

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

GUSTAVO TREVIZANI STELZER

**CARACTERIZAÇÃO DE DELEÇÕES E INSERÇÕES NO DOMÍNIO
TIROSINA QUINASE DO GENE *BCR-ABL1* EM PACIENTES COM LMC
EM TRATAMENTO COM INIBIDORES TIROSINA QUINASE**

Rio de janeiro - RJ

2018

GUSTAVO TREVIZANI STELZER

**CARACTERIZAÇÃO DE DELEÇÕES E INSERÇÕES NO DOMÍNIO
TIROSINA QUINASE DO GENE *BCR-ABL1* EM PACIENTES COM LMC
EM TRATAMENTO COM INIBIDORES TIROSINA QUINASE**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- UNIRIO como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra Luciana Mayumi Gutiyama de Freitas

Co-orientadora: Dra Simone Teixeira Bonecker dos Santos

Orientadora acadêmica: Dra Marcia Sarpa de Campos Mello

Rio de janeiro - RJ

2018

GUSTAVO TREVIZANI STELZER

**CARACTERIZAÇÃO DE DELEÇÕES E INSERÇÕES NO DOMÍNIO TIROSINA
QUINASE DO GENE *BCR-ABL1* EM PACIENTES COM LMC EM TRATAMENTO
COM INIBIDORES TIROSINA QUINASE**

BANCA EXAMINADORA:

Prof.a Dr.a Marcia Sarpa de Campos Mello
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Instituto Nacional do Câncer

Dr.a Bárbara Rodrigues Geraldino
Coordenação de Prevenção e Vigilância
Instituto Nacional do Câncer

PhD. Sérgio Menezes Amaro Filho
Departamento de Genética
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro
2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Transplante de Medula Óssea – Instituto Nacional do Câncer – sob orientação da Dra. Luciana Mayumi Gutiyama de Freitas e coorientação da Dra. Simone Teixeira Bonecker dos Santos e contou com o apoio financeiro do Ministério da saúde/INCA, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Apesar da leucemia mielóide crônica (LMC) ter um dos casos de maior sucesso terapêutico na oncologia, a resistência ao tratamento com inibidores tirosina quinase ainda é um problema de relevância clínica, cerca de 20 a 30% dos pacientes não obterão respostas esperadas ao medicamento. Dentre os mecanismos de resistência já descritos, as mutações no domínio tirosina quinase do gene quimérico *BCR-ABL1* (DQ) representam o mecanismo mais relevante – estudos demonstraram que 40 a 80% dos pacientes resistentes apresentam alguma modificação na sequência desse domínio. Além de mutações, foi observada uma alta ocorrência de deleções e inserções no DQ de pacientes não-respondedores. Uma das principais deleções observadas é a deleção do éxon 7, cuja frequência é de aproximadamente 30%; outra modificação bastante frequente (62% nos pacientes em fase crônica e 21% de pacientes na crise blástica) é a inserção de 35 pb entre os exons 8 e 9 (INS35). No entanto, ao contrário das mutações pontuais, o valor prognóstico na resposta dos pacientes ao tratamento com inibidor tirosina quinase (ITK) destas alterações ainda não é consenso na literatura. Neste estudo foram analisados sequenciamentos por *Sanger* de amostras de pacientes de LMC durante ao tratamento, o diagnóstico e de indivíduos saudáveis. Foi observado que nos grupos de melhor resposta ao inibidor e em indivíduos saudáveis a frequência de aparecimento dessas variantes era menor do que em pacientes com resistência ao tratamento. A presença da INS35 e deleção do éxon 7 no grupo de indivíduos saudáveis evidencia que essas alterações não são exclusivas da LMC e tratam-se, provavelmente, de isoformas variantes de splicing alternativo. Entretanto, foi constatado que a deleção do éxon 7 está associada a níveis maiores de transcritos *BCR-ABL1*, mas intrigantemente, esta deleção não está associada à categoria de falha ao inibidor, ao contrário da INS35 que apresentou uma frequência estatisticamente significativa em pacientes em falha. Ao diagnóstico, pacientes respondedores tardios obtiveram maior frequência da deleção, corroborando com a hipótese de que essa alteração pode estar associada a uma demora a atingir resposta satisfatória à terapia.

Palavras chaves: *BCR-ABL1*, LMC, splicing alternativo, inserção, deleção.

ABSTRACT

Although chronic myelogenous leukemia (CML) has of the most successful therapeutic cases in oncology, resistance to treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI) remains a relevant clinical problem, because 20% to 30% of those patients will not get the expected responses to the drug treatment. Among the mechanisms of resistance already described, mutations in the tyrosine kinase domain (KD) of the chimeric *BCR-ABL1* gene represent the most relevant mechanism - studies have shown that 40 to 80% of resistant patients have at least one modification in the sequence of this domain. In addition to mutations, a high occurrence of splicing variants such as deletions and insertions in the DK of non-responders was observed. One of the main deletions observed is the deletion of exon 7, whose frequency is approximately 30%; Another frequent change (62% in patients with chronic phase and 21% of patients in the blast crisis) is the insertion of 35 bp between exons 8 and 9 (INS35). However, unlike the point mutations, the prognostic value of these variants in the patients' response to treatment with tyrosine quinase inhibitors is not yet a consensus in the literature. In this study, samples from CML patients during treatment, diagnosis and healthy individuals were analyzed by Sanger sequencing. It was observed that in the groups with the best response to the inhibitor and in healthy individuals the frequency of appearance of these variants was lower than in patients with resistance to treatment. The presence of INS35 and deletion of exon 7 in the group of healthy individuals shows that these changes are not exclusive to CML and are probably variant isoforms of alternative splicing. However, it has been found that the deletion of exon 7 is associated with higher levels of BCR-ABL1 transcripts, but intriguingly, this deletion is not associated with the category of inhibitor failure, unlike the INS35 that presented a statistically significant frequency in patients in failure. At diagnosis, late responders had a higher frequency of deletion, corroborating the hypothesis that this alteration may be associated with a delay in achieving a satisfactory response to the inhibitor treatment.

Key-words: BCR-ABL1, CML, alternative splicing, insertion, deletion.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer.....	15
1.2 Leucemia.....	16
1.3 Leucemia Mielóide Crônica.....	17
1.3.1 Tratamento da LMC.....	18
1.3.2 Isoformas variantes de BCR-ABL1.....	19
1.4 JUSTIFICATIVA.....	21
1.5 OBJETIVOS.....	22
1.5.1 Objetivo geral.....	22
1.5.2 Objetivos específicos.....	22
2. DESENVOLVIMENTO	23
2.1 METODOLOGIA.....	23
2.1.1 Pacientes.....	23
2.1.2 Amostras.....	23
2.1.3 Extração do <i>RNA</i> e síntese do <i>cDNA</i>	24
2.1.4 Sequenciamento direto.....	24
2.1.4.1 <i>PCR</i> para amplificação do DQ.....	24
2.1.4.2 Separação de bandas.....	25
2.1.4.3 Purificação de produto de <i>PCR</i>	25
2.1.4.4 Reação de sequenciamento.....	26
2.1.5 Padronização da reação de sequenciamento.....	26
2.1.5.1 Padronização de quantidade de amostra por reação de sequenciamento.....	26
2.1.5.2 Padronização de quantidade de <i>Big Dye</i> por reação de sequenciamento.....	27
2.1.6 Análise estatística.....	27

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
2.2.1 Análise retrospectiva.....	28
2.2.2 Análise prospectiva.....	31
2.2.2.1 Caracterização dos pacientes.....	31
2.2.2.2 Excisão de bandas	33
2.2.2.3 Padronização da reação de sequenciamento.....	34
2.2.2.3.1 Padronização de quantidades de amostra por reação de sequenciamento.....	34
2.2.2.3.2 Padronização de quantidade de <i>Big Dye</i> por reação de sequenciamento.....	37
2.2.2.4 Análise dos sequenciamentos relacionados à resposta ao ITK.....	39
2.2.2.5 Distribuição das alterações de acordo com o ITK em uso.....	42
2.2.2.6 Relação entre níveis de transcritos BCR-ABL1 ^{EI} (escala internacional) e INS35 e $\Delta 7$	44
2.2.2.7 Comparação entre a relação de níveis de transcritos BCR-ABL1 ^{EI} nos grupos com e sem $\Delta 7$	48
2.2.2.8 Comparação entre a relação de níveis de transcritos BCR-ABL1 ^{EI} nos grupos com e sem INS35.....	49
2.2.2.9 Resultado do sequenciamento de amostras ao diagnóstico.....	50
3. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da INS35 no gene <i>BCR-ABL1</i>	20
Figura 2: Esquema da deleção completa do éxon 7 no gene <i>BCR-ABL1</i>	21
Figura 3: Gráfico normalizado dos resultados dos eletroferogramas de amostras encaminhadas para sequenciamento de rotina no Laboratório de Biologia Molecular (CEMO).....	30
Figura 4: Eletroferograma da região <i>BCR-ABL1</i> dos transcritos sequenciados....	31
Figura 5: Exemplos de resultados de <i>qPCR</i> de amostras sequenciais de pacientes acompanhados pelo Laboratório de Biologia Molecular (CEMO).....	32
Figura 6: Exemplo de produtos de PCR para amplificação domínio quinase do gene ABL de pacientes com LMC. Produtos de amplificação por <i>PCR</i> do DQ separados por eletroforese em um gel de agarose 2% em TAE corado com brometo de etídio sob luz UV.....	34
Figura 7: Eletroferograma completo feito a partir de sequenciamento de produto com quantificação de 2 ng/ μ L com <i>primer</i> F1.....	35
Figura 8: Zoom de eletroferograma feito a partir de sequenciamento de produto com quantificação de 2 ng/ μ L com <i>primer</i> F1.....	36
Figura 9: Eletroferograma completo feito a partir de sequenciamento de produto com quantificação de 24 ng/ μ L com <i>primer</i> F1.....	36
Figura 10: Zoom de eletroferograma feito a partir de sequenciamento de produto com quantificação de 24 ng/ μ L com <i>primer</i> F1.....	37
Figura 11: Eletroferogramas de uma mesma amostra com diferentes quantidades de <i>Big Dye</i>	39

