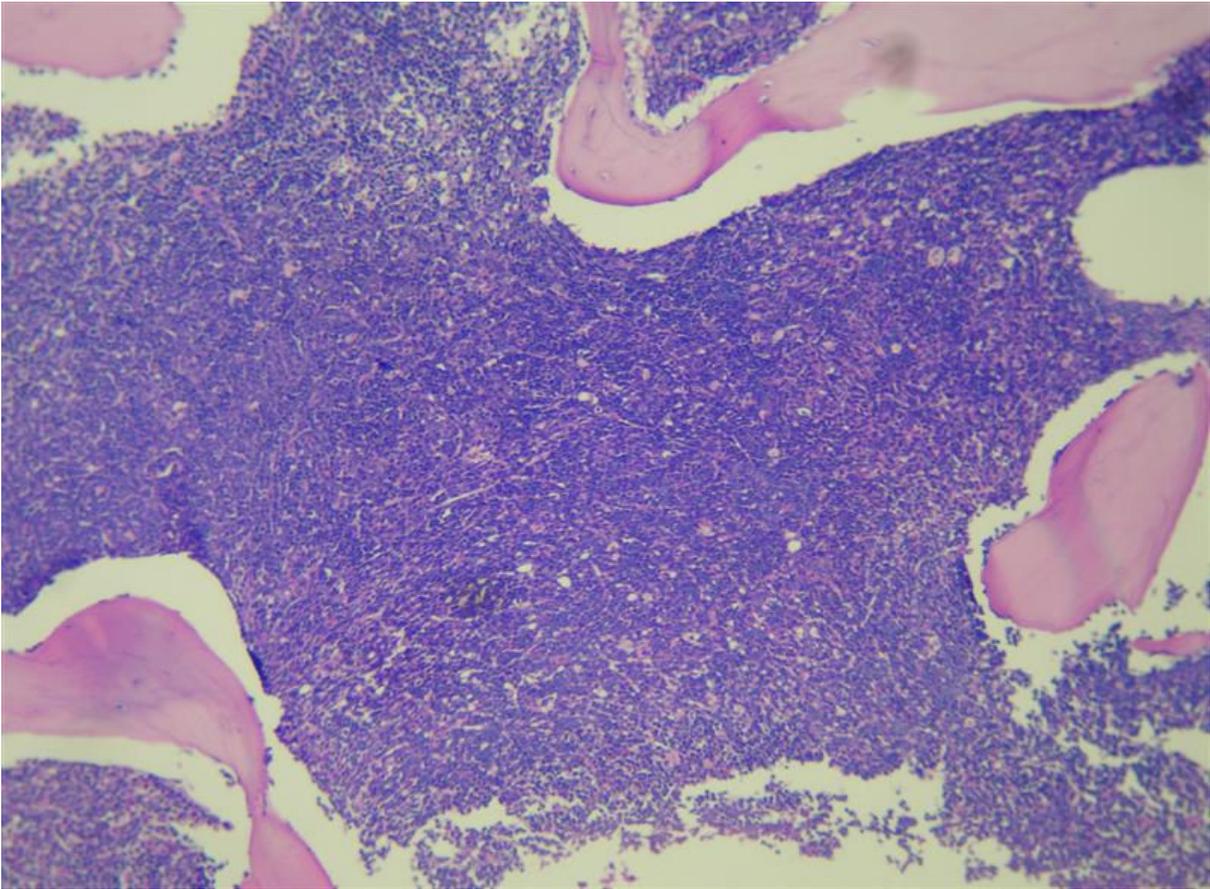


Figura 10: Corte histológico de amostra medula óssea hipercelular - corada pelo método HE (aumento de 100X).

5.3.2 Linhagem Megacariocítica

A coloração de H&E também permitiu analisar separadamente a linhagem megacariocítica das amostras. O setor megacariocítico foi classificado como hipoplásico, normoplásico ou hiperplásico. A tabela abaixo (Tabela 9) permite visualizar a classificação das amostras.

Tabela 9: Análise da série megacariocítica da 1ª BMO

Setor Megacariocítico (1ª BMO)	nº de pacientes (%)
Hipoplásico	3 (13,64)
Normoplásico	5 (22,73)
Hiperplásico	14 (63,63)

Os dados obtidos após avaliação do setor megacariocítico da 1ªBMO foram posteriormente correlacionados ao grau de fibrose da respectiva amostra.

Através da Figura 11 é possível perceber que as amostras que tiveram o grau de reticulina graduados em +3 e +4 concentram apenas biópsias com a série megacariocítica hiperplasiada. Já as amostras que foram graduadas em +1 no padrão de reticulina são as que tiveram maior concentração de biópsias com o setor megacariocítico hipoplasiado.

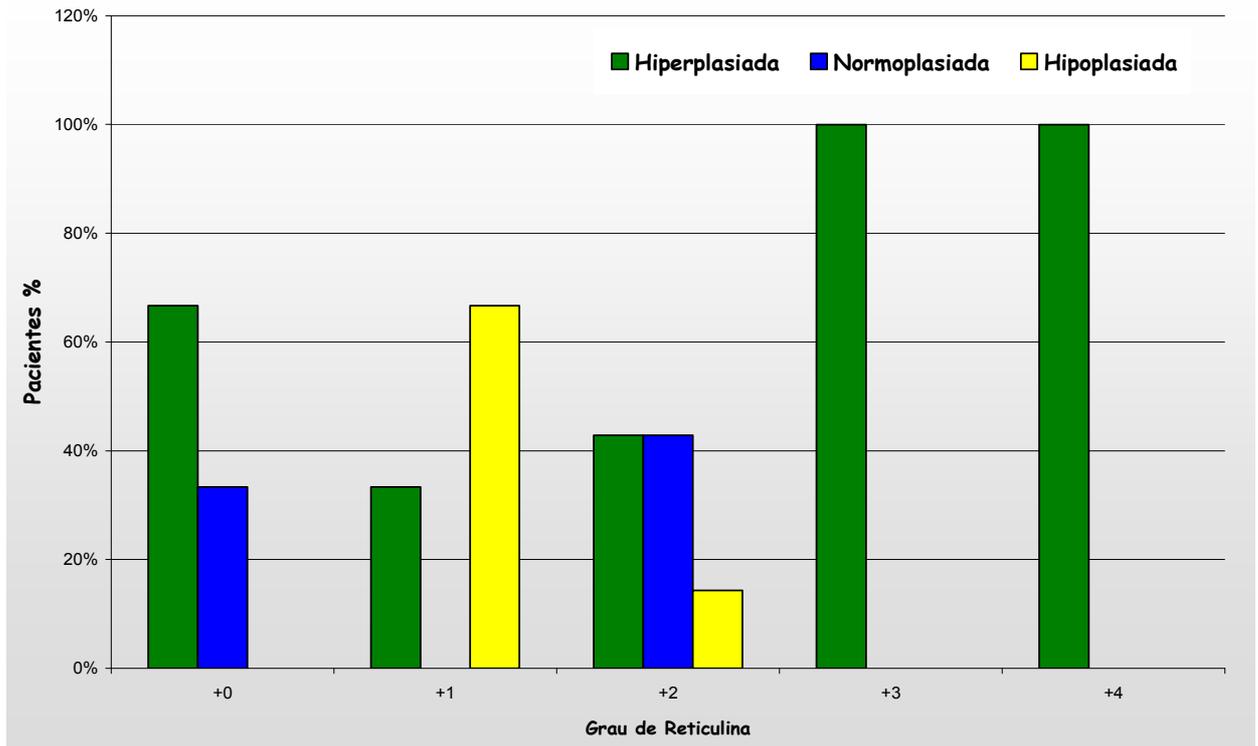


Figura 11: Análise do setor megacariocítico em conjunto com a análise do grau de fibrose da medula óssea do diagnóstico.

5.3.3 Fibrose

Comparando-se as amostras dos pacientes com as do grupo controle, foi realizada a análise da fibrose. Os resultados obtidos revelam que a maioria dos pacientes (59,09%) teve suas amostras graduadas em, no mínimo +2 de reticulina, na 1ª BMO. Já observando os resultados referentes à 2ª BMO, ou seja, às amostras obtidas após o tratamento com o fármaco, a grande maioria (72,73%) se concentrou nos graus 0 e +1 de reticulina. A tabela (Tabela 10) e a Figura abaixo trazem a distribuição dos respectivos resultados.

Tabela 10: Resultados da análise da fibrose das amostras de medula óssea do diagnóstico e após o tratamento

Fibrose	nº de pacientes (%)		
	Controle	1ª BMO	2ª BMO
0	0 (0)	6 (27,27)	10 (45,46)
+1	0 (0)	3 (13,64)	6 (27,27)
+2	0 (0)	7 (31,82)	4 (18,18)
+3	0 (0)	5 (22,73)	2 (9,09)
+4	10 (100)	1 (4,54)	0 (0)

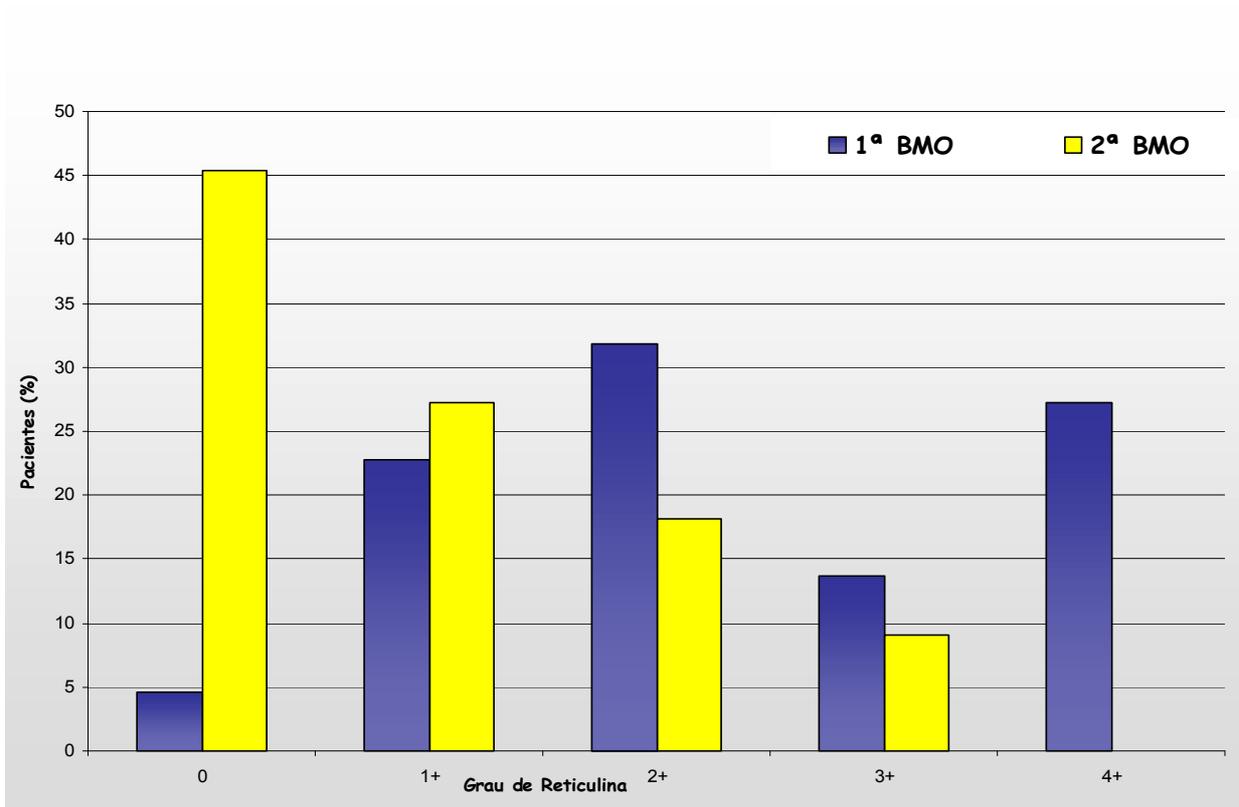


Figura 12: Distribuição das amostras de medula óssea (diagnóstico e pós-tratamento), segundo o resultado do grau de reticulina.

A seguir, seguem algumas imagens de cortes histológicos de medula óssea corados pelo Reagente de Gomori (Figuras 13-20), as quais permitem a visualização do grau de fibrose das amostras.

