

Resumo de Tese / Thesis

## Monitoramento molecular de pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de imatinib através da técnica de PCR quantitativo em tempo real

### *Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib using real time PCR*

Melissa P. Machado

Orientadora: Katia B. B. Pagnano

#### Resumo

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mielo-proliferativa caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultado da fusão do gene *abl* e do gene *bcr* cujo produto é uma proteína de atividade de tirosina quinase, inibida pelo imatinibe. O imatinibe é hoje o tratamento de primeira linha da LMC, e o monitoramento molecular dos transcritos BCR-ABL é fundamental no acompanhamento dos pacientes e na detecção precoce da perda de resposta ao tratamento. O objetivo deste trabalho foi padronizar o método de PCR quantitativo (RQ-PCR) para o monitoramento molecular dos transcritos BCR-ABL de pacientes com LMC em tratamento com imatinibe. Foi utilizado o método Taqman e, como gene controle, o ABL. Foi criada uma curva *standard* com diluições de 10<sup>8</sup> a 10<sup>3</sup> de um plasmídeo com os transcritos *b3a2* e *b2a2* e com ABL. As quantificações foram feitas em duplicatas. O *threshold* utilizado foi de 0,05 e a eficiência foi determinada em 99%. Os resultados foram reportados como uma relação entre BCR-ABL/ABL. Para o valor de referência basal do laboratório foram analisadas trinta amostras de pacientes ao diagnóstico, e calculada a mediana, sendo esse valor de 83,66%. Resposta molecular maior (RMM) foi definida como redução dos transcritos BCR-ABL em 3 log a partir do valor basal do laboratório. Os valores foram ajustados à escala internacional, usando-se um fator de conversão de 1.19. Após a padronização do método, foram avaliados sessenta pacientes com LMC, cujas amostras foram coletadas ao diagnóstico e a cada três meses. Respostas hematológica, citogenética maior e citogenética completa foram obtidas em 57 (95%), 45 (75%) e 38 (63%) dos pacientes, respectivamente. Vinte e quatro de sessenta pacientes atingiram a RMM (40%), numa mediana de 8,5 meses. A sobrevida global foi superior nos pacientes com RCC (100%) *versus* pacientes sem RCC (77%) em 48 meses. Pacientes com RCC e com RMM tiveram uma sobrevida livre de eventos superior em relação aos pacientes que não atingiram

os dois tipos de resposta (100% *versus* 60% respectivamente) ( $p=0.007$ ). Em resumo, neste estudo demonstramos o impacto prognóstico em atingir RCC e RMM e também a importância do acompanhamento molecular nos pacientes com LMC.

**Palavras-chave:** LMC; mesilato de imatinibe; PCR real-time.

#### Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph), the result of a *bcr-abl* gene fusion, the product of which is a protein with kinase activity that can be inhibited by imatinib. Imatinib is currently the first-line treatment of CML and molecular monitoring of BCR-ABL transcripts is essential to detect early loss of response to treatment. The aim of this study was to standardize the quantitative PCR (RQ-PCR) method for molecular monitoring of BCR-ABL transcripts in patients with CML treated with imatinib. Peripheral blood samples from chronic phase patients were collected for RQ-PCR at diagnosis and every three months after treatment with imatinib. The Taqman method was used for RQ-PCR. A standard curve was constructed with dilutions of 10<sup>8</sup> to 10<sup>3</sup> of a plasmid with the *b3a2* and *b2a2* transcripts and the ABL gene being used as the control gene. Duplicate runs were made. The threshold used was 0.05 and the efficiency was determined at 99%. The results are reported as a BCR-ABL/ABL ratio (%). For the reference baseline value of the laboratory, 30 samples from patients at diagnosis were quantified and the median value was calculated at 83.66%. Major molecular response (MMR) was considered a three log reduction from the baseline value. MMR values were adjusted to international scale, using a conversion factor of 1.19. After standardization, the BCR-ABL levels of 60 chronic phase CML

Dissertação apresentada ao Centro de Hematologia e Hemoterapia – Universidade Estadual de Campinas

**Correspondência:** Katia B. Barbosa Pagnano  
Hemocentro-Unicamp  
Rua Carlos Chagas 480  
13083-970 – Campinas-SP – Brasil  
E-mail: kborgia@unicamp.br

patients treated with imatinib were measured at diagnosis and then at every three months. Hematological, major cytogenetic and complete cytogenetic responses were achieved in 57 (95%), 45 (75%) and 38 (63%) patients, respectively. Twenty-four out of 60 patients achieved a MMR (40%) in a median time of 8.5 months. Overall survival was higher for patients with CCR (100%) versus patients with no CCR (77% -  $p=0.01$ ) at 48 months. Patients with CCR and with MMR had a higher event free-survival rate compared to patients with CCR and no MMR ( $p=0.007$ ). In conclusion, we demonstrated the prognostic impact of achieving CCR and a MMR and also the importance of molecular monitoring in the follow-up of CML patients.

**Key words:** CML; imatinib; real-time PCR

---

Avaliação: A Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH) publica os resumos e abstracts de teses da área apresentados em entidades que tenham programas de pós-graduação reconhecidos pelo MEC/Capes e considera a obtenção do título suficiente para sua publicação na forma como se propõe a seção.

Suporte Financeiro: Capes, Novartis

Recebido: 29/09/2009

Aceito: 16/10/2009