Figura 12: Esquema de distribuição dos primers ao longo do DQ. Eletroferograma representando o domínio quinase (DQ) do gene <i>ABL1</i> e a sequência amplificada por cada um dos quatro primers.....	39
Figura 13: Gráfico normalizado dos resultados dos eletroferogramas de todas as amostras analisadas.....	41
Figura 14: Frequência total observada da presença de $\Delta 7$ e INS35 associadas ou não à mutação pontual em porcentagem de amostras nos diferentes grupos.....	42
Figura 15: Gráfico normalizado da relação entre porcentagem de alterações observadas nas análises dos eletroferogramas e o ITK utilizado durante o tratamento.....	44
Figura 16: Distribuição de mutações, INS35 e $\Delta 7$ ao longo do tratamento de 25 pacientes, de acordo com o número de transcritos BCR-ABL1 ^{EI}	47
Figura 17: Box plot relacionando a porcentagem de transcritos BCR-ABL1 ^{EI} com resultado positivo para $\Delta 7$ associada ou não à outras alterações e/ou mutação pontual.....	48
Figura 18: Box plot relacionando a porcentagem de transcritos BCR-ABL1 ^{EI} com resultado positivo para INS35 associada ou não à outras alterações e/ou mutação pontual.....	50
Figura 19: Gráfico normalizado de amostras de pacientes ao diagnóstico.....	52
Figura 20: Gráfico normalizado de amostras de pacientes ao diagnóstico após redistribuição do grupo de resistentes secundários.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de resposta aos pacientes com LMC em uso de ITK em primeira linha de tratamento.....	19
Tabela 2: Descrição da coorte de pacientes analisados.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

ABL1 – Protooncogene *Abelson1*

A-loop – sítio de ativação

AMN – Nilotinibe

ATP – Adenosina trifosfato

BCR – gene *Breakpoint Cluster Region*

BCR-ABL1 – gene gerado a partir da translocação entre *BCR* e *ABL1*

BCR-ABL1 - oncoproteína quimérica *BCR-ABL1*

BCR-ABL1^{EI} – níveis de transcritos BCR-ABL1 na escala internacional

BMS – Dasatinibe

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEMO - Centro de Transplante de Medula Óssea

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatos

DQ – Domínio quinase

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INS35 – inserção de 35 pares de bases

ITK – Inibidor tirosina-quinase

LMC – Leucemia Mielóide Crônica

NCI – *National Cancer Institute*

ng - Nanograma

NI – não informado

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb - Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

P-loop – sítio de ligação do fosfato

pmol - picomol

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RBCL - *Red Blood Cell Lysing Buffer*

rfu - unidades relativas de fluorescência

RMM – Resposta Molecular Maior

RNA – Ácido Ribonucleico

SP - Sangue Periférico

STI – Imatinibe

TAE - Tris-Acetato-EDTA

Two-way ANOVA - Análise de Variância bidirecional

UV – Ultra-violeta

WT – *wild type*

$\Delta 7$ – deleção completa do éxon 7

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um nome genérico dado para células com alterações genéticas e/ou epigenéticas que causam transformações malignas induzidas por fatores externos ou internos (INCA, 2018; Kumar et al., 2013). Compreende um grupo de mais de 100 doenças já catalogadas que tem como principal característica em comum alterações no *DNA* que conferem crescimento anormal e aberrante às células alteradas (OMS, 2018; INCA, 2018).

Atualmente, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo e, em 2018, estima-se que será responsável por 9,6 milhões de mortes ao redor do mundo (OMS, 2018). No Brasil, essa estimativa é de 582.590 novos casos para os anos de 2018 e 2019, segundo estimativas do INCA.

Essas células alteradas normalmente são agressivas devido à autossuficiência nos sinais de crescimento, potencial replicativo ilimitado, capacidade de invadir tecidos locais e de se disseminar, evadir supressores de crescimento, resistir aos sistemas morte celular e capacidade de estimular angiogênese (Hanahan et al., 2011). Essas disfunções características do câncer são provocadas por alterações em genes específicos presentes nas células que regulam a expressão ou função celular fundamental (Hanahan et al., 2011), responsáveis pela transformação maligna das células (INCA, 2018). Diversos tipos de genes podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do câncer quando alterados, como genes supressores de tumor, genes que regulam apoptose celular, genes envolvidos no reparo de DNA e protooncogenes (genes que quando sofrem alterações se tornam oncogenes, causando a transformação maligna dos cânceres) (Hanahan et al., 2011). O câncer é um processo clonal, ou seja, passam para as células filhas durante o processo de divisão celular, fazendo com que a alteração genética que causa o câncer se mantenha nas gerações posteriores (Kumar et al., 2013)

As células neoplásicas podem formar massas de aglomerados celulares dando origem a tumores sólidos, como sarcomas, carcinomas e linfomas; ou não, como

é o caso das leucemias, doença alvo deste estudo, que é uma neoplasia do sangue que normalmente não está associada à tumores sólidos (NCI, 2018).

1.2 Leucemia

Leucemias são um tipo de câncer que tem início em tecidos hematopoiéticos, que realizam a síntese das células sanguíneas, tais como a medula óssea (Grove et al., 2009; NCI, 2018). Com a alteração desses tecidos, as células geradas por eles se tornam neoplásicas, acarretando as complicações e sintomas característicos da doença (Grove et al., 2009). Como a medula óssea é responsável pela produção de diversas células, os sintomas variam de acordo com a ausência dessas células na corrente sanguínea, como anemia, leucopenia e trombocitopenia, dependendo da linhagem celular afetada (Grove et al., 2009).

As leucemias podem ser divididas de acordo com a velocidade da progressão da doença e de acordo com o tipo celular afetado (NCI, 2018).

Tanto as leucemias agudas como crônicas se desenvolvem a partir de células tronco hematopoiéticas. No caso das agudas, as transformações provocadas nessas células afetam sua maturação, impedindo seu amadurecimento e estimulando a proliferação celular, levando ao acúmulo de blastos na medula óssea. (Grove et al., 2009).

Já nas leucemias crônicas, apesar dessas alterações também ocorrerem em células tronco hematopoiéticas pluripotentes, a maturação celular não é afetada mas ocorre divisão indiscriminada, assim como nas agudas (Grove et al., 2009). Essas células alteradas se dividem mais devagar e, portanto, leucemias crônicas geralmente possuem progressão mais lenta. Dessa maneira, há o acúmulo de células maduras (principal característica que diferencia esses dois subtipos) que se dividem mais lentamente e, portanto, geralmente possuem progressão mais lenta (Grove et al., 2009).

Leucemias linfóides (também chamadas de linfocítica ou linfoblástica) se desenvolvem a partir de células linfóides (linfócitos B e T) e, de uma maneira geral,

aumenta a contagem de linfócitos no sangue (Grove et al., 2009). Pode ser dividida em aguda ou crônica (Leucemia Linfóide Aguda ou Leucemia Linfóide Crônica, respectivamente) (NCI, 2018).

Leucemias mielóides (também conhecidas como mieloblásticas), como o nome sugere, derivam de células tronco hematopoéticas comprometidas com a linhagem mielóide que dariam origem a neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos. A doença pode ser aguda (Leucemia Mielóide Aguda) ou crônica (Leucemia Mielóide Crônica) (Kumar et al., 2013). Este estudo teve como alvo a Leucemia Mielóide Crônica.

1.3 Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença com maior prevalência na população masculina, na proporção de cerca de 2:1 em relação à feminina, sendo também mais prevalente em pacientes acima de 60 anos (Radich et al., 2018). Sua incidência anual é de 1 a 2 casos em 100 mil adultos e, na maioria dos casos, os pacientes são diagnosticados durante a fase crônica da doença (Jabbour et al., 2017).

É uma neoplasia mieloproliferativa crônica decorrente da expansão clonal de precursores hematopoiéticos primitivos, caracterizada pela presença de um cromossomo específico, denominado cromossomo Filadélfia, nos blastos leucêmicos do paciente (Gaillard et al., 2010a; Gruber et al., 2012; Lee et al., 2008; Nowell et al., 1960; Strhakova et al., 2011). O cromossomo Filadélfia é proveniente de uma translocação recíproca que justapõe o protooncogene *ABL1*, do cromossomo 9, e a região do gene *BCR* do cromossomo 22 do genoma humano (t(9;22)(q34;q11)) (Gaillard et al., 2010; Lee et al., 2008). Esse gene de fusão, *BCR-ABL1*, codifica uma oncoproteína quimérica, BCR-ABL1, que apresenta o domínio tirosina-quinase constitutivamente ativado e, sendo assim, o diagnóstico e monitoramento da LMC é realizado através da detecção dos transcritos de *BCR-ABL1*.

Essa atividade tirosina-quinase exacerbada causa uma reprogramação na célula e, dessa forma, provoca aumento do crescimento celular, inibição da apoptose,

alterações da adesão celular, independência de fator de crescimento, falha nos mecanismos de controle celular e diminuição da diferenciação, causando hiperplasia mielóide e os sintomas típicos da fase crônica da doença (Chereda et. al., 2015).

Sem tratamento, a LMC progride para fase aguda, que precede a crise blástica, considerada a forma mais grave da doença (Chereda et. al., 2015).

1.3.1 Tratamento da LMC

Atualmente, o Imatinibe (STI) (Glivec, Novartis), um inibidor tirosina quinase (ITK), é utilizado como primeira linha de tratamento da LMC. O Imatinibe compete pelo sítio de ligação do ATP no domínio quinase da proteína BCR-ABL1 . A ligação deste à proteína inibe sua capacidade de fosforilação, reduzindo assim sua atividade e, conseqüentemente, a carga tumoral no paciente (Gaillard et al., 2010; Lee et al., 2008).