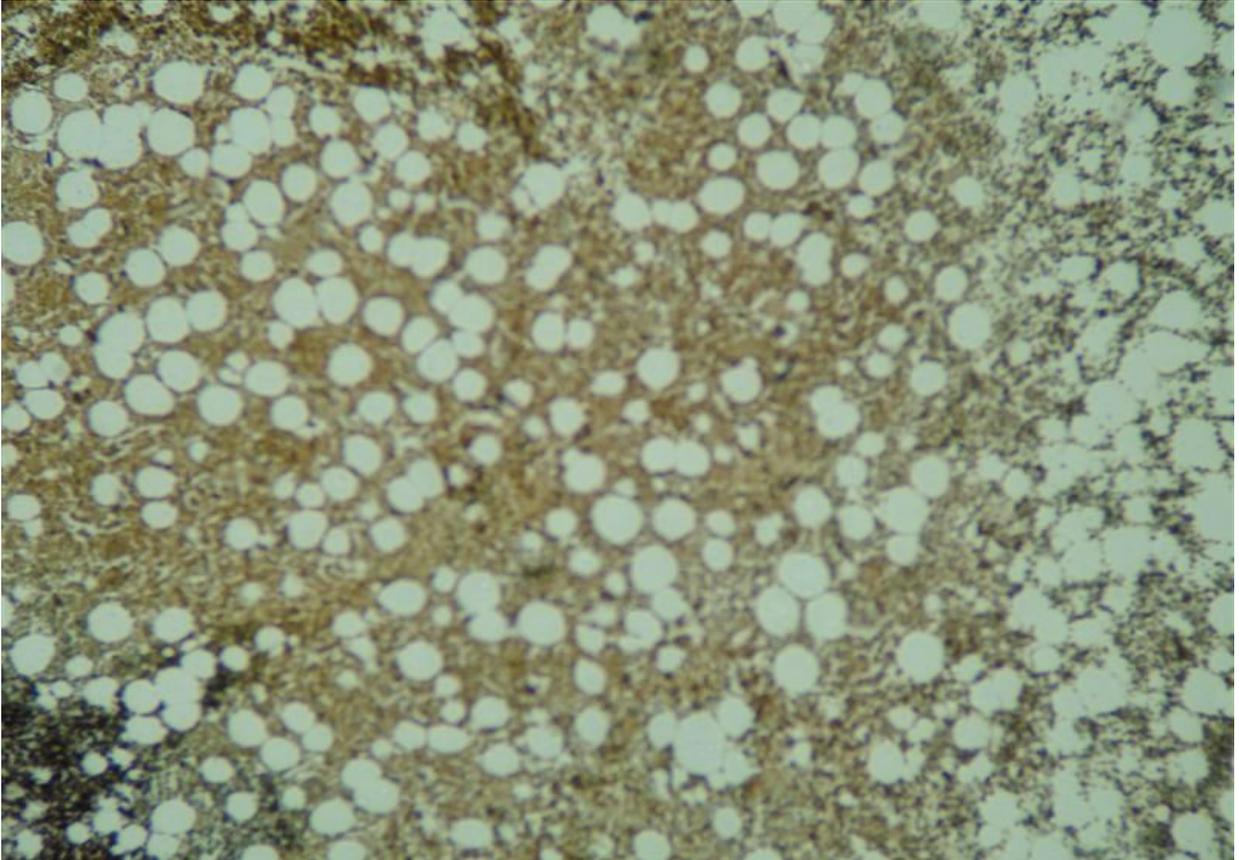


Figura 13: Corte histológico de medula óssea com a rede reticulínica preservada - **GRAU 0** (aumento de 100X).

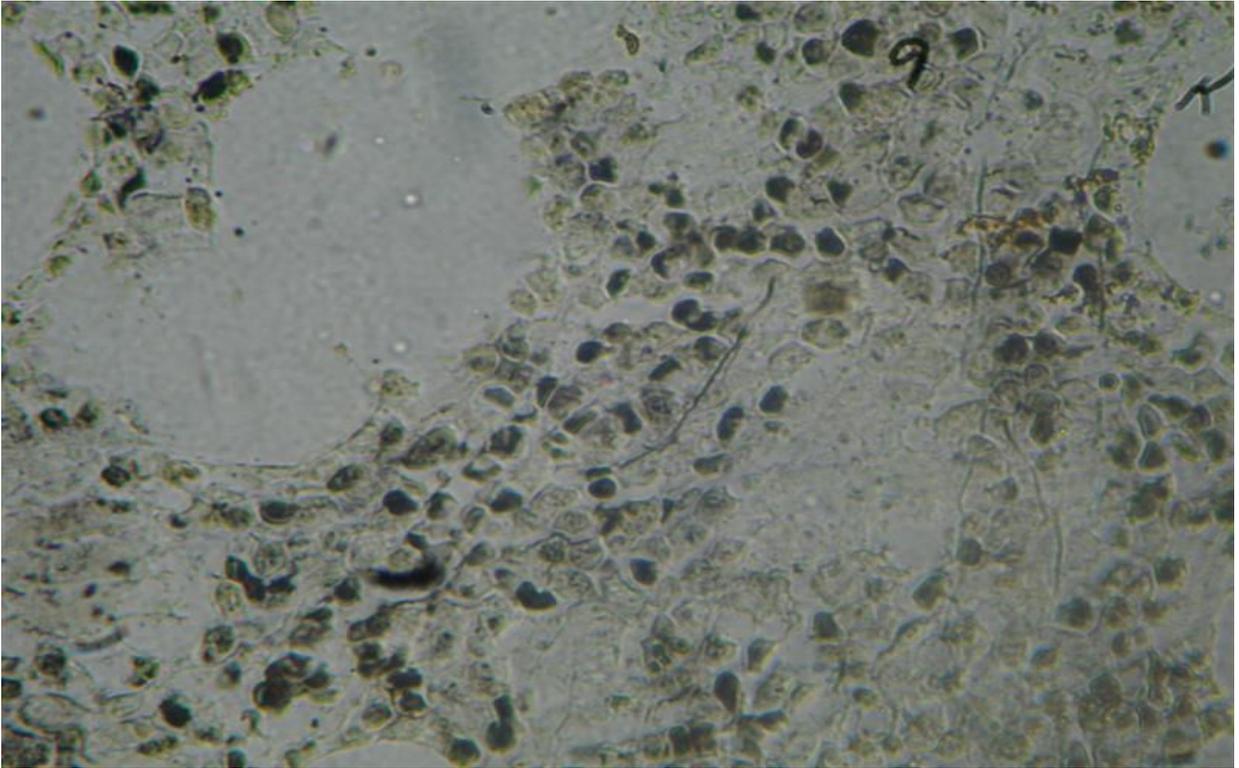


Figura 14: Corte histológico de medula óssea com a rede reticulínica discretamente aumentada - **GRAU +1** (aumento de 400X).

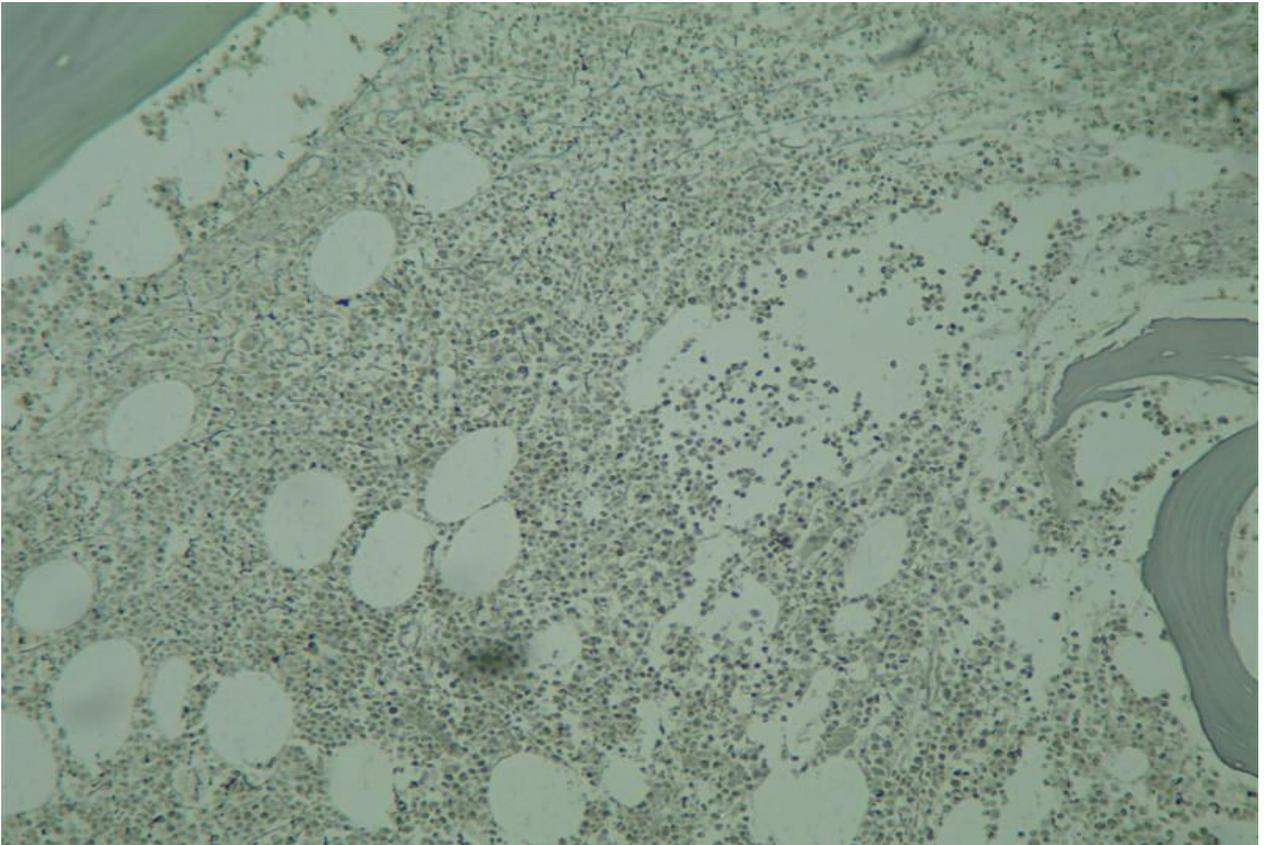


Figura 15: Corte histológico de medula óssea com a rede reticulínica focalmente aumentada - **GRAU +2** (aumento de 100X).

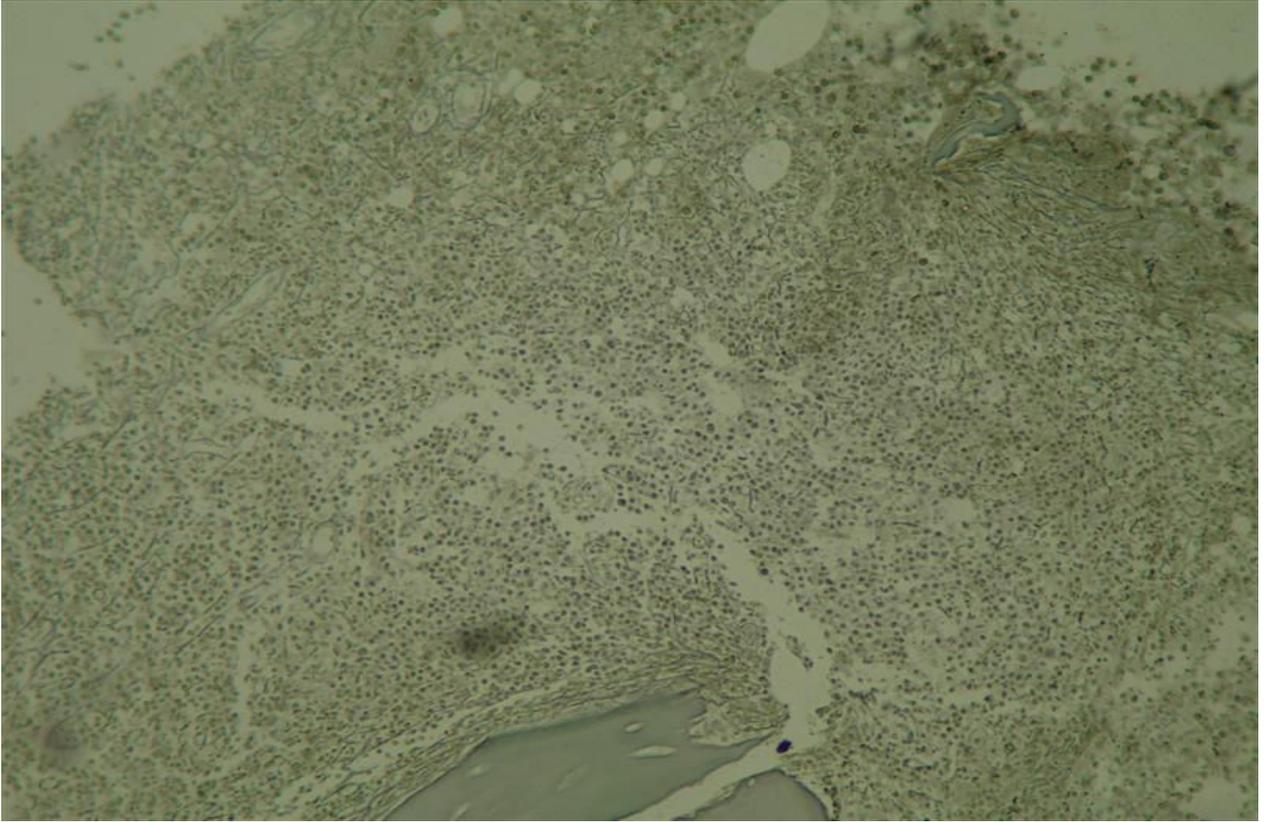


Figura 16: Corte histológico de medula óssea com a rede reticulínica difusamente aumentada - **GRAU +3** (aumento de 100X).

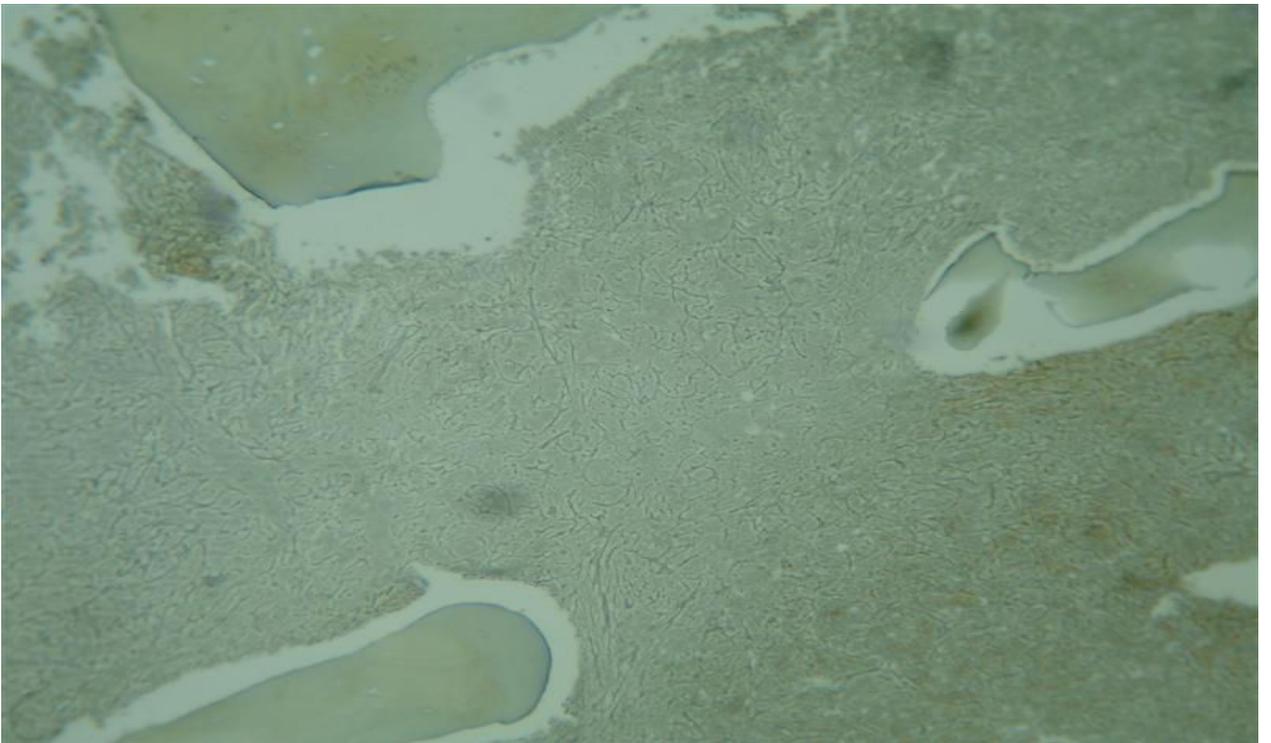


Figura 17: Corte histológico de medula óssea com mielofibrose **GRAU +4** (aumento de 100X).

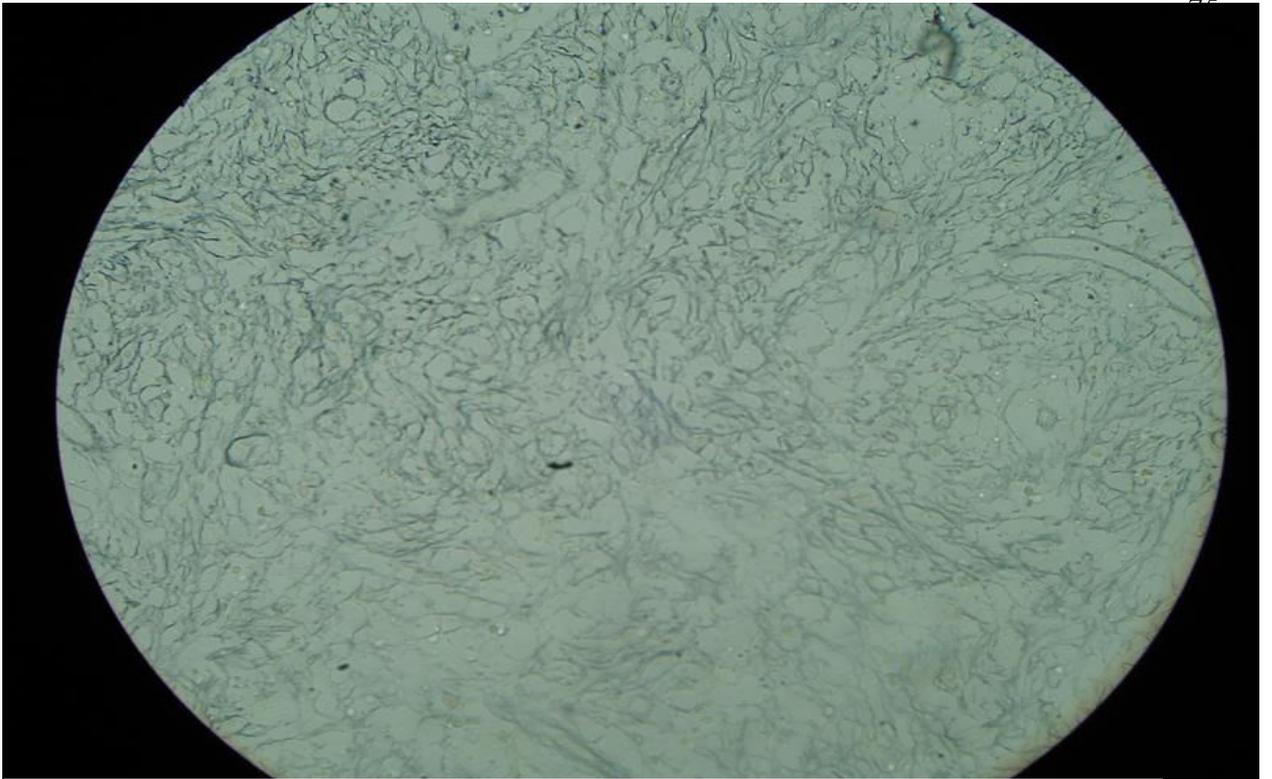


Figura 18: Corte histológico de medula óssea com mielofibrose - **GRAU +4** (aumento de 400X).

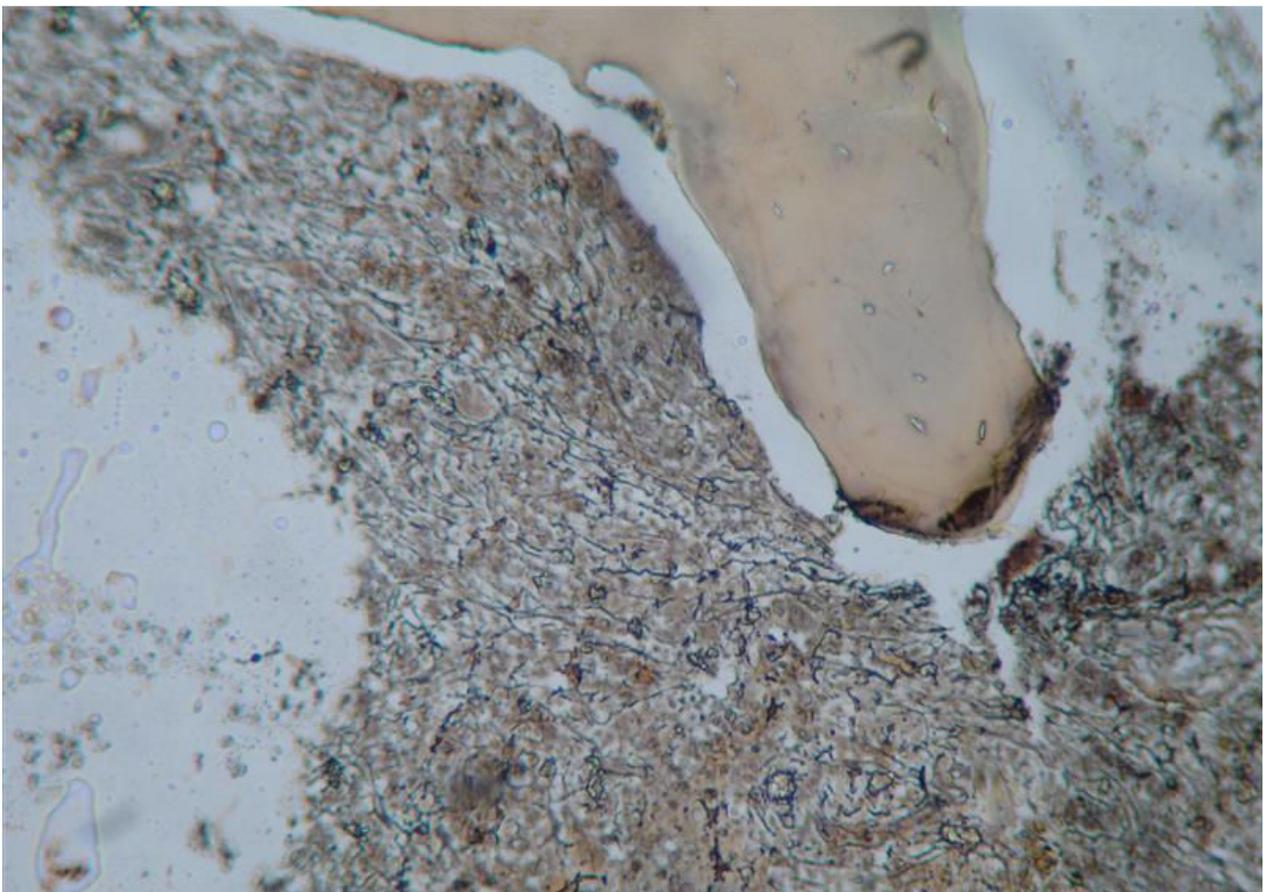


Figura 19: Corte histológico de medula óssea mielofibrose - **Grau +4** (aumento de 100X).

5.3.4 Relação entre Grau de Fibrose e Resposta Citogenética

Os resultados obtidos com a avaliação do grau de fibrose das amostras foram correlacionados com a resposta citogenética. Apesar de apenas um paciente ter sua amostra do diagnóstico graduada em 4+ de reticulina, o mesmo não alcançou remissão citogenética em nenhum momento do tratamento. Entre as amostras do diagnóstico que foram graduadas em 3+ e 2+ de reticulina (54,54%), menos da metade dos respectivos pacientes obtiveram resposta citogenética. Entre os pacientes que tiveram as amostras do diagnóstico graduadas em zero (rede reticulínica preservada), 83,33% respondeu citogeneticamente no prazo de 12 meses de tratamento (Figura 20). O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman revelou um acentuado índice de correlação, com valores de $r = -0,919$ e $P = 0,0271$.

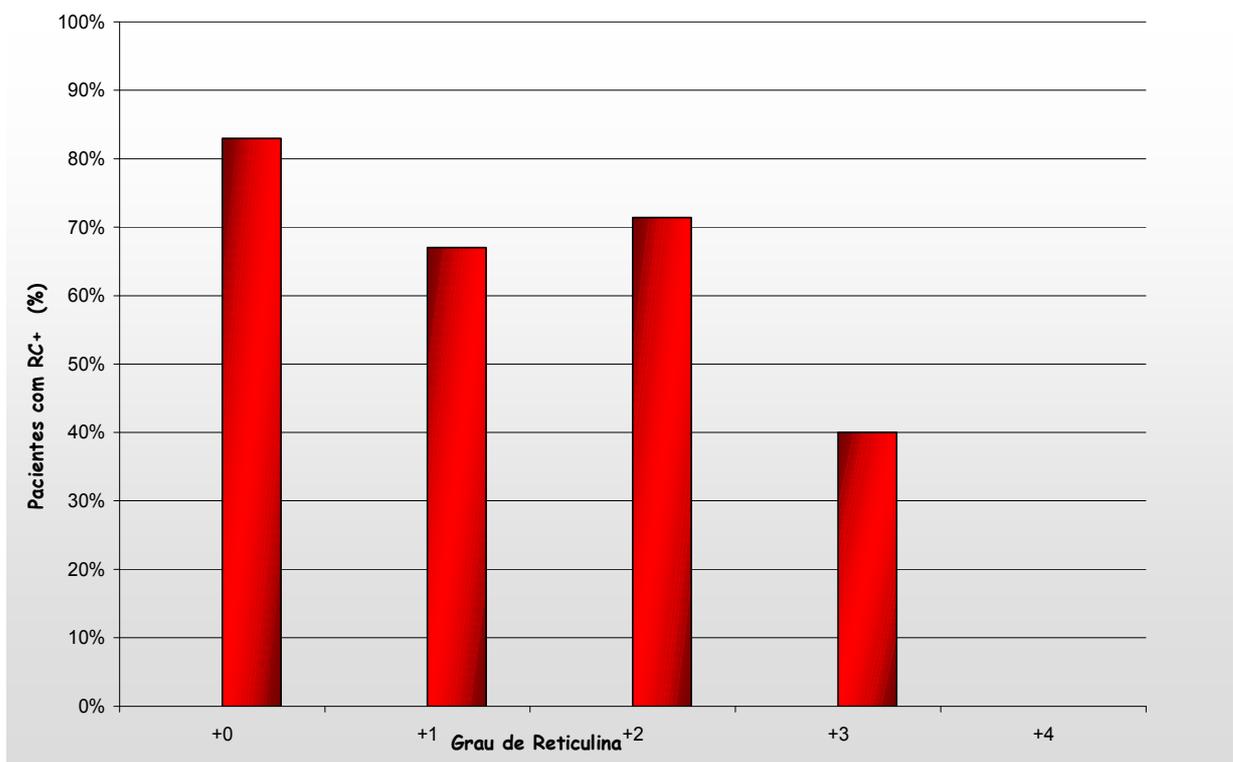


Figura 20: Correlação entre o Grau de Fibrose da 1ª BMO e a Resposta Citogenética.

O resultado da correlação entre a 2ª BMO e a resposta citogenética mostra que a resposta reticulínica pode realmente interferir na obtenção da resposta citogenética. Através da Figura 21 é possível visualizar que os pacientes que tiveram suas amostras graduadas em +3 e +4, não obtiveram remissão citogenética. Além disso, podemos observar na figura

abaixo, que há uma relação inversamente proporcional entre o percentual de pacientes que alcançam à resposta citogenética satisfatória e o grau de fibrose. Conforme aumenta o grau de reticulina, há uma diminuição no percentual de pacientes. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman mostrou um acentuado índice de correlação, com valores de $r = -0,917$ e $P = 0,028$.