Além do Imatinibe (de primeira geração), o Dasatinibe (BMS) (Sprycel, Bristol-Myers Squibb) e o Nilotinibe (AMN) (Tasigna, Novartis) (ambos de segunda geração), são autorizados para uso no Brasil para pacientes que não responderam ao Imatinibe (Fava et al., 2015) - cerca de 20 % dos pacientes apresentam resistência ao Imatinibe (Druker, 2006); enquanto o inibidor de terceira geração, o Ponatinibe está sendo testado em ensaios clínicos para uso no Brasil. O Bosutinibe, ainda não disponível no Brasil, é indicado para pacientes resistentes ao tratamento com Imatinibe (Abbas, et al., 2016).

Apesar do sucesso terapêutico dos ITKs, há pacientes que apresentam resposta subótima ao tratamento, que não caracterizam falha, mas merecem maior atenção com um acompanhamento em menores intervalos ou nunca apresentaram resposta ou perderam a resposta – de acordo com as recomendações da *European Leukemia Net* 2013 (Baccarani et al., 2013). Essa estratificação é feita através da relação entre o tempo decorrido após o início da administração do ITK atual e a conquista dos marcos de resposta molecular e citogenética, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de resposta aos pacientes com LMC em uso de ITK em primeira linha de tratamento. NA: Não avaliado, ACC: Anormalidades Cromossômicas Clonais, Ph+: Cromossomo Philadelphia positivo, RCC: Resposta Citogenética Completa, RCP: Resposta Citogenética Parcial, RMM: Resposta Molecular Maior e RHC: Resposta Hematológica Completa.

Tempo	Resposta ótima	Atenção	Falha no tratamento
Linha de base	NA	Alto risco ou ACC/Ph+, rota principal	NA
3 meses	BCR/ABL1 ≤ 10 % ou Ph+ ≤ 35 %	BCR-ABL1 > 10 % ou Ph + 36–95 %	Não RHC ou Ph+ >95 %
6 meses	BCR-ABL1 ≤ 1 % ou Ph + 0 (RCC)	BCR-ABL1 1–10 % ou Ph + 1–35 % (RCP)	BCR-ABL1 > 10 % ou Ph+ >35 %
12 meses	BCR-ABL1 ≤ 0.1 % (RMM)	BCR-ABL1 0.1–1 %	BCR-ABL1 > 1 % ou Ph + ≥1 %

Fonte: Bacarani et al. 2013

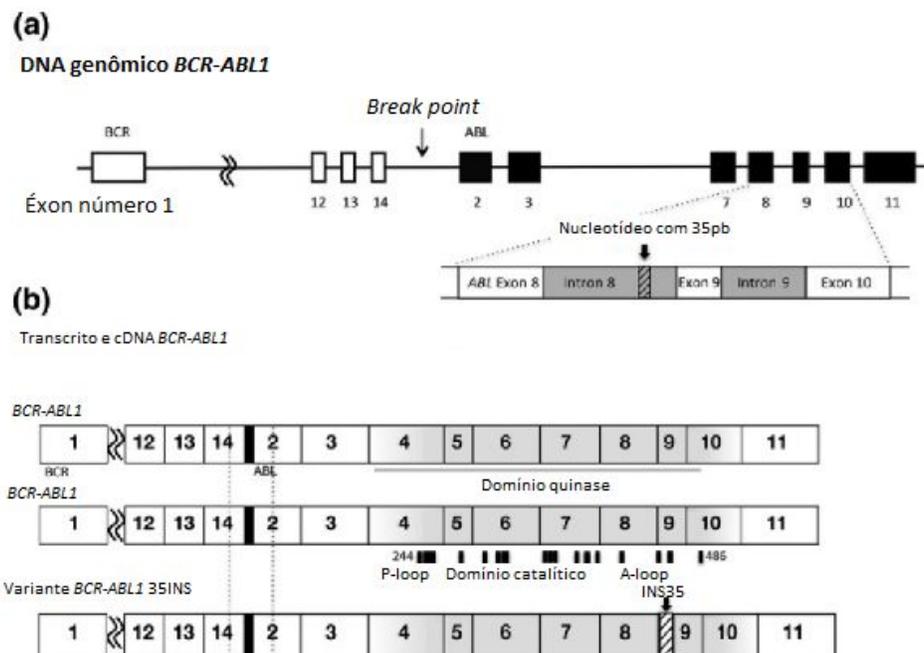
1.3.2 Isoformas variantes de BCR-ABL1

Tem sido observado que entre 20 e 30% dos pacientes desenvolvem resistência aos ITKs devido à mutações adicionais em *BCR-ABL1* (Gruber et al., 2012). Essas mutações, em geral, são do tipo missense, e consistem na troca de um nucleotídeo por outro na sequência genética do *BCR-ABL1* codificando um outro aminoácido na sequência proteica, impedindo a ligação do inibidor, sendo esta a principal causa de falha ao tratamento (Gruber et al., 2012; Strhakova et al., 2011).

Diferentes isoformas da proteína BCR-ABL1 nos pacientes com LMC já foram descritas na literatura, mas não se sabe se elas estão relacionadas com a ineficiência do tratamento. Foram relatadas diversas isoformas variantes de *splicing* do gene *ABL1*. Dentre as regiões onde é frequente o *splicing* alternativo, destacam-se os éxons de 4 à 9 (Gaillard et al., 2010; Gruber et al., 2012; Lee et al., 2008). Uma das variantes mais encontradas nos pacientes com LMC é a retenção de 35 pb do íntron 8 entre os éxons 8 e 9 no mRNA (INS35) (Figura 1). Na cadeia proteica, essa modificação resulta na inserção de 11 aminoácidos seguida por um códon de parada precoce, que impede a tradução dos 653 aminoácidos no C-terminal seguintes. Essa

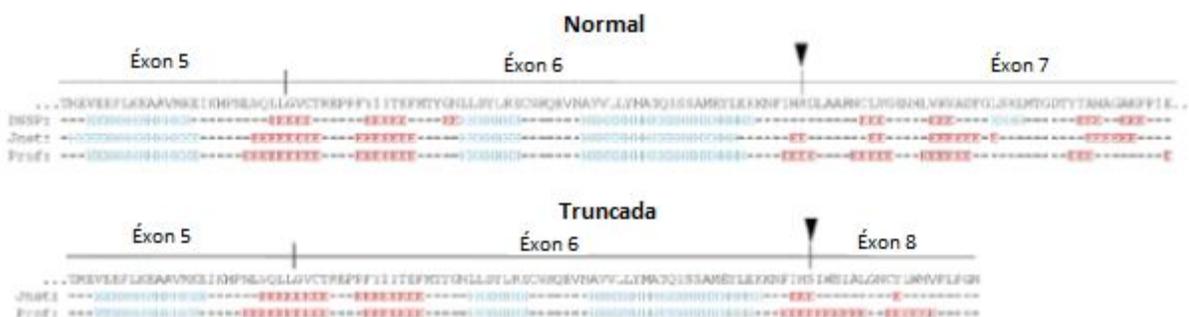
variante foi descrita em 2006 (Chu et al., 2006), mas até hoje seu valor prognóstico na LMC ou no resistência ao tratamento com ITKs é bastante controverso (O'Hare et al., 2011; Berman 2016). Outra variante, frequente e alvo deste estudo, é a deleção do total do éxon 7 (Figura 2). Nesta variante, há a deleção de 185 pares de bases na sequência amplificada, referentes ao éxon 7 completo. Essa alteração acarreta na formação de uma proteína quinase com 61 aminoácidos a menos, além da mudança no *frame* de leitura dos nucleotídeos restantes da sequência e codificação de um códon da parada prematuro (Meggyesi et al., 2012). Enquanto há estudos que afirmam não haver valor prognóstico para essa deleção (Gaillard et al., 2010; Meggyesi et al., 2012), outros apontam uma possível relação entre deleções e inserções e o desfecho clínico desfavorável dos pacientes tratados com ITKs (Gruber et al., 2012; Lee et al., 2008).

Figura 1: Esquema da INS35 no gene *BCR-ABL1*. (a) *DNA* genômico demonstrando o local onde estão presentes os nucleotídeos da INS35. (b) Transcrito de *cDNA* negativo (acima) e positivo (abaixo) para INS35. Ao meio, transcrito de *cDNA* negativo para INS35 com demonstrações do sítio de ligação de fosfato (P-loop), domínio catalítico e sítio de ativação (A-loop).



Adaptado de: Yuda et al., 2017.

Figura 2: Esquema da deleção completa do éxon 7 no gene *BCR-ABL1*. Sequência de *cDNA* negativo (acima) e positivo (abaixo) para deleção completa do éxon 7.



Adaptado de: Meggyesi et al., 2012.

Assim, este estudo analisou eventos de deleção e inserção no DQ, além de caracterizá-los, determinou a relação dessas alterações com a respostas dos pacientes aos ITKs. A coorte de pacientes com LMC acompanhada pelo laboratório de Biologia Molecular do (CEMO/INCA) é bastante extensa e antiga e, assim, permitiu formar grupos de pacientes com grande representatividade e, desse modo, tornou possível esclarecer as relações entre deleções e inserções no DQ, o uso do ITK e o desfecho clínico do paciente.

1.4 JUSTIFICATIVA

Apesar da LMC ser considerada o caso de maior sucesso terapêutico, cerca de 30% dos pacientes (Gruber et al., 2012) apresentam refratariedade ao tratamento com os ITK. A causa da resistência da maior parte dos pacientes é a presença de mutações pontuais no DQ do gene *BCR-ABL1*, entretanto, muitos pacientes não apresentam nenhuma mutação e por vezes apresentam inserções ou deleções, no DQ, que modificariam o *frame* de leitura dos códons, gerando um códon de parada prematura e conseqüentemente, uma proteína truncada (incompleta).

Ainda que a ocorrência dessas modificações seja frequente, os dados da literatura sobre a associação das inserções e deleções com a terapia de ITK nos

pacientes com LMC são controversos (Lee et al., 2008; Gaillard et al., 20110; Gruber et al., 2012; Berman et al., 2016; O'Hare et al., 2011).