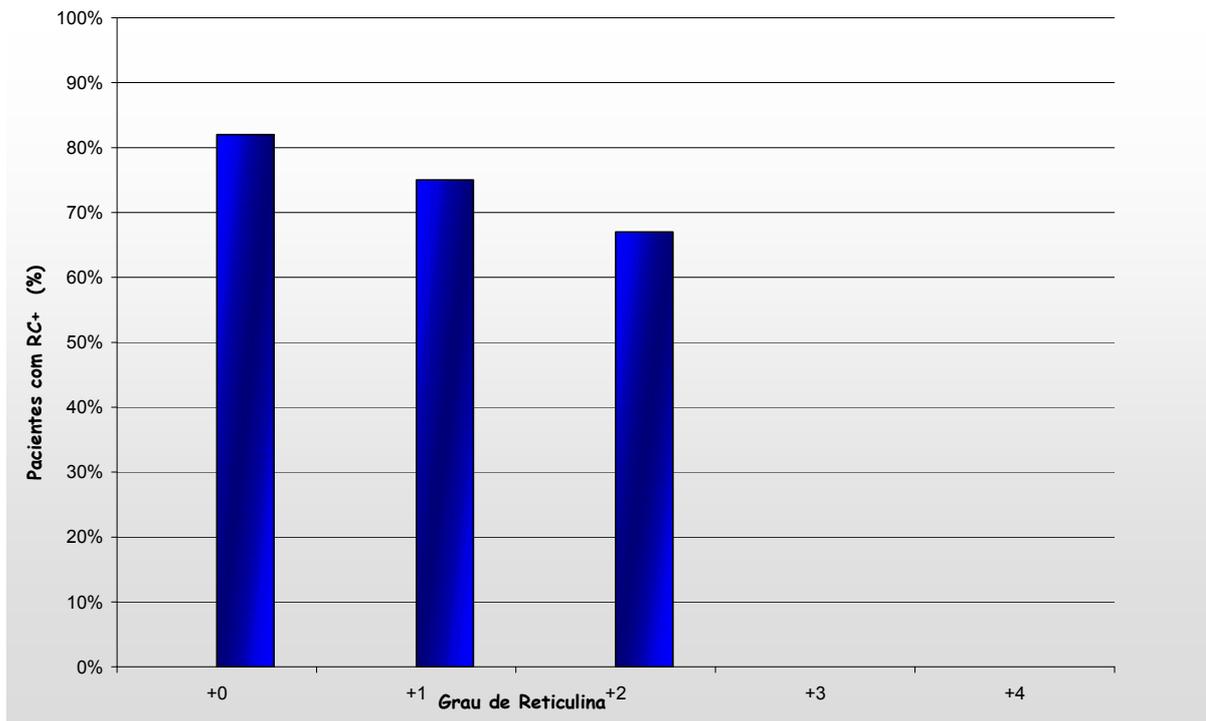


Figura 21: Correlação entre o Grau de Fibrose da 2ª BMO e a Resposta Citogenética.

5.3.5 Vascularização

A vascularização foi estimada nas amostras de medula óssea do diagnóstico e também naquelas colhidas após o tratamento com o fármaco. Amostras controle foram utilizadas como base para a classificação deste parâmetro. Juntamente com os casos dos pacientes, 10 amostras consideradas normais para vascularização e 10 amostras de medula óssea provenientes de portadores de mieloma múltiplo (onde geralmente há um aumento significativo dos vasos do tecido medular) foram incluídas nesta análise (Tabela 11).

Tabela 11: Resultados da análise da vascularização das amostras de medula óssea do diagnóstico e após o tratamento

Vascularização - MVD	n° de pacientes (%)		
	Controle	1ª BMO	2ª BMO
Grau I	10 (50)	2 (9,09)	13 (59,09)
Grau II	0 (0)	8 (36,36)	7 (31,82)
Grau III	0 (0)	9 (40,91)	2 (9,09)
Grau IV	10 (50)	3 (13,64)	0 (0)

A Figura 22 permite visualizar a distribuição das amostras com relação ao grau de vascularização. Enquanto as amostras do diagnóstico concentram-se mais nos graus II e III (77,27%), as amostras obtidas após o tratamento agrupam em maior parte os graus I (59,09%) e II (31,82%).

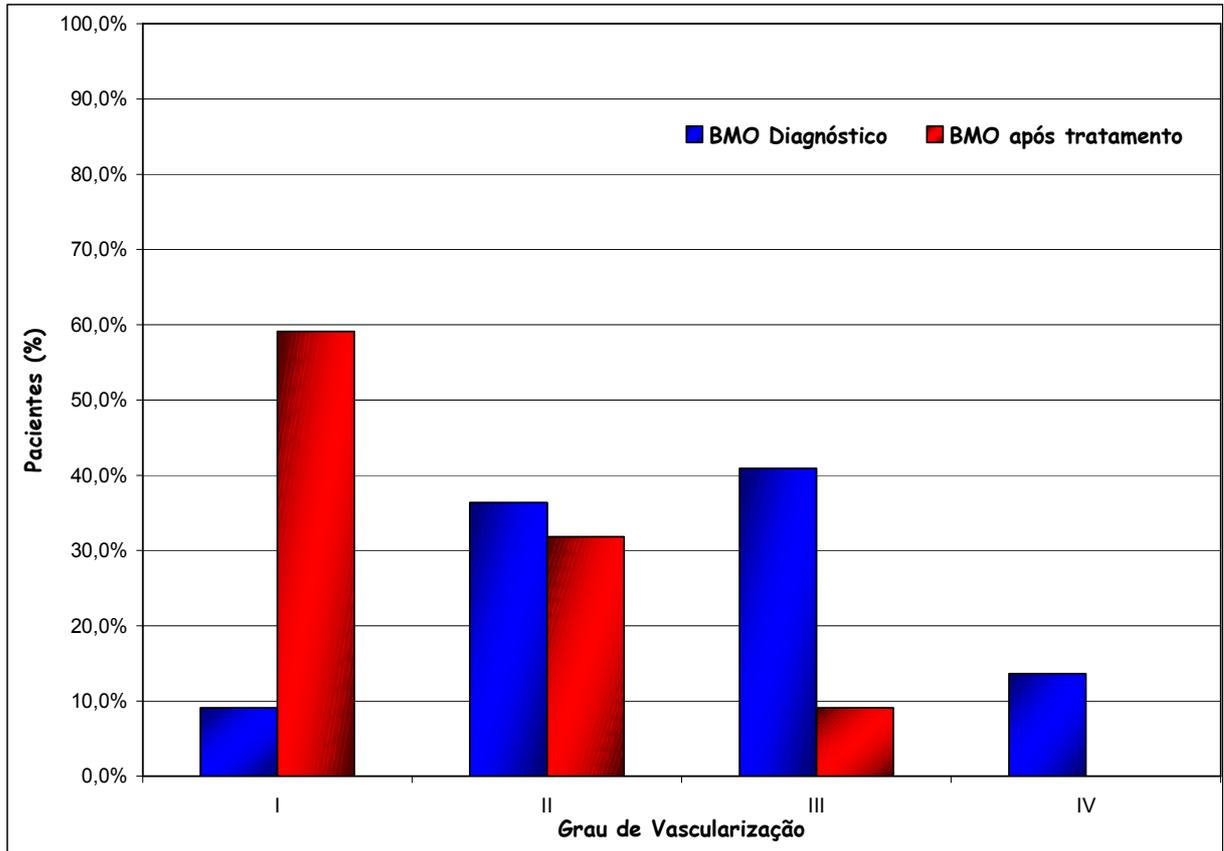


Figura 22: Grau de Vascularização da MO do diagnóstico e após o tratamento com o fármaco.

A seguir, seguem algumas fotos (Figuras 23-26) que permitem visualizar os diferentes graus de vascularização, os quais foram obtidos pela técnica de imuno-histoquímica.

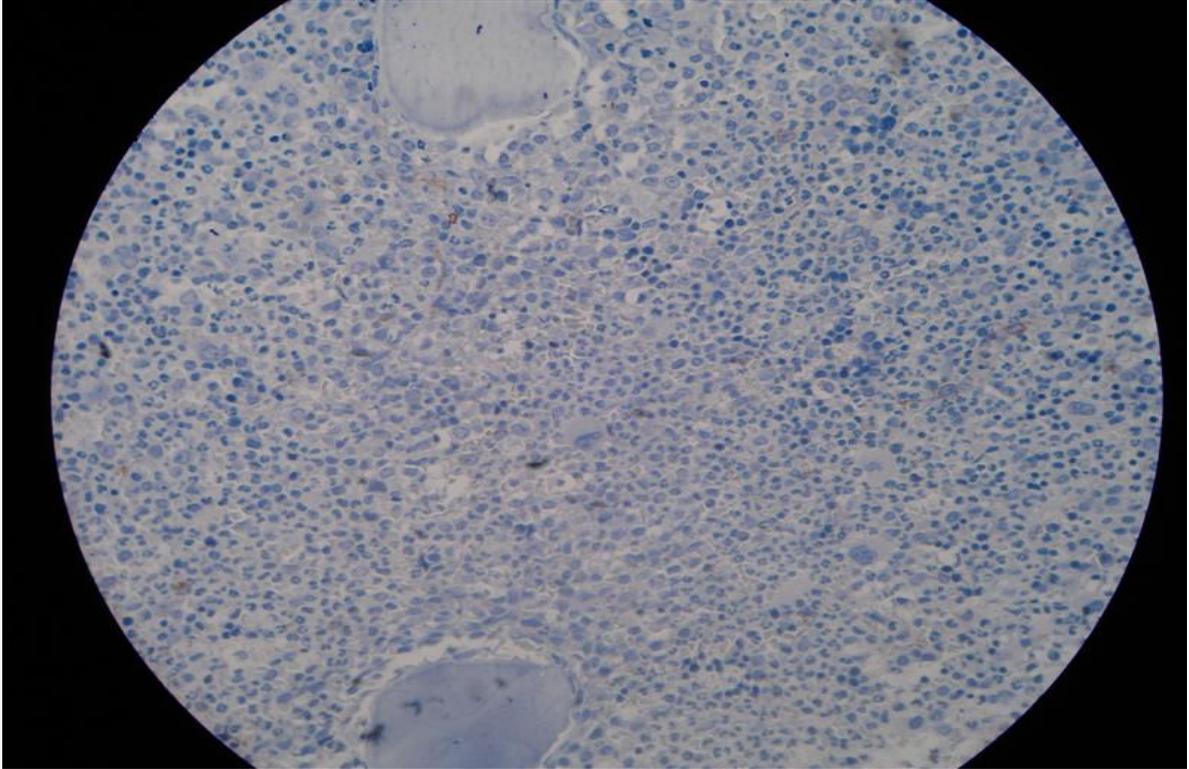


Figura 23: Corte histológico de medula óssea com a vascularização normal – **GRAU I** (aumento de 100X).

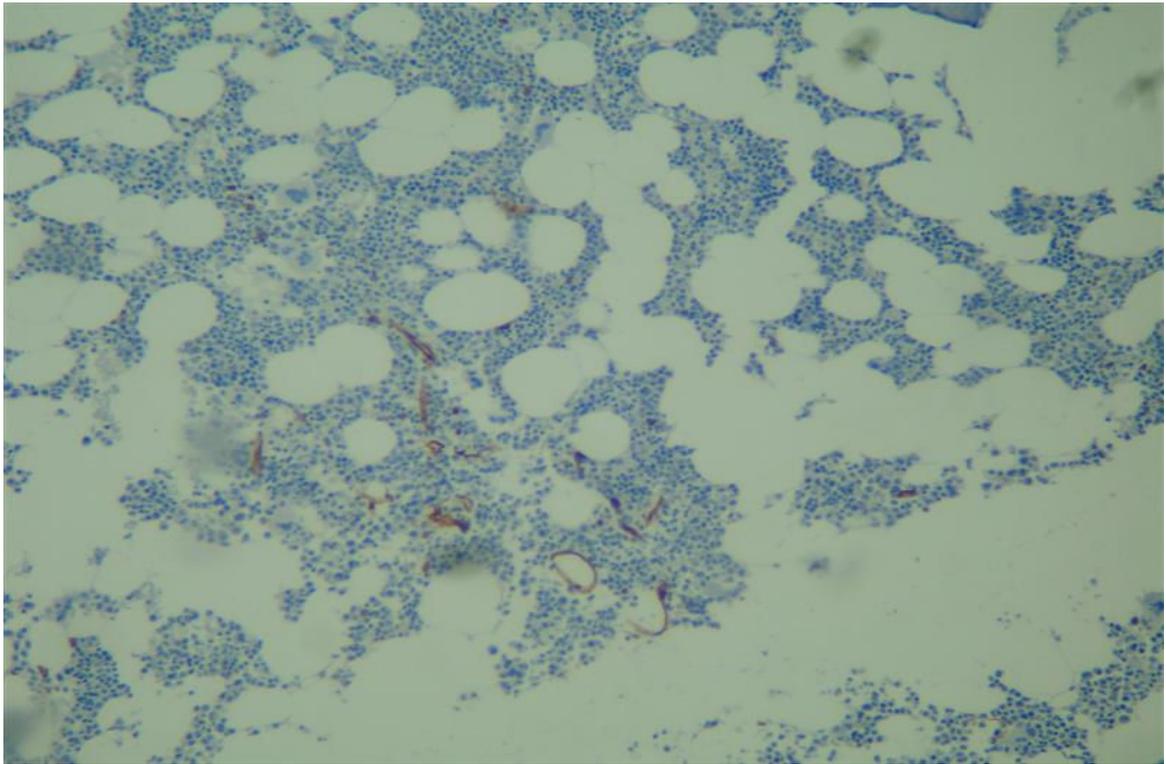


Figura 24: Corte histológico de medula óssea com a vascularização focalmente aumentada - **GRAU II** (aumento de 100X).

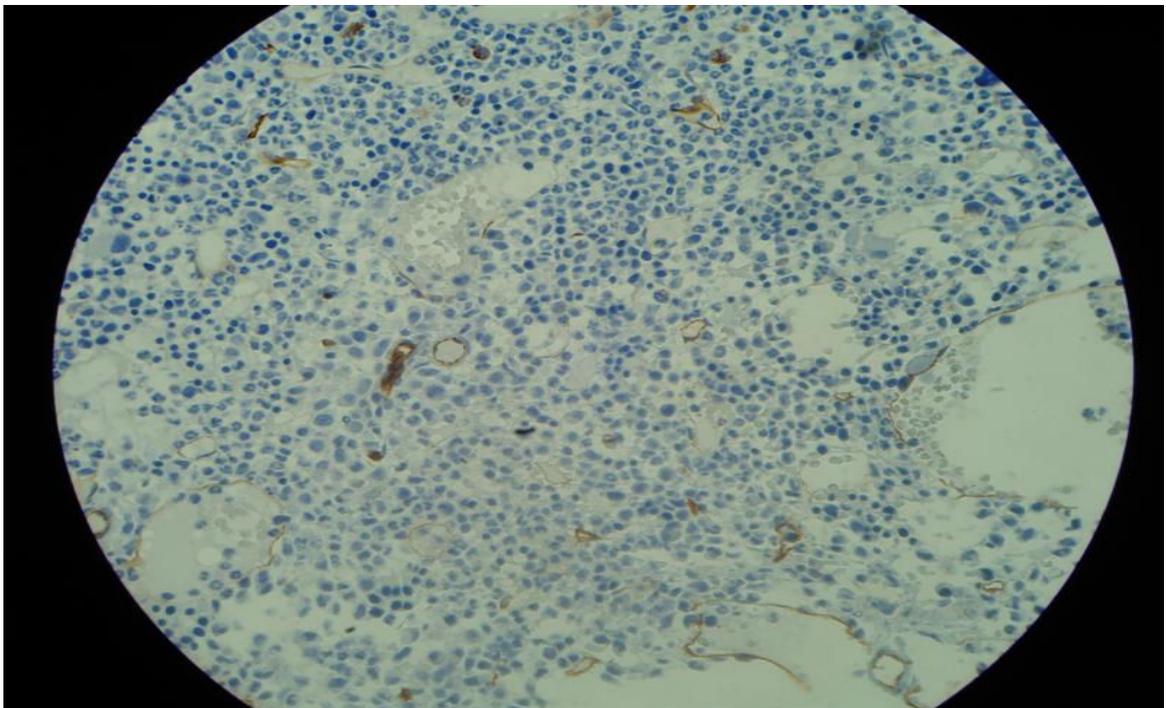


Figura 25: Corte histológico de medula óssea com a vascularização aumentada - **GRAU III** (aumento de 100X).

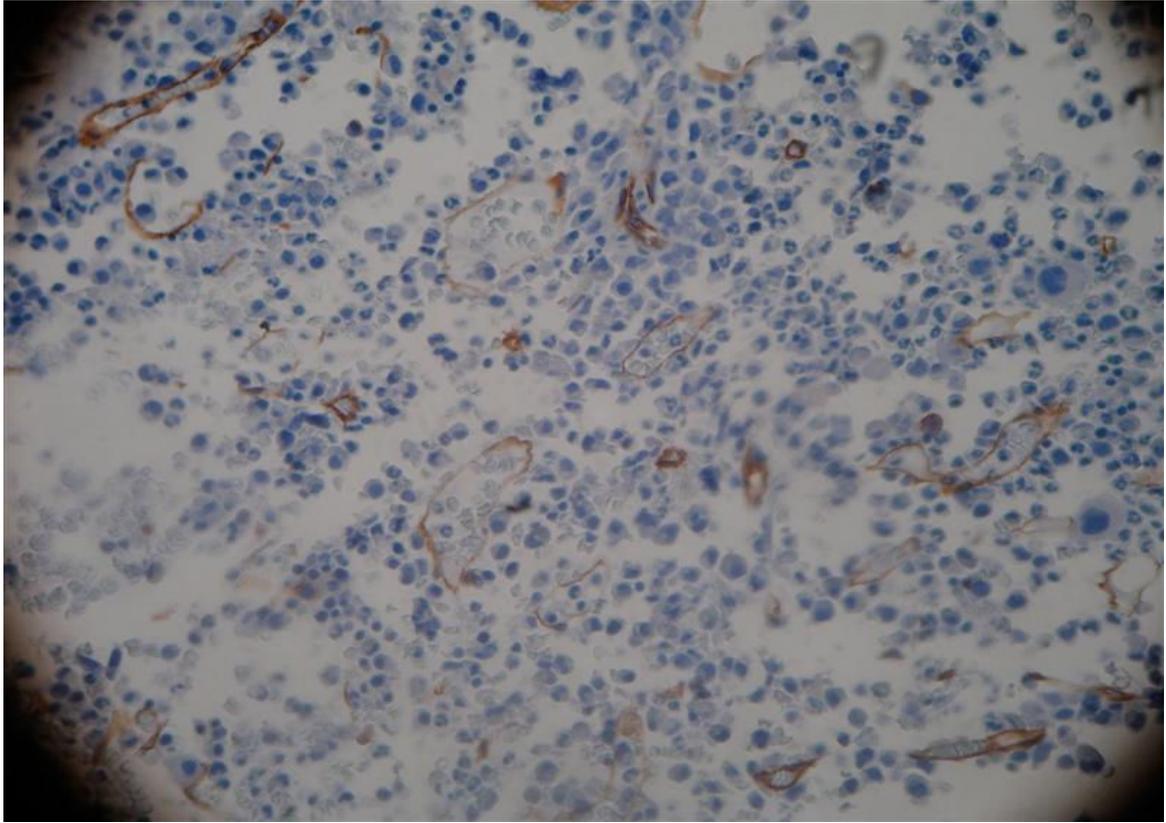


Figura 26: Corte histológico de medula óssea com a vascularização intensamente aumentada - **GRAU IV** (aumento de 100X).

5.3.6 Relação entre Grau de Vascularização e Resposta Citogenética

Assim como foi realizado com o grau de fibrose, a vascularização também foi correlacionada com a taxa de resposta citogenética. Através da análise da vascularização das amostras de medula óssea do diagnóstico e do estudo citogenético relacionado à respectiva biópsia (Figura 27), percebeu-se que à medida que o grau de vascularização aumentou, o percentual de pacientes que obtiveram resposta citogenética diminuiu. Dentre os pacientes que tiveram grau I de vascularização, todos obtiveram resposta citogenética satisfatória. Entre os pacientes que tiveram suas amostras do diagnóstico classificadas como grau II, 62,5% respondeu citogeneticamente. Entre o grupo classificado como grau III, 55,5% apresentou resposta citogenética. E finalmente, entre os pacientes que tiveram suas medulas graduadas como grau IV, apenas 33,3% obteve resposta citogenética. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman mostrou um acentuado índice de correlação, com valores de $r = -0,964$ e $P = 0,0092$.

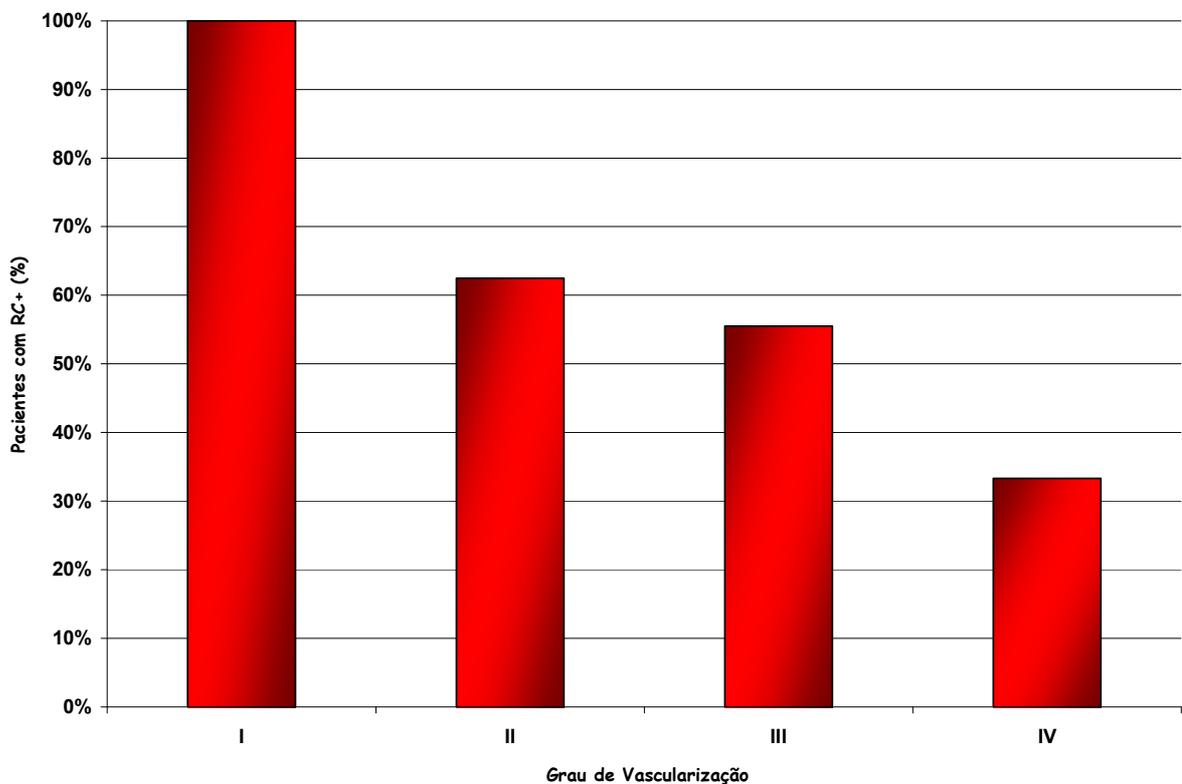


Figura 27: Correlação entre o Grau de Vascularização da 1ª BMO e a Resposta Citogenética.

Observando os resultados da correlação entre a 2ª BMO e a taxa de resposta citogenética (Figura 28), é possível perceber que os pacientes que tiveram suas amostras graduadas em III e IV, não obtiveram resposta citogenética satisfatória. Enquanto 57% e 77% dos pacientes que tiveram suas amostras graduadas em II e I, respectivamente, atingiram uma resposta citogenética satisfatória. O resultado da análise estatística pelo Coeficiente de Spearman revelou um razoável índice de correlação, com valores de $r = -0,940$ e $P = 0,060$.

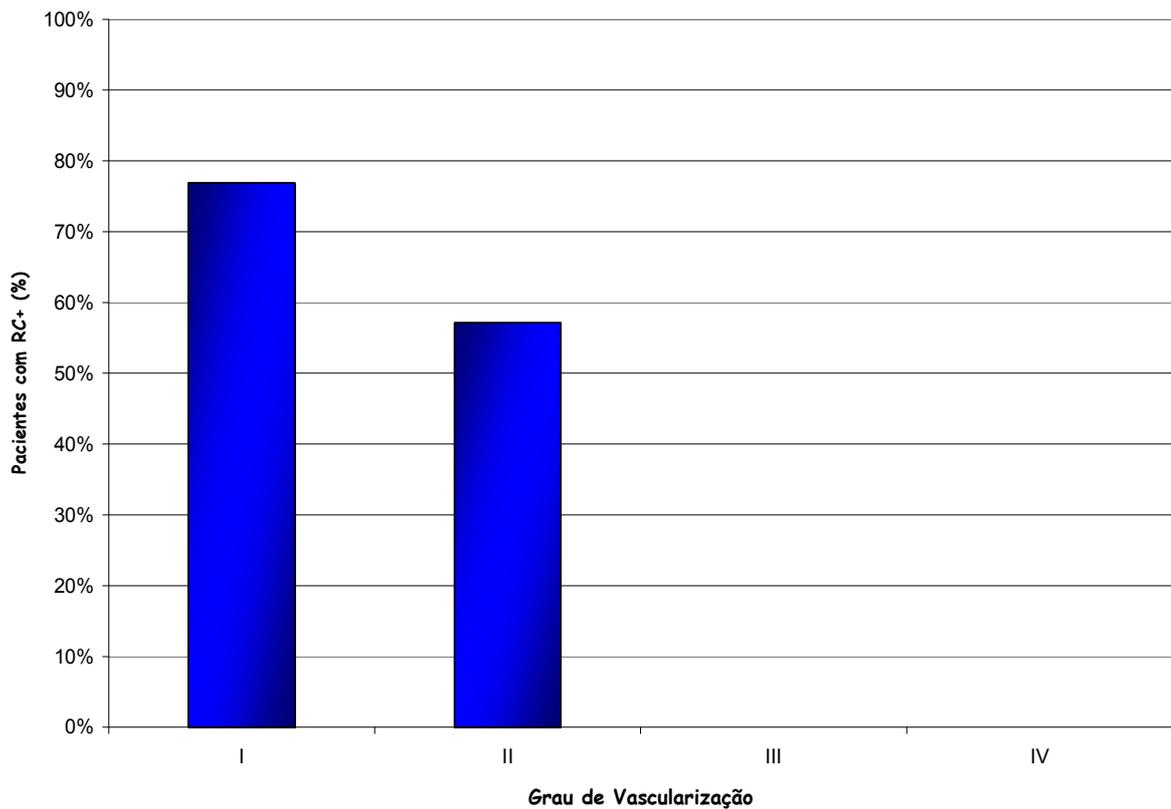


Figura 28: Correlação entre o Grau de Vascularização da 2ª BMO e a Resposta Citogenética.