Este estudo apresenta uma coorte de pacientes de tamanho robusto e é o primeiro estudo na literatura que separa os pacientes de acordo com sua categoria de resposta ao ITK e recrutou, além dos pacientes em falha, também pacientes com resposta ótima e indivíduos saudáveis.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Verificar a ocorrência e associação de deleções e inserções no domínio tirosina quinase do gene *BCR-ABL1* de pacientes com LMC com diferentes perfis de resposta a ITKs.

1.5.2 Objetivos específicos:

1.5.2.1 Analisar a sequência do DQ de pacientes em diferentes perfis de respostas aos ITKs de coorte prospectiva por sequenciamento de *Sanger*;

1.5.2.2 Analisar a co-ocorrência das deleções e/ou inserções com mutações pontuais no DQ.

1.5.2.3 Relacionar a frequência de ocorrência das modificações na sequência do DQ do gene *BCR-ABL1* (inserções, deleções e mutações pontuais) com o perfil de resposta.

1.5.2.4 Avaliar a ocorrência de inserções e deleções no DQ em sequências de indivíduos saudáveis.

1.5.2.5 Relacionar o aparecimento de deleções e inserções com níveis de transcritos *BCR-ABL1*.

1.5.2.6 Verificar resultados de sequenciamento de amostras ao diagnóstico em busca de eventos de inserção e deleção nas sequências.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Pacientes

Para este estudo, foram consideradas amostras de pacientes com LMC, diagnosticados e/ou acompanhados no período de Julho de 2008 a Fevereiro de 2018 pelo Laboratório de Biologia Molecular (CEMO/INCA).

Todos os pacientes selecionados para as análises realizadas foram acompanhados desde o diagnóstico e possuíam pelo menos 12 meses de tratamento com ITK sem interrupção, além de dados clínicos e moleculares bem caracterizados. Esses critérios foram definidos para que se pudesse separar corretamente os pacientes nos diferentes grupos de resposta ao ITK. A estratificação da resposta do paciente ao tratamento foi feita de acordo com as recomendações da *European Leukemia Net* (Baccarani et al., 2013). Esse estudo está compreendido no estudo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA sob o registro 126/10.

2.1.2 Amostras

A parte retrospectiva deste estudo utilizou arquivos de eletroferogramas realizados pela rotina de sequenciamento do Laboratório de Biologia Molecular (CEMO) referentes a *cDNA* restantes de 232 amostras de 144 pacientes distintos. Essas reações de sequenciamento foram realizadas entre Agosto/2010 e Julho/2015 e, para esse estudo, foram re-analisadas para obtenção de resultados sobre frequência e aparecimento de deleções e inserções.

Já a parte prospectiva do estudo utilizou o *cDNA* restante de 285 amostras enviadas para a rotina de acompanhamento molecular dos pacientes acompanhados pelo laboratório entre Janeiro/2008 e Janeiro/2018, assim como amostras de 24 indivíduos saudáveis e 34 amostras ao diagnóstico de pacientes em diversos tipos de resposta ao tratamento com ITK.

Os indivíduos saudáveis utilizados para esse estudo foram doadores de medula óssea voluntários cujas amostras de sangue periférico foram obtidas

anteriormente à doação. São definidos como indivíduos que não possuem LMC até o momento da amostragem.

Após o esclarecimento do paciente e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), cerca de 20 mL de sangue periférico (SP) foram coletados em ácido etilenodiamino tetra-acético (*EDTA*). As hemácias do SP coletado de cada paciente foram lisadas com o reagente hipotônico *Red Blood Cell Lysing Buffer* (RBCL, Sigma Aldrich) por duas vezes e por fim, lavados com tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma Life Science ®). O sedimento de células resultante foi contado e 8×10^6 células foram lisadas em 1 mL de Trizol. Esse lisado foi armazenado à -20°C .

2.1.3 Extração do RNA e síntese do cDNA

O RNA foi extraído como descrito em (Chomczynski et al., 2006). Para a síntese do cDNA, foi utilizada a enzima *SuperScript II* (*Life Technologies*) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido restante, após o exame, foi armazenado a -80°C . O cDNA restante, após a liberação do laudo, foi armazenado à -20°C .

2.1.4 Sequenciamento direto

2.1.4.1 PCR para amplificação do DQ

O PCR para a amplificação do DQ do gene *BCR-ABL1* ocorreu em duas etapas (protocolo adaptado de Branford et. al., 2002). Para a primeira etapa foi preparado uma reação de: tampão da enzima *High Fidelity Taq Platinum* (*Invitrogen* ®) 1X; MgSO_4 1,5mM; dNTPs 0,2mM; *primer* BCRF 0,2 pmoles/ μL ; *primer* ABLKinaseR 0,2 pmoles/ μL ; dimetilsulfóxido (DMSO) 5% v/v; enzima *PlatinumTaq High Fidelity* 1U; 3 μL cDNA; água para completar volume final de reação de 50 μL .

Para a segunda etapa, foi preparada uma reação de: tampão da enzima *High Fidelity Taq Platinum* (*Invitrogen*) 1X; MgSO_4 1,5mM; dNTPs 0,2mM; *primer* ABLKinaseF 0,2 pmoles/ μL ; *primer* ABLKinaseR 0,2 pmoles/ μL ; DMSO 5% v/v; enzima

PlatinumTaq High Fidelity 1U; 1 μ L do produto de PCR da 1ª etapa; água para completar volume final de reação de 50 μ L.

O perfil térmico das duas *PCRs* é: 94°C (1 min); 35 ciclos de 94°C (30 seg), 58°C (30 seg) e 68°C (1 min); extensão final de 68°C por 8 min e armazenamento a 4°C.

2.1.4.2 Separação de bandas

5 μ L do produto de *PCR* obtido após a amplificação do DQ foi analisado em uma primeira corrida de eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão Tris-Acetato-*EDTA* (TAE), corado com brometo de etídio. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100pb *Ladder* (*Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da corrida, o gel foi exposto à luz ultra-violeta (UV) para que fossem observados os produtos de *PCR* tanto com o tamanho esperado (863 pares de bases (pb) (*GenBank*, número [M14752](#))), referente ao DQ do gene *ABL1* sem inserções ou deleções, que foi denominado neste manuscrito como *wild type* (WT), como produtos de tamanhos diferentes do esperado, provavelmente devido a uma deleção ou inserção. Quando o produto do *PCR* apresentou mais de uma banda, foi realizada uma segunda eletroforese, nas mesmas condições anteriores, e os 45 μ L restantes de cada produto de *PCR* foram aplicados no gel. Todas as bandas observadas, WT e demais, foram retiradas com o auxílio de um bisturi e armazenadas separadamente umas das outras para posterior purificação.

2.1.4.3 Purificação de produto de *PCR*

A purificação das amplificações feitas através de *PCR* obtidas foi realizada utilizando o kit “*PureLink® Quick Gel Extration and PCR Purification Combo Kit*” (*Invitrogen*). Tanto os produtos de *PCR* (líquido) que apresentaram banda única, como as bandas excisadas do gel foram purificados com o mesmo kit, segundo as recomendações do fabricante para cada caso.

2.1.4.4 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, utilizou-se o protocolo adaptado de Branford et al., 2002. Foram utilizados os *primers forward* ABL-Mut-SeqF1, ABL-Mut-SeqF2, ABL-Mut-SeqF3 e o *primer reverse* ABL-Mut-SeqR2 na reação com *Big Dye Terminator v3.1* (AppliedBiosystems). As reações foram precipitadas numa placa de 96 poços por precipitação dos produtos com etanol e foi armazenada seca até o dia do sequenciamento a - 20°C. A corrida foi efetuada no aparelho *Applied Biosystems 3130*.

A análise da sequência foi realizada utilizando o *software Mutation Surveyor* (*Soft Genetics*). Para a análise, foram considerados apenas os eletroferogramas que apresentarem intensidade superior a 800 *rfu* (unidades relativas de fluorescência), distribuição uniforme de intensidade ao longo do fragmento e ruído inferior a 30 *rfu*.

2.1.5 Padronização da reação de sequenciamento

2.1.5.1 Padronização de quantidade de amostra por reação de sequenciamento

De acordo com as instruções de uso do kit de sequenciamento “*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing protocol*”, como o produto de sequenciamento apresenta 863 pb, a quantidade recomendada de Produto de *PCR* seria de 5-20 ng por reação. Entretanto, como neste projeto nos propomos a sequenciar uma grande quantidade de amostras, foi realizado um teste para otimizar a manufatura das reações de sequenciamento e padronizar uma quantidade média de produtos de *PCR*, independente da concentração inicial, que gerassem eletroferogramas dentro dos critérios descritos acima. Assim, quantidades de 1, 2,5, 5 e 7 μL de amostras em diversas concentrações foram testadas para avaliar a qualidade do eletroferograma ao final do processo e, assim, determinar uma quantidade fixa de produto de *PCR*. As amostras utilizadas possuíam quantificação entre 2 e 24 ng/ μL , estas quantidades foram inferidas através de comparação com *Low Mass Ladder 100bp* (Invitrogen) em uma corrida em gel de agarose 2% em TAE.

2.1.5.2 Padronização de quantidade de *Big Dye* por reação de sequenciamento

A fim de otimizar a qualidade dos eletroferogramas obtidos após a reação de sequenciamento do DQ, diferentes quantidades de *Big Dye* foram testadas durante a confecção da placa de sequenciamento. Embora a quantidade de *Big Dye* recomendada pelo fabricante seja de 2 μL por 10 μl de reação, as quantidades avaliadas foram 1 μL , 1,5 e 2 μL . O teste foi realizado utilizando 3 amostras de concentrações distintas, sendo as diferentes quantidades de *Big Dye* testadas em 3 poços distintos para cada amostra, totalizando assim 9 reações.

2.1.6 Análise estatística

A significância estatística dos dados de frequência das inserções, deleções e mutações pontuais em cada grupo de resposta ao inibidor tirosina quinase nas amostras de acompanhamento e de diagnóstico sequenciadas foi analisada via Análise de Variância bidirecional (*Two-way ANOVA*).

O teste t não pareado e não paramétrico (*Mann-Whitney*) foi utilizado para avaliar a relação entre a percentagem de inserções e deleções nos diferentes grupos de resposta e para avaliar a relação entre essas alterações e o número de transcritos BCR-ABL1.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software)*.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Análise retrospectiva

A ocorrência de deleções foi identificada durante a análise de eletroferogramas de pacientes da rotina de análise de mutação no DQ do *ABL1*. Como não eram reportadas, foi realizada uma re-análise dos eletroferogramas referentes à 232 amostras de *cDNA* de 144 pacientes acompanhados pela rotina de sequenciamento do Laboratório de Biologia Molecular (CEMO) (Agosto/2010 a Julho/2015) a fim de verificar se a ocorrência de variantes de splicing poderia ser encontrada no decorrer de um longo período retrospectivo dessas análises.

Das 232 amostras analisadas, mutações pontuais foram observadas em 15,1% das amostras sem associação a eventos de inserção ou deleção. 3,45% tiveram resultados positivos tanto para mutação pontual quanto para eventos de inserção, enquanto 2,16% das amostras foram positivas para mutação pontual, inserção e deleção simultaneamente (Figura 3). Não foi observada nenhuma amostra que possuía mutação pontual com deleção associada (Figura 3).

A deleção mais frequente foi a deleção total do éxon 7 ($\Delta 7$) (Figura 4b), que está presente em 7,76% das amostras analisadas sem associação com outras alterações (Figura 3).

Por sua vez, a inserção mais frequente foi a INS35 (Figura 4c), que foi observada sem associação a nenhum outro evento de mutação ou deleção em 17,5% das amostras (Figura 3).

Eventos de deleção associados à inserção em uma mesma amostra foram observados em 11,63% das amostras analisadas (Figura 3).

Nessa avaliação retrospectiva, foram observados diversos eventos de deleção e inserção no DQ. Devido à baixa frequência dos eventos diferentes de $\Delta 7$ e INS35, essas alterações aparecem juntas no gráfico 1. Outras deleções somadas totalizaram 3,02% das amostras enquanto outras inserções estavam presentes em somente 0,86% (Figura 3).

Foi observado que 38,35% das amostras não possuíram nenhuma alteração na sequência (Figura 3).

Dessa maneira, pode-se confirmar a presença de deleções e inserções retrospectivamente, principalmente a INS35 e $\Delta 7$, que ocorreram em frequências relevantes.

Como não há uma diretriz clara sobre a influência das inserções ou deleções na resposta ao ITK, anteriormente, na rotina de análise de mutações, só se considerava para a análise os produtos de tamanho esperado, acreditando que se tratavam de produtos inespecíficos. Porém, os resultados obtidos neste estudo indicaram que os produtos de tamanhos menores ao esperado, são, na verdade, isoformas variantes que sofreram deleções totais ou parciais de éxons, principalmente em junções éxon-éxon. Como os produtos de tamanho inferior ao esperado era descartado, essas isoformas variantes podem estar subestimadas nesta etapa retrospectiva, já que muitas vezes não aparecem no sequenciamento. Dessa maneira, para a análise prospectiva dos dados, os produtos de todos os tamanhos foram considerados.

Figura 3: Gráfico normalizado dos resultados dos eletroferogramas de amostras encaminhadas para sequenciamento de rotina no Laboratório de Biologia Molecular (CEMO) (N=232).

Distribuição das alterações em amostras retrospectivas

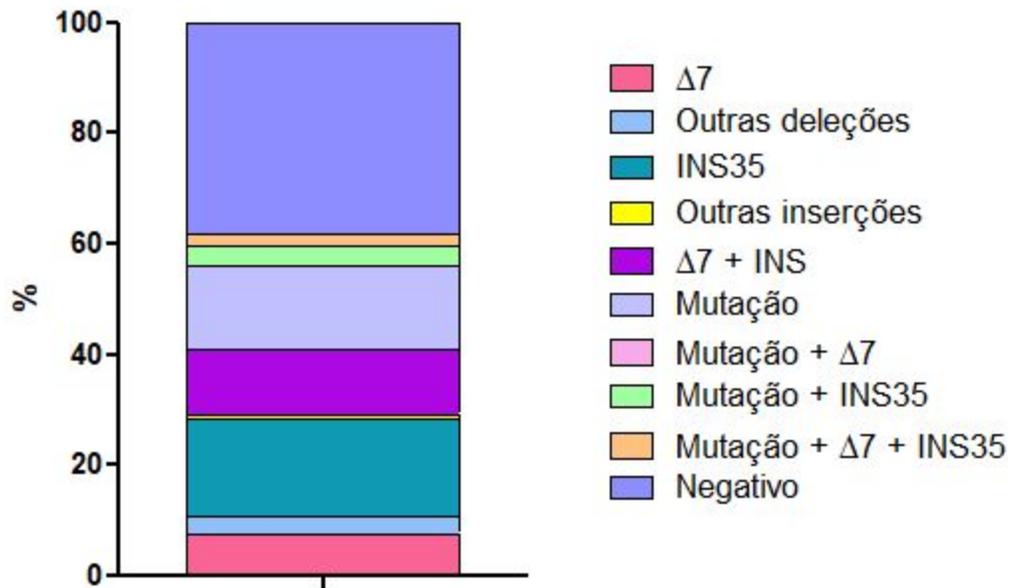
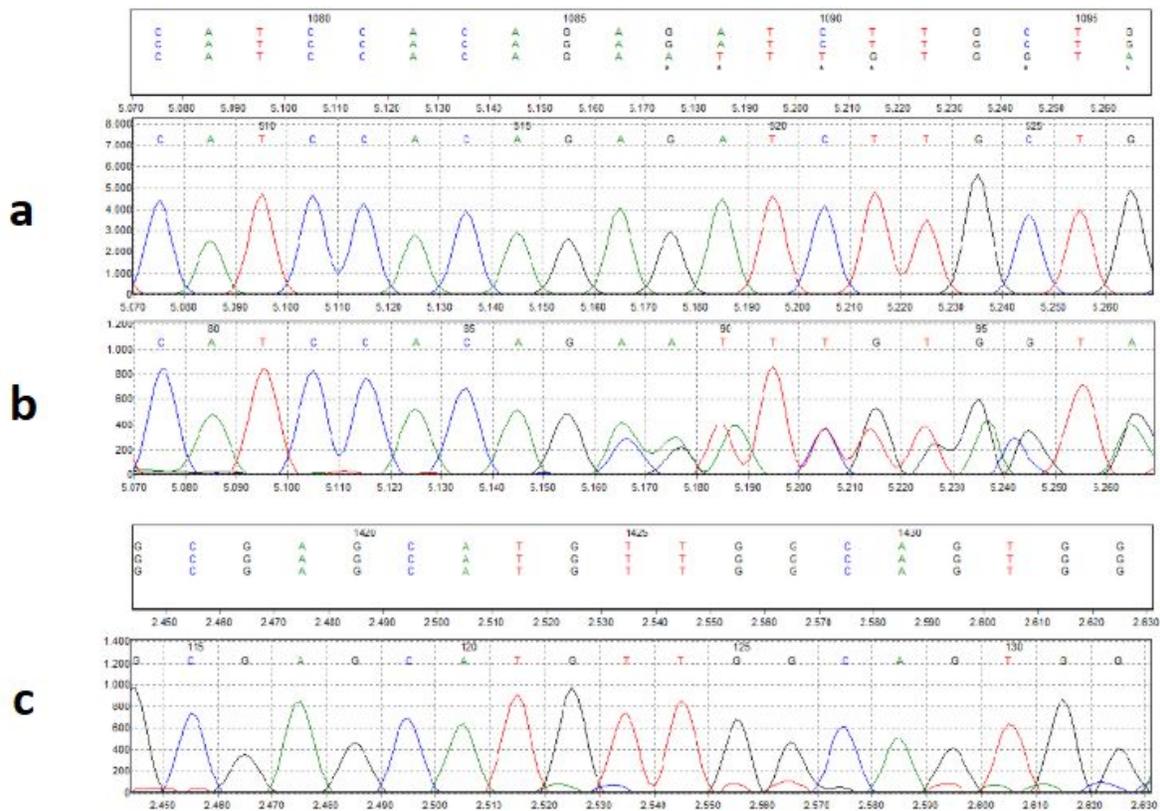


Figura 4: Eletroferograma da região *BCR-ABL1* dos transcritos sequenciados. (a) Sequência referência do gene *ABL1*; (b) Deleção completa (185 pb) do éxon 7 ($\Delta 7$); (c) Inserção de 35 pb entre os éxons 8 e 9.



2.2.2 Análise prospectiva

2.2.2.1 Caracterização dos pacientes

Para esta etapa do estudo, foram selecionadas 285 amostras (Janeiro/2008 até Janeiro/2018), originados de 165 pacientes acompanhados pelo departamento de Hematologia do INCA. Os pacientes da coorte avaliada foram divididos em grupos de acordo com o perfil de resposta ao ITK utilizado no tratamento, seguindo as recomendações da *European Leukemia Net* (Baccarani et al., 2013). As 285 amostras foram separadas em: respondedores ótimos (52), respondedores tardios (40), resistentes primários (129) e resistentes secundários (64). Foram definidos respondedores ótimos os pacientes que atingiram resposta molecular maior (RMM) ou mais profunda em até 12 meses e mantiveram a resposta sem recaída até a data de coleta da amostra analisada (Figura 5a); respondedores tardios aqueles que atingiram

RMM ou mais profunda em até 18 meses e mantiveram a resposta sem recaída até a data de coleta da amostra analisada (Figura 5b); definidos como pacientes com resistência primária aqueles que nunca atingiram RMM nenhuma análise quantitativa de amostras durante todo o curso do tratamento Figura 5c); e definidos como pacientes com resistência secundária os pacientes que possuíam amostras com RMM ou mais profunda porém recaíram e perderam resposta ao ITK Figura 5d).

Além disso, 24 amostras de indivíduos saudáveis também foram sequenciadas para avaliar a ocorrência de deleções e inserções nessa população.