6 - DISCUSSÃO

A leucemia mielóide crônica acomete todas as faixas etárias, inclusive crianças. No entanto, apresenta um pico de incidência entre 45 e 55 anos de idade, e em 10% a 15% dos casos, indivíduos a partir de 60 anos (SAWYERS, 1999; PASQUINI *et al.*, 2001; WILLIAMS, 2006;). Com relação às características da amostra do presente estudo, a média de idade dos pacientes foi de 42,36 anos, ou seja, levemente inferior quando comparada à bibliografia relacionada. E ao ampliar esta amostragem, considerando os 67 pacientes portadores de LMC, que se encontram cadastrados no CEPON e que fazem uso atualmente do fármaco, a média de idade (48,22 anos) se revelou dentro da faixa descrita pelas fontes bibliográficas.

Apesar dos pacientes incluídos no estudo terem se apresentado em igual proporção com relação ao sexo, a literatura aponta que há um discreto predomínio no sexo masculino em relação ao feminino, na proporção de 1,3:1,0 (PASQUINI *et al.*, 2001). Observando os mesmos 67 pacientes descritos anteriormente, a proporção foi de 1,03:1,0.

A terapia usada para o tratamento da LMC era extremamente limitada até o final da década de 70. Após o controle da leucocitose e da plaquetose por alguns anos com o uso de BU e HY, a agudização era certa e absolutamente resistente à quimioterapia. Isto mudou na década de 80, no momento em que o IFN- α passou a ser usado no tratamento (MELLO, 2004). Este agente é capaz de induzir à remissão hematológica em cerca de 90% dos pacientes e à remissão citogenética (completa em torno de 22%; parcial em aproximadamente 14%) em pacientes em fase crônica. Assim como o imatinibe, o principal objetivo do tratamento com IFN- α é a obtenção da remissão citogenética, já que a mesma está diretamente relacionada às sobrevidas global e livre de progressão (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

No presente trabalho, todos os pacientes incluídos fizeram uso de IFN- α antes de iniciar o tratamento com o mesilato de imatinibe. No entanto, a minoria (31,82%) utilizou por mais de 12 meses. A troca da modalidade terapêutica ocorreu em 54,54% devido à resistência ao IFN- α e, em 31,82% por motivo de intolerância ao mesmo.

Segundo PASQUINI *et al.*, 2001, a intolerância e a citopenia intensa impedem que um número significativo de pacientes receba a dose máxima recomendada de IFN- α . E os efeitos adversos podem ser suficientemente graves para impedir seu uso, como ocorre em 15% a 20%

dos pacientes. E, como apenas 5% a 10% dos pacientes que fazem uso de IFN- α mantêm a condição de remissão citogenética por tempo prolongado, um grande número deles necessita trocar a terapia.

O aumento do baço foi observado em menos da metade dos pacientes (45,46%). Esta informação contrasta com PASQUINI *et al.*, 2001, que afirma que este sinal clínico está presente em mais de 80% dos casos. No entanto, acredita-se que o número encontrado no atual estudo esteja subestimado, já que a esplenomegalia foi avaliada apenas no momento do diagnóstico, e não no decorrer do tratamento.

O tempo de doença diagnosticada em relação ao início da terapia tratamento com o mesilato de imatinibe ultrapassou 12 meses em 68,18% dos casos. Esta informação foi coletada por apresentar relação com as chances de uma boa resposta ao tratamento, além de se tratar de um dado importante na avaliação do grau de risco em que se encontra cada paciente. Apesar de o fármaco mostrar boa eficácia terapêutica, outros trabalhos revelam que o tratamento é mais promissor em pacientes com diagnóstico recente (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Com relação aos achados laboratoriais, a maioria dos pacientes (68,18%) apresentou leucocitose entre 10.000 e 50.000/mm³, na primeira avaliação. Estes dados estão de acordo com as informações citadas por PASQUINI *et al.*, 2001, que afirmam que a característica laboratorial mais importante da fase crônica da LMC é a presença de leucocitose no sangue periférico, comumente acima de 25.000/mm³ e raramente atingindo níveis superiores a 400.000/mm³.

Outro item analisado no hemograma do diagnóstico foi: presença de células mais jovens da linhagem granulocítica. O estudo revelou que a grande maioria (63,64%) continha mieloblastos no sangue periférico. No entanto, o percentual destas células, em conjunto com os promielócitos, foi inferior a 10% em todos os pacientes. Segundo o autor citado no parágrafo acima, na contagem diferencial, os granulócitos apresentam-se em todas as fases de maturação, predominando os mielócitos e as formas maduras, enquanto os mieloblastos e promielócitos representam menos de 10%.

As plaquetas do hemograma referente ao diagnóstico também foram analisadas. As mesmas se apresentaram aumentadas em número (plaquetose) em 40,91% dos pacientes, e em 9,09% deles, atingiram níveis exorbitantes, ultrapassando 1.000.000/ mm³. A maior parte dos indivíduos (59,09%) apresentou uma contagem normal de plaquetas, entre 150.000 e 450.000/ mm³ e, nenhum paciente apresentou trombocitopenia. Os resultados obtidos também estão em conformidade com as referências, que afirmam que a contagem de plaquetas é normal ou aumentada (30% a 50% dos casos), enquanto a trombocitopenia está presente em menos de 10% dos casos (PASQUINI *et al.*, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Os níveis de hemoglobina observados no hemograma do diagnóstico revelaram discreta anemia na maioria dos pacientes (63,64%). Entre os que apresentaram valores normais, revelaram níveis próximos ao limite inferior da faixa de normalidade. Diversas bibliografias relacionadas afirmam que a taxa de hemoglobina de pacientes portadores de LMC geralmente se mostra pouco abaixo do limite inferior dos valores de referência, variando entre 10,0 e 11,0 g/dL (PASQUINI *et al.*, 2001; WILLIAMS, 2006).

Com relação à eficácia terapêutica, foram avaliados: sobrevida global dos pacientes durante 24 meses de uso do fármaco; obtenção da resposta hematológica, assim como sua manutenção durante este mesmo período; sobrevida livre de progressão da doença em 2 anos de tratamento e obtenção da resposta citogenética satisfatória, também avaliada no período de 24 meses.

Com relação à sobrevida dos pacientes incluídos no estudo, foi observado um único óbito durante o período de avaliação. O mesmo ocorreu quando o paciente se encontrava no sétimo mês de tratamento. Após o período de acompanhamento, outros 3 óbitos foram relatados (aos 26, 34 e 35 meses de uso de imatinibe). Entre os 67 pacientes que utilizam atualmente o fármaco, 68,66% faz uso do mesmo há mais de 4 anos.

A história natural dos pacientes portadores de LMC mudou significativamente nos últimos 30 anos. No passado, a sobrevida mediana era de 3 anos, quando menos de 30% encontravam-se vivos após 5 anos do diagnóstico. Na última década, a duração da sobrevida aumentou para 7 anos, onde 50% a 60% deles encontram-se vivos aos 5 anos do diagnóstico e mais de 30% estão vivos aos 10 anos. Os principais fatores que contribuíram para essa

mudança foram: diagnóstico precoce, tratamento específico mais efetivo e de suporte melhorado (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Com o decorrer do tratamento, 100% dos pacientes atingiram a resposta hematológica completa. A mediana de tempo observada para este evento ocorrer foi de 1,5 meses. Estes resultados superam os obtidos com um estudo de fase II, realizado em portadores de LMC em fase crônica, onde 95% dos pacientes alcançaram esta resposta (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por FUNKE *et al.*, 2005, avaliou 98 pacientes tratados com mesilato de imatinibe no Brasil. Entre os 28 pacientes que estavam em fase crônica, 100% deles obtiveram resposta hematológica satisfatória, onde 86% atingiram a resposta hematológica completa e 14% a resposta hematológica parcial.

A manutenção da resposta hematológica, durante os 24 meses de acompanhamento do presente estudo, ocorreu em 72,73%. Entre os pacientes que apresentaram alteração significativa no hemograma (27,27%), metade destes evoluiu para a fase acelerada. Uma alteração neste exame de rotina não está impreterivelmente relacionada à evolução da doença. A mudança de fase compreende a avaliação de vários critérios, entre os quais estão: esplenomegalia progressiva, refratariedade ao tratamento com progressiva leucocitose e/ou trombocitose, aumento da porcentagem de blastos, promielócitos e basófilos na medula óssea e/ou no sangue periférico. Além disso, o surgimento de cariótipos com anormalidades citogenéticas adicionais (O'DWYER *et al.*, 2002). Desta forma, após não se limitar apenas à análise do hemograma, o estudo obteve uma taxa de sobrevida livre de progressão da doença em 24 meses de tratamento de 86,36%.

Os resultados obtidos referentes à resposta citogenética revelam que 63,64% dos pacientes atingiram a resposta citogenética considerada satisfatória (< 35% de células cromossomo Ph¹ positivas) no período de acompanhamento. O tempo médio para obtenção desta resposta pelos pacientes foi de 8,78 meses (variando entre 4 e 14 meses). Mesmo os pacientes refratários (36,36%), ou seja, aqueles que não obtiveram uma resposta citogenética satisfatória continuaram utilizando o fármaco até completarem pelo menos 2 anos de tratamento. E, apesar de a refratariedade também estar relacionada à progressão da doença (PASQUINI *et al.*, 2001), menos da metade dos pacientes que não responderam (37,5%), evoluíram para fase acelerada neste período.

O percentual de pacientes que atingiu a resposta citogenética satisfatória do presente trabalho encontra-se de acordo com os resultados atingidos por um estudo de fase II realizado em pacientes resistentes ao IFN- α , tratados com mesilato de imatinibe, considerando a fase da doença. Neste estudo, 60% dos pacientes em fase crônica obtiveram resposta citogenética maior, contrastando com as taxas dos pacientes que estavam em fase acelerada e em crise blástica, que foi de 24% e 16%, respectivamente (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Além disso, foi observada uma conformidade com o estudo realizado no Brasil, descrito anteriormente na avaliação da resposta hematológica, o qual também analisou a resposta citogenética. Entre os 28 pacientes em fase crônica, 25 obtiveram número adequado de metáfases, possibilitando as avaliações. A resposta citogenética maior foi observada em 68% dos pacientes (parcial em 7%; completa em 61%). Um paciente (4%) obteve resposta citogenética menor e 5 pacientes (18%) não obtiveram resposta alguma. A média de tempo para atingir esta resposta foi de 15 meses, na faixa de 6 a 24 meses (FUNKE *et al.*, 2005).

Já PASQUINI *et al.*, 2001 afirma que, os resultados esperados do tratamento com mesilato de imatinibe de pacientes em fase crônica compreendem uma taxa de RCM em 6 meses, de 80% e uma RCC em até 18 meses, de 75%.

Diante do nosso estudo e de outros pesquisadores, observou-se que os indivíduos que não respondem citogeneticamente até 2 anos de tratamento, provavelmente são refratários e de mau prognóstico. Após este período, pacientes que não obtiveram resposta adequada ao imatinibe e que não são candidatos a transplante alogênico, o aumento da dose (600 ou 800 mg/dia) ou a combinação com outras drogas, como o IFN- α e/ou citarabina podem proporcionar melhores taxas de resposta e aumento da sobrevida (GUIMARÃES *et al.*, 2006).

Com relação à análise da medula óssea, no presente estudo, a celularidade da primeira biópsia de medula óssea, mostrou-se extremamente aumentada em 100% dos pacientes, estando de acordo com as informações relatadas por WILLIAMS, 2006, que refere uma hiper celularidade acentuada, com predomínio da série granulocítica. Na LMC, a

relação entre granulócito e eritrócito (L:E) varia entre 10:1 e 30:1, no momento do diagnóstico, contrastando com a relação normal de 2:1 a 4:1. Diferentemente, as amostras obtidas após o tratamento com o fármaco mostraram-se na sua grande maioria (81,82%) hipo e normocelulares. Isto é esperado, já que o imatinibe atua principalmente sobre as células progenitoras hematopoiéticas cromossomo Ph positivas (WILLIAMS, 2006). Somado a isto, estudos demonstram que o imatinibe tem efeito inibitório em progenitores normais CD34 positivos. O fármaco também atua no c-Kit (ou CD117), que se trata de um receptor para o fator de célula tronco. Como este receptor, juntamente com outras citocinas, é fundamental na expansão de progenitores hematopoiéticos, esses dados justificam a hipoplasia apresentada na maioria dos pacientes.

HASSELBALCH *et al.*, 2004 desenvolveram um estudo analisando a resposta terapêutica de pacientes portadores de mielofibrose idiopática (primária) e com mielofibrose pós-policitemia. Mesmo sendo o imatinib, um inibidor de crescimento de células progenitoras, foi observado um aumento dessas células circulantes em alguns pacientes com mielofibrose idiopática. Além disso, eles observaram que o fármaco administrado sozinho causava significantes efeitos colaterais. Por isso, este estudo também avaliou a segurança e a eficácia do mesmo administrado combinado à HU e ao IFN- α . Os resultados demonstraram que a combinação alcançou um rápido decréscimo na contagem de células (leucócitos e plaquetas), além de ter sido melhor tolerada pelos pacientes. E apenas um subgrupo de pacientes com diagnóstico precoce obteve resultados promissores com a terapia não combinada.

Ao analisar-se o grau de fibrose, mais de 50% das amostras do diagnóstico foram graduadas em +2, +3 e +4. Contrastando com as amostras obtidas após a terapia, que se concentraram na grande maioria (72,73%) em 0 e +1 de reticulina. Além disso, as amostras de 63,63% revelaram hiperplasia megacariocítica, estando de acordo com as informações obtidas na bibliografia.

A análise da fibrose foi investigada por ser elucidado que amostras de medula óssea de indivíduos portadores de LMC apresentam um aumento nas fibras de reticulina, sendo que o mesmo mostra-se exacerbado em quase 50% dos pacientes. Este aumento está correlacionado com a proporção de megacariócitos presentes na medula óssea, que geralmente estão hiperplasiados e ectópicos (WILLIAMS, 2006). É justamente essa

hiperplasia da linhagem megacariocítica que promove uma liberação aumentada de PDGF e, uma conseqüente estimulação exacerbada dos fibroblastos. Outra razão que justifica a investigação do grau de fibrose é o fato da mesma estar associada com prognóstico dos pacientes (BUESO-RAMOS *et al.*, 2004). Além disso, alguns estudos já demonstraram que o mesilato de imatinib também atue sobre o estroma da medula óssea. Dessa forma, sua atuação não se resume no bloqueio do ATP ao sítio de ligação da proteína tirosino-quinase BCR-ABL. O fármaco também age bloqueando o sítio de ligação do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), que se encontra nos fibroblastos. Estas células, por sua vez, estão envolvidas na liberação de diversos elementos que compõem a matriz extracelular da medula óssea, como a reticulina, que se trata de uma forma de colágeno (tipo III). Dessa maneira, entende-se que o imatinibe possui efeito um anti-fibrótico independente sobre a medula óssea de pacientes portadores de LMC (HASSELBALCH *et al.*, 2004).

KLION *et al.*, 2004 observaram que após 4 a 8 semanas de tratamento com imatinibe, 100% dos pacientes que apresentavam alto grau de fibrose na medula do diagnóstico, reduziram essa graduação de forma considerável, sendo que um deles demonstrou normalização completa.

No presente estudo, entre os pacientes que não obtiveram resposta citogenética, 37,5% mantiveram um alto grau de fibrose. Os outros pacientes que também não responderam citogeneticamente, ou mantiveram o mesmo grau de reticulina entre a 1ª e a 2ª biópsia (+3 e +2) ou reduziram apenas um grau. Contrastando com o perfil reticulínico dos pacientes que atingiram a resposta citogenética, que apresentaram baixo grau de reticulina na 1ª biópsia ou reduziram o grau de forma significativa entre uma coleta e outra (antes e após tratamento com imatinibe). Estes resultados demonstram que existe um alto grau de correlação entre a fibrose e a resposta citogenética ($r = -0,919$, $P = 0,0271$ – 1ª BMO; $r = -0,917$, $P = 0,028$ – 2ª BMO).

GILES *et al.*, 2002 constataram que na LMC há uma desorganização dos elementos da matriz extracelular e sugeriram que as células leucêmicas são “mimetizadas” ou protegidas por estes elementos. No caso, a fibrose aumentada poderia dificultar a atuação do fármaco, não permitindo a apoptose das células cromossomo Ph positivas. Estas afirmações podem elucidar os resultados obtidos com a correlação descrita acima.

Com relação à vascularização, os resultados do presente estudo demonstraram que a maioria das amostras referentes ao diagnóstico, apresentou um aumento considerável (graus III e IV) no número de vasos em relação às amostras do grupo controle, que foram classificadas em grau I. O aumento da angiogênese é um fato em muitos tumores sólidos mas também tem sido observado em pacientes com doença hematológica, incluindo LMC (LUNDBERG *et al.*, 2000). A proteína quimera BCR/ABL induz expressão de VEGF através de uma via que envolve fosfatidil inositol 3 quinase (MAYERHOFER *et al.*, 2002). Em contrapartida, a análise dos vasos da 2ª BMO revelou que apenas 2 pacientes tiveram suas amostras graduadas em III, nenhum paciente obteve sua biópsia graduada em IV e a grande maioria concentrou-se no grau I. A redução no número de vasos após a terapia foi alcançada por 72,73%. Logo, percebeu-se que o tratamento proporcionou uma melhora significativa não apenas no estroma (fibrose), quanto também na microvascularização endotelial medular.

RUMPEL *et al.*, 2003, estudou a densidade dos vasos da medula óssea em 18 pacientes com LMC fase crônica comparando-os antes e após 3 e 6 meses de tratamento com Imatinibe, e verificou uma normalização dos mesmos, no entanto não houve correlação com a citogenética. Um estudo realizado por KVASNICKA *et al.*, 2004 investigou a atuação do mesilato de imatinib sobre a angiogênese da medula óssea, em comparação com a HU e o IFN- α . O trabalho relata que, *in vitro*, a expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) reduz após o tratamento com imatinib. Os resultados deste estudo mostraram que o imatinibe e a HU exerceram relevante impacto sobre a vascularização da medula óssea, pela redução no número de vasos. Ao contrário do IFN- α ou a combinação deste com a HU, que falharam na promoção da redução do número vasos. Além disso, o estudo sugeriu que a diminuição microvascularização apresenta associação com a reversão da mielofibrose. Os métodos utilizados para estimar a vascularização da medula óssea dos pacientes seguiram o mesmo modelo do presente estudo, que se constituiu na detecção da expressão de CD34, que está expresso nas células endoteliais.

A análise da vascularização de amostras de medula óssea (do diagnóstico e após o tratamento com mesilato de imatinibe) é justificada pelas evidências que mostram que esta microvascularização, juntamente com o microambiente hematopoiético são os principais

fatores envolvidos na migração, diferenciação e adesão das células progenitoras (HASSELBALCH, 2006).

Logo, estando a vascularização envolvida de diversas formas com a celularidade da medula óssea e comprovando-se que ela também se encontra alterada na leucemia mielóide crônica, entende-se que a mesma exerça papel importante tanto na evolução da doença, quanto na resposta terapêutica. E estendendo estas hipóteses, sugere-se a possibilidade de haver correlação com o prognóstico dos pacientes. Por isso, o presente estudo também se propôs a avaliar o grau de vascularização da medula óssea correlacionando-o com a resposta citogenética. Os resultados demonstraram uma alta correlação entre a vascularização da 1ª BMO e a resposta citogenética ($r = -0,964$; $P = 0,0092$), ou seja, quanto maior o número de vasos presentes na amostra, maior a possibilidade do paciente obter uma resposta citogenética. Uma correlação significativa também foi observada com a 2ª BMO ($r = 0,940$; $P = 0,060$).

Nossos resultados fortalecem a hipótese que o estroma dos pacientes com LMC apresenta alterações significativas e que o imatinibe é efetivo na normalização deste microambiente, demonstrando ainda, correlação com a estabilização hematológica e remissão citogenética. Provavelmente estas alterações apresentadas tanto no momento do diagnóstico, como após o tratamento com referido fármaco, estejam associadas ao prognóstico do paciente. Ou seja, quanto mais alterado o estroma, maior é a dificuldade de normalizá-lo durante o tratamento e pior é o prognóstico. Esses dados nos permitem ainda sugerir que o fármaco pode também ser efetivo em outras doenças mieloproliferativas, como na mielofibrose idiopática, que apresenta importantes alterações no estroma hematopoiético.

7- CONCLUSÕES

As características da população incluída no estudo - idade, sexo, tratamento prévio e achados laboratoriais - foram compatíveis com os dados da literatura, no que diz respeito a indivíduos portadores de LMC em fase crônica.

A sobrevida dos pacientes incluídos no estudo foi de 95,46%.

A resposta hematológica completa foi alcançada em tempo médio de 1,5 meses, sendo que 72,73% mantiveram esta resposta durante os 2 anos de acompanhamento.

A sobrevida livre de progressão da doença foi observada em 86,36% dos pacientes, durante os 24 meses de tratamento.

A resposta citogenética foi atingida em tempo médio de 8,78 meses, sendo alcançada por 63,64% dos pacientes. Logo, 36,36% se mostraram refratários primários.

As amostras de medula óssea do diagnóstico de todos os pacientes apresentaram-se hipercelulares. Após o tratamento, apenas 18,18% deles mantiveram suas amostras nestas condições. A série megacariocítica se apresentou hiperplasiada em 63,63% das amostras do diagnóstico.

A maioria dos pacientes (59,09%) apresentou um grau de fibrose elevado na primeira biópsia. Já após o tratamento, grande parte (72,73%) teve suas amostras normais com relação à fibrose.

Quanto à vascularização, 54,55% dos pacientes apresentaram alteração importante na primeira biópsia de medula (graus III e IV), sendo que 72,73% diminuíram o número de vasos após o tratamento. Na 2ª coleta, a grande maioria dos pacientes (90,91%) teve suas amostras graduadas em I e II.

A resposta citogenética apresentou um alto grau de correlação com a fibrose (1ª BMO → $r = -0,919$ e $P = 0,0271$; 2ª BMO → $r = -0,917$ e $P = 0,028$), demonstrando que quanto maior o grau de fibrose, menor a possibilidade de se atingir a resposta citogenética.

A vascularização também apresentou forte correlação com a resposta citogenética (1ª BMO → $r = -0,964$ e $P = 0,0092$; 2ª BMO → $r = -0,940$ e $P = 0,060$). Assim, da mesma forma que a fibrose, quanto maior o número de vasos, menor a possibilidade de a resposta citogenética ser alcançada.

Este estudo vem fortalecer a hipótese de que o estroma da medula óssea de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica apresenta alterações significativas, a ponto de interferirem na resposta terapêutica e terem relação direta com a sobrevida dos indivíduos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, N.C.; RICHARDS, S.M.; SHEPARD, P.C.A. UK Medical Research Council randomized, multicentre trial of interferon- α for chronic myeloid leukemia: Improved survival irrespective of cytogenetics response. *Lancet* 1995; 354: 1392-7.

ANJOS, A.R.; ALVAREZ-SILVA, M.; BORELLI, P. Interaction of leukemic cells with proteins of the extracellular matrix. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2004; 26 (3): 206-211.

BACCARINI, M.; ROSTI, G.; DE VIVO, A.; BONIFAZI, F.; RUSSO, D.; MARTINELLI, G.; TESTONI, N.; AMABILE, M.; FIACCHINI, M.; MONTEFUSCO, E.; SAGLIO, G.; TURA, S. A randomized study of interferon- α versus interferon- α and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 1527-34.

BACCARINI, M.; RUSSO, D.; ROSTI, G.; MARTINELLI, G. Interferon- α for chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology* 2003; 40:22-3.

BAIN, J.B. An overview of translocation-related oncogenesis in the chronic myeloid leukaemias. *Acta Haematologica* 2002; 107:57-63.

BARRET, J. Allogenic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology* 2003; 40:59-71.

BENELUX C.M.L. STUDY GROUP: Randomized study on hydroxyurea alone versus hydroxyurea combined with low-dose interferon- α 2b for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; 91: 2713-21.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Protocolo de Diretrizes Terapêuticas – Leucemia Mielóide Crônica do Adulto, 2001.

BUESO-RAMOS, C.E.; CORTES, J.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. GILES, F.; RIOS, M.B.; MEDEIROS, L.J.; KANTARJIAN, H. Imatinib mesylate reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2004; 101 (2): 332-6.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMAN, J. Imatinib (STI571, imatinib), a rationally developed target anticancer drug. *National Review Drug Discovery* 1: 493-501, 2002.

CAPDEVILLE, R.; SILBERMAN, S. Imatinib: a target clinical drug development. *Seminars in Hematology* 2003; 40:15-20.

CERVANTES, F. et al. Imatinib mesylate therapy of chronic phase chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients. *Haematologica* 2003; 88:1117-22.

CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. *American Journal of Medicine* 1996; 100:555-57.

CORTES, J.E.; GILES, F.; O'BRIEN, S.; THOMAS, D.; GARCIA-MANERO, G.; RIOS, M.B.; FADERL, S.; VERSTOVSEK, A.; FREIREICH, E.J.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α . *Blood* 2003; 102:83-6.

CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; GILES, F.; RIOS, M.B.; SHAN, J.; FADERL, S.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; WIERDA, W.; KANTARJIAN, H. Effects of age on prognosis with imatinib mesylate therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003; 98: 1105-13.

CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; GILES, F.; O'BRIEN, S.; RIOS, M.B.; SHAN, J.; GARCIA-MANERO, G.; FADERL, S.; THOMAS, D.; WIERDA, W.; FERRAJOLI, A.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic leukemia on mesylate therapy. *Blood* 2003.

DABBS, DAVID. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2^a ed. Pittsburgh: Elsevier, 2006.

DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247:824-30.

D'ANTONIO, J. Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin. J. Oncol. Nurs.* v. 9, n. 5, p. 535-538, 2005.

DE KLEIN, A.; VAN KESSEL, G. A.; GROSVELD, A. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Nature* 1982; 300:765-7.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N. The tyrosine kinase inhibitor CGP571148B selectively inhibitor the grow of BCR-ABL positive cells. *Blood* 1997; 90:3691-98.

DEININGER, M.W.N. Cytogenetics studies in patients on imatinib. *Seminars in Hematology* 2003; 40, 50-55.

DRUKER, B. J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E. Effects of selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2:561-66.

DRUKER, B.J.; et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology* 2001; 87-110.

DRUKER, B. J. Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology* 2001; 38:9-14.

DRUKER, B. J.; SAWYERS, C. L.; KANTARJIAN, H. Activity of specific inhibit of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crises of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *New England Journal of Medicine* 2001; 344:1038-42.

DRUKER, B. J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 2002; 344:1031-37.

DRUKER, B.J. et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Edu Program)* 2002; (1):111-133.

DRUKER, B.J. for the IRIS (International Randomized IFN vs STI571) Study Group. STI571 (Gleevec/Glivec, imatinib) versus interferon (IFN) + cytarabine as initial therapy for patients with CML: results of a randomized study. *Proc Am Soc Clin Onc* 2002; 21:25.

DRUKER, B. J. Imatinib as a paradigm of target therapies. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:239-45.

FARDEL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology* 1999;13:169-80.

FARDEL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Annals of Internal Medicine* 1999; 131:207-19.

FARDEL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z. The biology of chronic myeloid leucemia. *New England Journal of Medicine* 1999; 341:164-72.

FARDEL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M, O'BRIEN, S. New treatment approaches for chronic myelogenous leucemia. *Seminars in Oncology* 2000; 27:578-86.