Figura 5: Exemplos de resultados de *qPCR* de amostras sequenciais de pacientes acompanhados pelo Laboratório de Biologia Molecular. (a) Respondedor ótimo; (b) Respondedor tardio; (c) Resistente primário; (d) Resistente secundário.

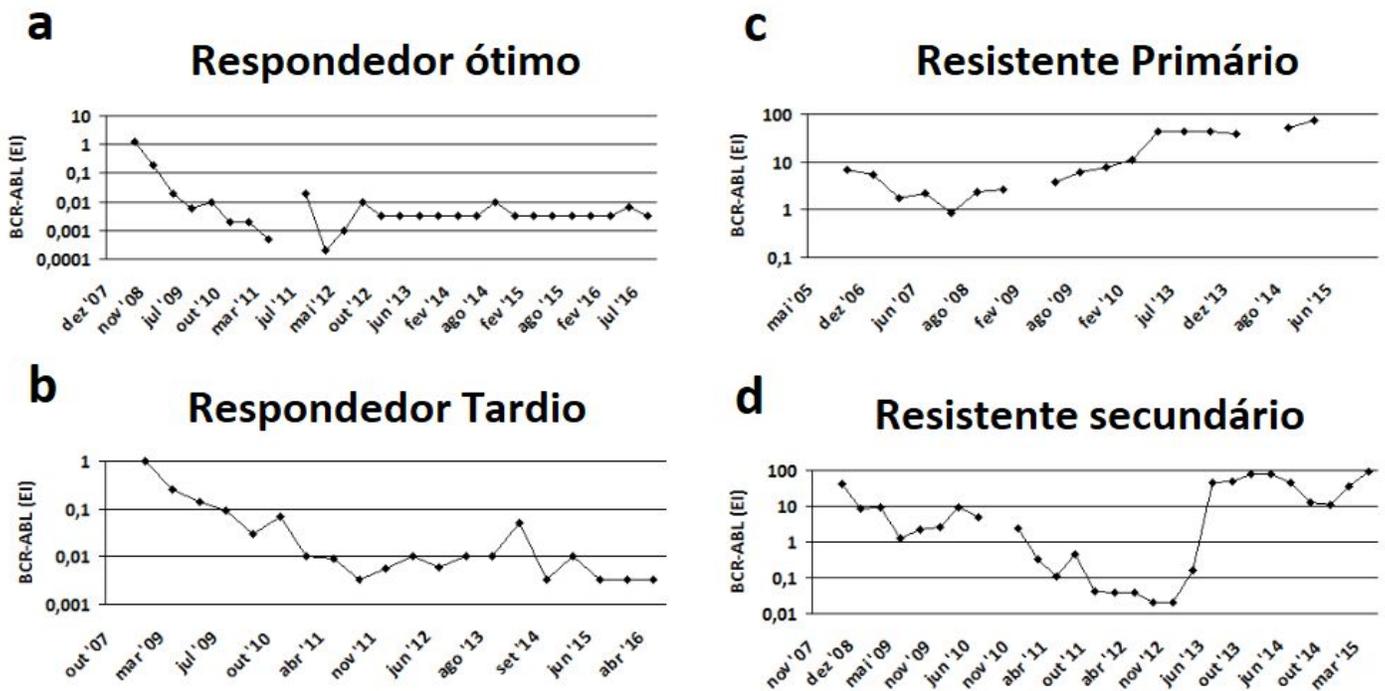


Tabela II: Descrição da coorte de pacientes analisados. NI = não informado.

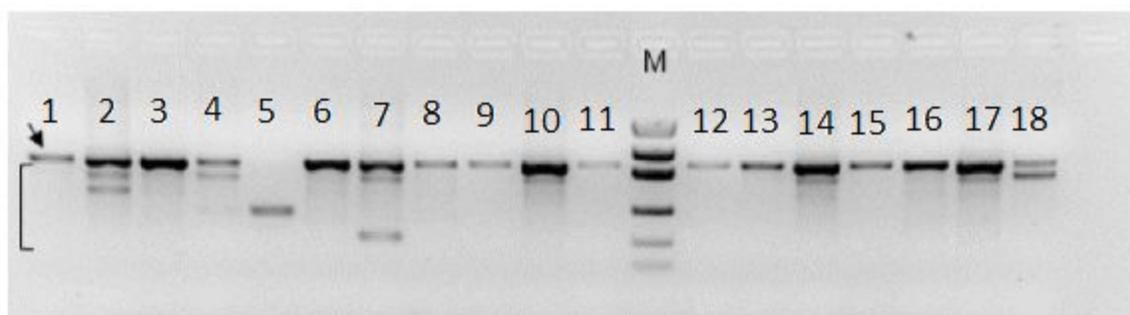
Amostra dos pacientes	285
Idade ao diagnóstico (mediana em anos)	43 (2-83) NI=12
Gênero masculino	166 (58,25%)
Tempo de tratamento (mediana em meses)	52 (2-231)
Fase	
Crônica	201
Acelerada	45
Crise blástica	3
NI	36
Inibidor	
Imatinibe	163
Dasatinibe	65
Nilotinibe	44
NI	13

2.2.2.2 Excisão de bandas

Após a amplificação, as amostras com mais de uma banda foram corridas em gel de agarose 2% em TAE para que os produtos de *PCR* com tamanhos diferentes fossem separados e então purificados separadamente.

Apesar da diferença de tamanho entre os produtos (Figura 6), apenas pela eletroforese, não é possível identificar o que cada um dos produtos representa, sendo necessária a realização do sequenciamento para a identificação de possíveis deleções ou inserções.

Figura 6: Exemplo de produtos de *PCR* para amplificação domínio quinase do gene *ABL1* de pacientes com LMC. Produtos de amplificação por *PCR* do DQ separados por eletroforese em um gel de agarose 2% em TAE corado com brometo de etídio sob luz UV. Amplificação do domínio quinase de tamanho esperado (863 pb) apontado com seta, produtos de *PCR* de tamanho inferior ao esperado (colchete) e padrão de peso molecular e massa (*Low Mass Ladder*, M). As amostras 2, 4, 7, 10, 14, 17 e 18 são exemplos de produtos de *PCR* com mais de um tamanho que necessitam ser separados por uma segunda eletroforese e excisados do gel.



2.2.2.3 Padronização da reação de sequenciamento

2.2.2.3.1 Padronização de quantidades de amostra por reação de sequenciamento

O objetivo desta padronização foi tentar determinar uma quantidade fixa de produto de *PCR* para realização de sequenciamento que tivesse eletroferogramas equivalentes com a melhor qualidade possível e assim, agilizar o processo de confecção da placa para sequenciamento sem perda de poder de análise dos eletroferogramas. Para isso, foram utilizados volumes fixos pré-determinados de produtos de *PCR* com diferentes concentrações.

Os eletroferogramas obtidos após o sequenciamento não demonstraram mudanças em sua qualidade quando comparados a outros poços com volumes iguais de produto de *PCR* de outras amostras com concentrações diferentes. Esse resultado comprova que a qualidade do eletroferograma não é definida exclusivamente pela concentração de produto de *PCR* nas amostras sequenciadas e que a quantidade recomendada de produto não é fixa pois há uma faixa em que as concentrações de produtos de *PCR* podem se encontrar para garantir a qualidade do sequenciamento.

Foi observado também que nos eletroferogramas de uma mesma amostra há pouca diferença entre os poços com volumes diferentes. Baseado na qualidade do eletroferograma das amostras de concentrações variadas, diferentes volumes de produtos, o volume de amostra que obteve melhor qualidade no eletroferograma na maioria das concentrações de produto avaliadas é o de 2,5 μL (Figuras 7 até 10). Assim, para diminuir a taxa de erro experimental, o volume de produto purificado determinado para reação de sequenciamento foi ajustado para 3 μL .

Figura 7: Eletroferograma completo feito a partir de sequenciamento de produto de PCR com quantificação de 2 ng/ μL com *primer* F1. De cima para baixo, eletroferogramas de 1; 2,5; 5 e 7 μL de amostra.