FUNKE, V.A.M. et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: A study of 98 cases. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2005; 27: 159-165.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; LE COUTRE, P.; MOLOGNI, L. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL + leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Molecular Disease* 1997; 23:380-94.

GARDEMBAS, M.; ROUSSELOT, P; TULLIEZ, M.; VIGIER, M. ; BUZYN, A. ; RIGAL-HUGUET, F. ; LEGROS, L. ; MICHALLET, M; BERTHOU, C.; CHERON, N.; MALOISEL, F. ; MAHON, F.X. ; FACON, T. ; BERTHAUD, P.; GUILHOT, F. Results of a

prospective phase 2 study combining imatinib mesylate and cytarabine for the treatment of Philadelphia-positive patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 2003; 102: 4298-4305.

GEARY, C.G. The story of chronic myeloid leukemia. *British Journal of Haematology* 2000; 110:2-11.

GILES, F.J.; KEATING, A.; GOLDSTONE, A.H.; AVIVI, I.; WILLMAN, C.L.; KANTARJIAN, H.M. Acute myeloid leukemia. *American Society of Hematology*, 2002: 73-102.

GOLDMAN, J.M. Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukemia. *Lancet* 2000; 355:1031-32.

GOLDMAN, J.M.; DRUKER, B.J. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood* 2001; 98:2039-42.

GOLDMAN, J.M.; MELLO, J.V. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine* 2003; 349; 15, 1451-64.

GOLDMAN, J.M. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. *Experimental Hematology* 2004; 32:2-10.

GORDON, M.Y.; DAZZI, F.; MARLEY, S.B. Cell biology of CML cells. *Leukemia* 1999; 13 (sup 1): S65-S71.

GORRE, M. E.; MOHAMMED, M.; ELLWOOD, K.; HSU, N.; PAQUETTE, R.; RAO, P.N.; SAWYERS, C.H. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 21:1-10.

GRATWOHL, A.; HERMANS, J.; NIEDERWIESER, D. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. *Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation*. 1993; 12:509-16.

GUILHOT, F.; CHASTANG, C.; MICHALLET, M. Interferon alfa-2a combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* 337:223-29, 1997.

GUILHOT F. for the IRIS study group. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with imatinib (IM) therapy: update from the IRIS Study (abstract). *Blood* 2004; 104:10a.

GUIMARÃES, J.R.Q. e colaboradores. *Manual de Oncologia*. 2ed – São Paulo: BBS Editora, 2006.

HAHN, E.A.; GLENDENNING, G.A. Quality of life on imatinib. *Seminars in Hematology* 2003; 40:31-6.

HASFORD, J.; PFIRMANN, M.; HEHLAMNN, R.; ALLAN, N.C.; BACCARANI, M.; KLUIN-NELEMANS, J.C.; ALIMENA, G.; STEEGMANN, J.L.; ANSARI, H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90:850-58.

HASFORD, J.; PFIRMANN, M.; HEHLAMNN, R.; BACCARANI, M.; GUILHOT, F.; MAHON, F.X.; KLUIN-NELEMANS, J.C.; OHNISHI, K.; THALER, J.; STEEGMANN, J.L. Prognosis and prognostic factors for patients with chronic myeloid leukemia: nontransplant therapy. *Seminars in Hematology* 2003; 40:4-12.

HASSELBACH, H.C.; BJERRUM, O.W.; JENSEN, B.A.; CLAUSEN, N.T.; HANSEN, P.B.; BIRGENS, H.; THERKILDSEN, M. H.; RALFKIAER, E. Imatinib mesylate in idiopathic and postpolycythemic myelofibrosis. *Am J Hematol*; 74(4): 238-42, 2003.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; GERMAN CML STUDY GROUP. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood* 1993; 82:398-407.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J. Randomized comparison of interferon- α with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 84:4064-77.

HUGHES, T.P.; KAEDA, J.; BRANDFORD, S.; RUDZKI, Z.; HOCHHAUS, A.; HENSLEY, M. L.; GATHMANN, I.; BOLTON, A.E.; HOOMISSEN, I.; GOLDMAN, J. M. RADICH, J. Frequency of major molecular response to imatinib or interferon alpha plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 2003; 349; 15:1423-32.

HUNTLY, B.J.P.; REID, A.G; CAMPBELL, L.J.; TELFORD, N.; SHEPERD, P.; SZER, J.; PRINCE, M.; TURNER, P.; GRACE, C.; NACHEVA, E.P.; GREEN, A.R.; Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1732-38.

ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP ON CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: Long-term follow-up of the Italian trial of interferon- α versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998; 92: 1541-8.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; FELIX, M. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematologica* 2002; 107:76-94.

KAEDA, J.;CHASE, A.; GOLDMAN, J.M. Cytogenetics and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Acta Haematologica* 2002; 107:64-75.

KANTARJIAN, H.M.; KEATING, M.J.; ESTEY, E.H.; O'BRIEN, S.; PIERCE, S.; BERAN, M.; KOLLER, C.; FELDMAN, E.; TALPAZ, M. Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive myelogenous leukemia with interferon-alpha and low-dose cytarabine. *Journal of Clinical Oncology* 1992; 10:772-89.

KANTARJIAN, H.M. et al. Treatment of chronic myelogenous leukemia current status and investigational opinions. *Blood* 1996; 87:3069-3081.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E.; SMITH, T.L.; RIOS, M.B.; SHAN, J.; YANG, Y.; GILES, F.J.; THOMAS, D.A.; FARDEL, S.; GARCIA-MANERO, G.; JEHA, S.; WIERDA, W.; ISSA, J.P.J.; KORNBLAU, S.M.; KEATING, M.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R.; TALPAZ, M. Treatment of Philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research* 2002a; 8: 2167-76.

KANTARJIAN, H.M.; SAWYERS, C.; HOCCHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, I.C.; NIEDERWIESER, D.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R.; ZOELLNER, U.; TALPAZ, M.; DRUKER, B. Hematologic and cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* 2002; 346:645-52.

KANTARJIAN, H.M.; CORTES, J.E.; O'BRIEN, S.; GILES, F.J.; ALBITAR M.; RIOS, M.B. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood* 2002; 99: 3547-53.

KANTARJIAN, H.M.; CORTES, J.E.; O'BRIEN, S.; GILES, F.J.; GARCIA-MANERO, G.; FARDEL, S. THOMAS, D.; JEHA, S.; RIOS, M.B.; BOCHINSKI, K.; ARLINGHAUS, R.; TALPAZ, M. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetics responses. *Blood* 2003; 101:97-100.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S.; GILES, F.J.; RIOS, M.B.; WHITE, K.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KORNBLAU, S.; CORTES, J.E. Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003; 97:2225-28.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E.; SHAN, J.; GILES, F.; RIOS, M.B.; FARDEL, S.; WIERDA, W.; VERSTOVSEK, S.; KEATING, M.; FREIREICH, E.J.; TALPAZ, M. Complete cytogenetics and molecular responses to interferon- α -based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer* 2003; 15:1033-41.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E.; SHAN, J.; GILES, F.; GARCIA-MANERO, G.; VERSTOVSEK, S.; FARDEL, S.; RIOS, M.B.; TALPAZ, M. Análisis of the impact of imatinib mesylate therapy on the prognosis of patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia treated with interferon- α regimens for early chronic phase. *Cancer* 2003; 98:1430-37.

KANTARJIAN, H.M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.E.; GILES, F.; SHAN, J.; FARDEL, S.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KEATING, M.; TALPAZ, M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive myelogenous leukemia in the chronic phase. *Cancer* 2003; 98: 2636-42.

KLION, A.D.; ROBYN, J.; AKIN, C.; NOEL, P.; BROWN, M.; LAW, M.; METCALFE, D.D.; DUNBAR, C.; NUTMAN, T.B. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood* 2004; 103 (2): 473-478.

KVASNICKA, H.M.; THIELE, J.; STAIB, P.; SCHMITT-GRAEFF, A.; GRIESSHAMMER, M.; KLOSE, J.; ENGELS, K.; KRIENER, S. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood* 2004; 103 (9): 3549-3551.

LUNDBERG, L.G.; LERNER, R.; SUNDELIN, P.; ROGERS, R.; FOLKMAN, J.; PALMBLAD, J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J. Pathol.* 2000; 157: 15-19.

LYSENG-WILLIAMSON, K.; JARVIS, B. Imatinib. *Adis New Drug Profile* 2001; 61:1765-74.

MAILOSEL, F.; UETTWILLER, F.; LAPLACE, A.; LIOURE, B.; HERBRECHT, R.; MARK, M.; DUFOUR, P. Emergence of unusual cytogenetic abnormalities under interferon-alpha therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genetic and Cytogenetics* 1999; 113: 172-76.

MARKTEL, S.; MARIN, D.; FOOT, N.; SZYDLO, R.; MARCO, B.; KARADIMITRIS, A.; MELLO, V.A.S, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. *Haematologica* 2003; 88:260-7.

MAYERHOFER, M.; VALENT, P.; SPERR, W.R.; GRIFFIN, J.D.; SILLABER, C. BCR-ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor –1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood*. 2002; 100: 3767-3775.

MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLY, J.F. Chronic myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Edu Program)* 2003; 132-152.

MELLO, M.C.R. Avaliação da resposta clínica e citogenética em portadores de leucemia mielóide crônica, tratados com inibidor da tirosina quinase (imatinib). Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo, 2004.

MESA, R.A.; HANSON, C.A.; RAJKUMAR, S.V.; SCHROEDER, G.; TEFFERI, A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2000; 96 (10): 3374-3380.

MICHALANY, JORGE. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: EPU, 1980.

MOHAMED, A.N.; PEMBERTON, AP.; ZONDER, J.; SCHIFFER, C.A. The effect of imatinib mesylate on patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal aberrations. *Clinical Cancer Research*, 9:1333-1337, 2003.

NOWEL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132:1497.

NOWEL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome studies human leukemia. *Journal of National Cancer Institute* 1961; 27: 1013-34.

O'DAWYER, M.E.; DRUKER, B. Status of bcr-abl tyrosine kinase inhibitor in chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Oncology* 2000; 12:594-97.

O'BRIEN, S.G.; et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase myeloid leukemia. *New England Journal Medicine* 2003; 348: 994-1004.

O'DAWYER, M.E.; MAURO, M.J.; KURILIK, G.; MORI, M.; BALLEISEN, S.; OLSON, S.; MAGENIS, E.; CAPDEVILLE, R.; DRUKER, B.J. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood* 2002; 100:1628-33.

O'DAWYER, M.E.; MAURO, M.J.; BLASDEL, C.; FARNSWORTH, M.; KURILIK, G.; HSIEH, Y.C.; MORI, M.; DRUKER, B.J. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood* 2004; 103:451-56.

OHNISHI, K.; OHNO R.; TOMONAGA M. A randomized trial comparing interferon- α with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 1995; 86: 906-16.

OSAROGIAGBON, U.R.; MC-GLAVE, P.B. Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Hematology* 1999; 6:241-46.

OTTMANN, O.G.; DRUKER, B.J.; SAWYERS, C.L. A phase II study of imatinib in patients with relapse or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* 2002; 100:1965-71.

OZER, H.; GEORGE, S.L.; SCHIFFER, C.A. Prolonged subcutaneous administration of recombinant alpha2b interferon with previously untreated Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myelogenous leukemia: effect on remission duration and survival. *Cancer and Leukemia Group B Study 8583. Blood* 1993; 82:2975-84.

PASQUINI, R.; ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P. Hematologia – Fundamentos e Práticas. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

PASTERNAK, G.; HOCHLAUS, A.; SCHUTHEIS, B. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1998; 124:643-60.

PEGGS, K. MACKINNON, S. Imatinib mesylate- the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 2003; 33:1048-50.

ROSTI, G.; TRABACCHI, E.; BONIFASI, F.; DE VIVO, A.; BASSI, S.; TURA, S. Interferon- α e Ara-C. In: CARELLA, A.M.; DALEY, G.Q.; EAVES, C.J.; GOLDMAN, J.M.; HEHLMANN, R. editores. *Chronic myeloid leukemia biology and treatment*. United Kingdom: Martin Dunitz; 2001. p. 191-204.

ROTHBERG, P.G. Imatinib. Resisting the resistance. *Leukemia research* 2003; 27:977-78.

ROWLEY, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giensa stainig. *Nature* 1973; 243:290-93.

RUMPEL, et al. Imatinib normalizes bone marrow vascularity in patients with chronic myeloid leukemia in first chronic phase. *Blood* 101: 11: 4641-4643.

SATTLER, M.; GRIFFIN, J.D. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Seminars in Hematology* 2003; 40:4-10.

SAVAGE, D.G.; ANTMAN, K.H. Imatinib- a new oral target therapy. *New England Journal of Medicine* 2002; 346:683-93.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 1999; 340:1330-38.

SILVER, R.T. Chronic myeloid leukemia. *Hematology Oncology Clinics of North America* 2003; 17:1159-73.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARINI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G.A.; ROBERTSON, J.E. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63:789-99.

SUREDA, A.; CARRASCO M.; DE MIGUEL, M.; MARTINEZ, J.A.; CONDE, E.; SANZ, M.A.; DIAZ-MEDIAVILLA, J.; SIERRA, J. Imatinib mesylate as treatment for blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Leukemia Research* 1988; 12: 453-58.

TALPAZ, M. Interferon-alpha-based treatment of chronic myeloid leukemia and implications of signal transduction inhibition. *Seminars in Hematology* 2001;38:22-27.

TIPPING, A.J., MAHON, F.X.; LAGARDE, V.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571 – resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 2001; 98:3864-67.

WILLIAMS et al. *Manual of Hematology*. 7^a ed. – São Paulo: McGraw-Hill Companies, 2006.