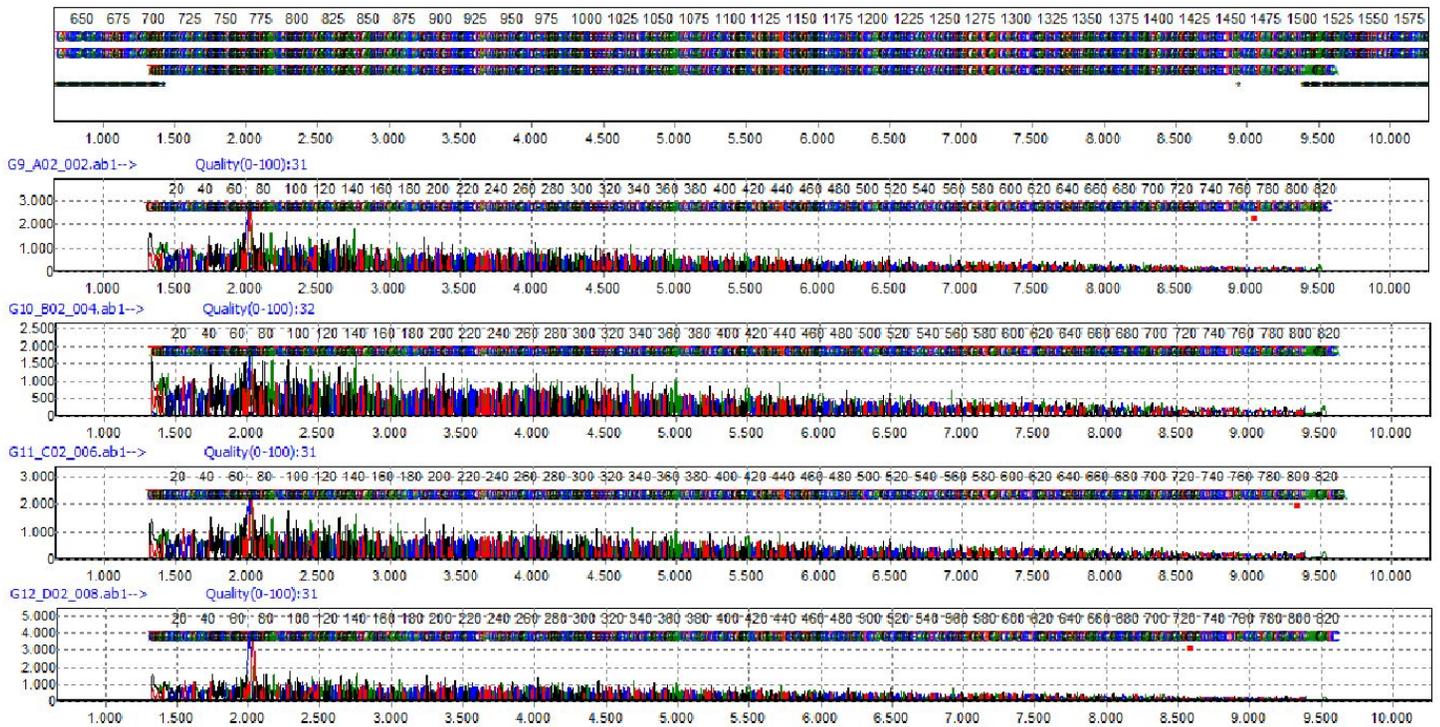


Figura 8: Zoom de eletroferograma feito a partir de sequenciamento de produto de *PCR* com quantificação de 2 ng/ μ L com *primer* F1. De cima para baixo, eletroferogramas de 1; 2,5; 5 e 7 μ L de amostra.

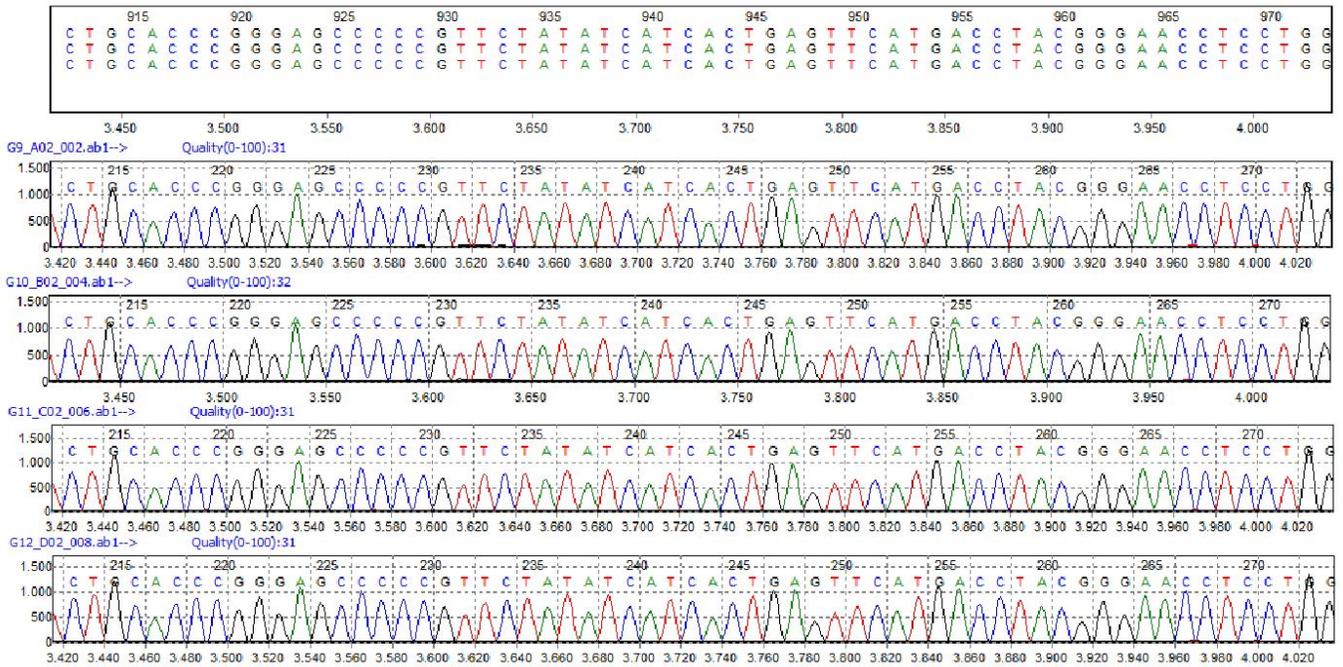


Figura 9: Eletroferograma completo feito a partir de sequenciamento de produto de *PCR* com quantificação de 24 ng/ μ L com *primer* F1. De cima para baixo, eletroferogramas de 1, 2,5, 5 e 7 μ L de amostra.

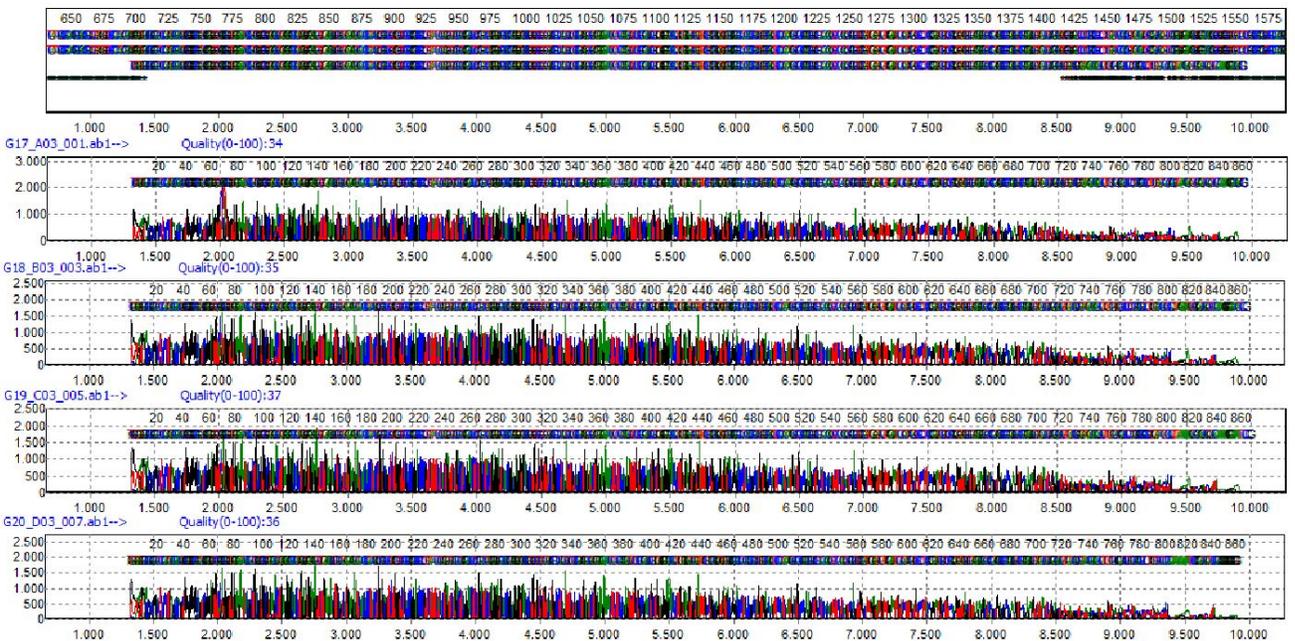
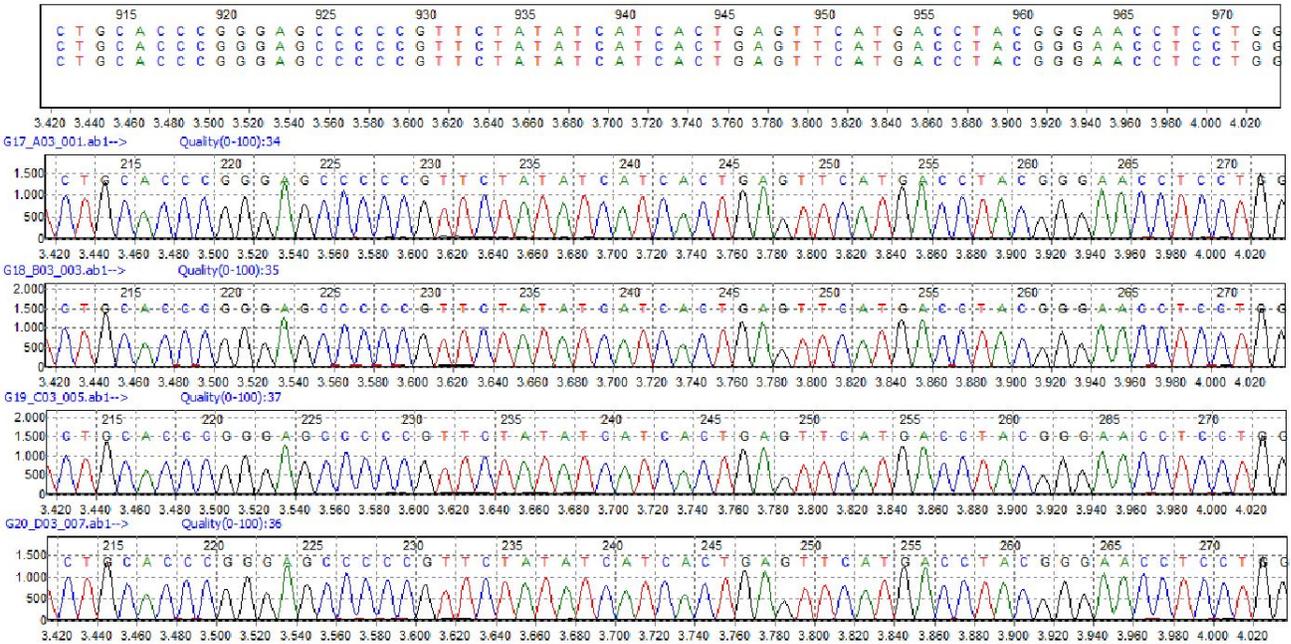


Figura 10: Zoom de eletroferograma feito a partir de sequenciamento de produto de PCR com quantificação de 24 ng/μL com *primer* F1. De cima para baixo, eletroferogramas de 1, 2,5, 5 e 7 μL de amostra.



No decorrer da sequência foi observado um decréscimo no tamanho dos picos que poderia estar associado ou a uma pouca quantidade de *Big Dye* ou ao excesso de produto de PCR. Como essa diminuição foi observada também nas menores concentrações e menores volumes de produto de PCR, foi realizada uma padronização na quantidade de reagente.

2.2.2.3.2 Padronização de quantidade de *Big Dye* por reação de sequenciamento

Foi observado que utilizando o volume de 1 μL do reagente *Big Dye* (volume utilizado no protocolo da rotina do laboratório) os picos presentes nos eletroferogramas diminuíam de tamanho no decorrer da sequência, deixando a parte final das sequências dos F1, F2 e F3 e início da sequência do primer R2 menor, diminuindo a sensibilidade da análise da parte final das sequências. Isso poderia ser causado pela quantidade insuficiente de *Big Dye* resultando numa maior representatividade dos

fragmentos mais curtos. Logo, um maior volume de *Big Dye* teoricamente aumentaria o tamanho dos picos e aumentaria a sensibilidade da sequência inteira.

O volume de produto de *PCR* utilizado para a padronização do volume de *Big Dye* foi 3 μL para cada reação de sequenciamento, como padronizado anteriormente. Foram testados os volumes 1 μL , 1,5 μL e 2 μL de *Big Dye*.

Pouca diferença foi observada entre os eletroferogramas de uma mesma amostra, independente da quantidade de *Big Dye* utilizada (Figura 11). Dessa maneira, foi definido que uma maior quantidade de *Big Dye* não melhora a qualidade e tamanho dos picos obtidos no sequenciamento e, sendo assim, o volume escolhido foi igual ao que já era utilizado no laboratório (1 μL). A diminuição no tamanho dos picos observada no decorrer da sequência representa uma perda significativa na sensibilidade da técnica. Contudo, o desenho dos *primers* (Figura 12) permite contornar este problema pelo fato de que cada região de interesse é coberta no mínimo duas vezes e, como a região de anelamento dos *primers* é diferente, o tamanho dos picos em cada região também é. De uma maneira geral, a região dos *primers* que possuem valores de unidades relativas de fluorescência (*rfu*) inferiores à 800 estão presentes nas sequências amplificadas por outro primer e com picos com tamanhos satisfatórios, acima de 800 *rfu*.

Figura 11: Eletroferogramas de uma mesma amostra com diferentes quantidades de *Big Dye*. (a) 1 µL; (b) 1,5 µL; (c) 2 µL.

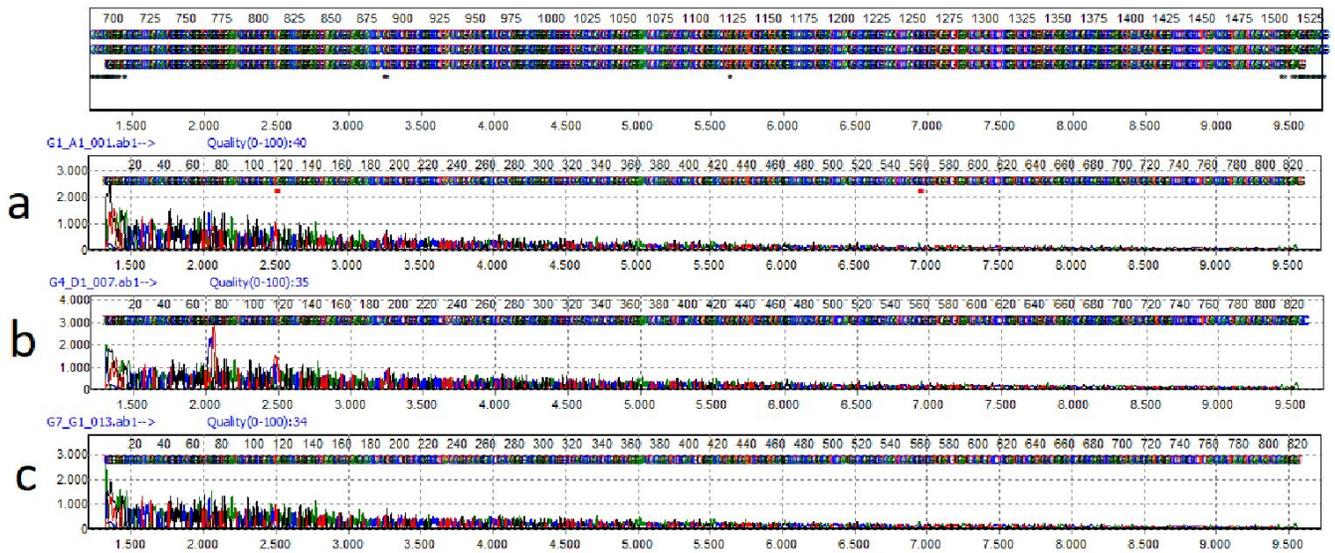
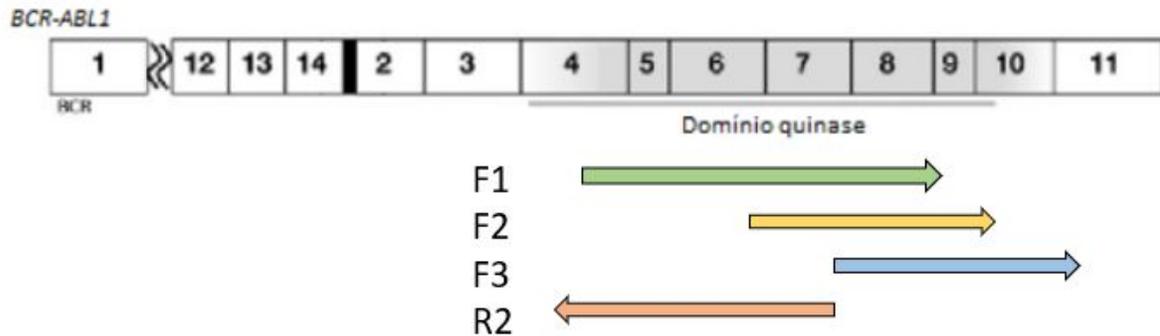


Figura 12: Esquema de distribuição dos primers ao longo do DQ. Eletroferograma representando o domínio quinase (DQ) do gene *ABL1* e a sequência amplificada por cada um dos quatro primers. Regiões amplificadas pelos *primers* F1, F2, F3 e R2.

Regiões amplificadas pelos *primers*



2.2.2.4 Análise dos sequenciamentos relacionados à resposta ao ITK

Em concordância com os dados da literatura que associam mutações pontuais à falha no tratamento (Soverini et al., 2011), os pacientes com resistência primária e secundária foram os que apresentaram maior frequência exclusivamente de

mutação pontual com as frequências respectivas de 8,53% e 9,38%, enquanto 1,92% dos pacientes respondedores ótimos e 2,5% dos respondedores tardios apresentaram unicamente mutação pontual nas análises do sequenciamento (Figura 13). A frequência simples de mutações nos grupos, independente de co-ocorrência com deleções ou inserções, foi de 17,06% no grupo dos pacientes com resistência primária, de 15,62% para o grupo resistente secundário, de 3,84% para respondedores ótimos e de 2,5% no grupo dos respondedores tardios. Não foram observadas mutações pontuais no grupo de indivíduos saudáveis.

Para visualizar melhor a ocorrência das isoformas $\Delta 7$ e INS35 nos grupos de pacientes, a frequência de cada isoforma, independente da co-ocorrência com outras alterações, foi plotada na figura 14.

Quanto às deleções e inserções, no caso da deleção total do éxon 7 ($\Delta 7$), assim como no caso das mutações, a frequência de $\Delta 7$ é maior nos grupos de falha e esteve presente em 24,81% para resistentes primários e 21,86% para resistentes secundários. Dos respondedores ótimos, 11,54% apresentaram $\Delta 7$, também presente em 5% dos respondedores tardios e em 16,66% dos indivíduos saudáveis (Figura 14), porém a diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa. A frequência maior no grupo de indivíduos saudáveis, quando comparado aos respondedores ótimos pode ser atribuída ao N menor de indivíduos saudáveis analisados neste estudo, quando comparado aos outros grupos.

A INS35 também estava presente em todos os grupos e possuiu uma maior frequência nos grupos de resistência primária e secundária (39,54% e 24,99%, respectivamente) quando relacionados aos grupos da resposta ótima (15,39%), tardia (15%) e saudável (12,5%) (Figura 14). A diferença entre a ocorrência de INS35 no grupos de falha primária tanto entre o grupo de respondedores ótimos e o grupo de indivíduos saudáveis foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

A presença desses eventos de deleção e inserção no grupo de indivíduos saudáveis (N=24) comprovam que a ocorrência desses eventos não está relacionada à doença, corroborando a hipótese de que são isoformas resultantes de splicing

alternativo. Porém, a maior frequência desses eventos nos grupos que apresentam resistência ao tratamento com ITKs levanta a hipótese de que poderiam estar relacionados a esse processo resistência. Tanto a INS35 quanto a $\Delta 7$ tiram a proteína de quadro de leitura e codificam um códon de parada prematura. Essa mudança provocada na estrutura da proteína tirosina-quinase BCR-ABL1 poderia atrapalhar a ligação da droga (Lee et al., 2008; Yuda et al., 2017). Assim, essas variantes, apesar de não serem produto da LMC, poderiam conferir uma desvantagem no tratamento com o ITK. Outras variantes de splicing foram observadas durante as análises (Figura 13) em uma pequena parcela das amostras.

Figura 13: Gráfico normalizado dos resultados dos eletroferogramas de todas as amostras analisadas. Indivíduos saudáveis (N=24); Respondedores ótimos (N=52); Respondedores tardios (N=40); Resistentes primários (N=129); Resistentes secundários (N=64).

Distribuição de alterações de acordo com o grupo de resposta ao ITK

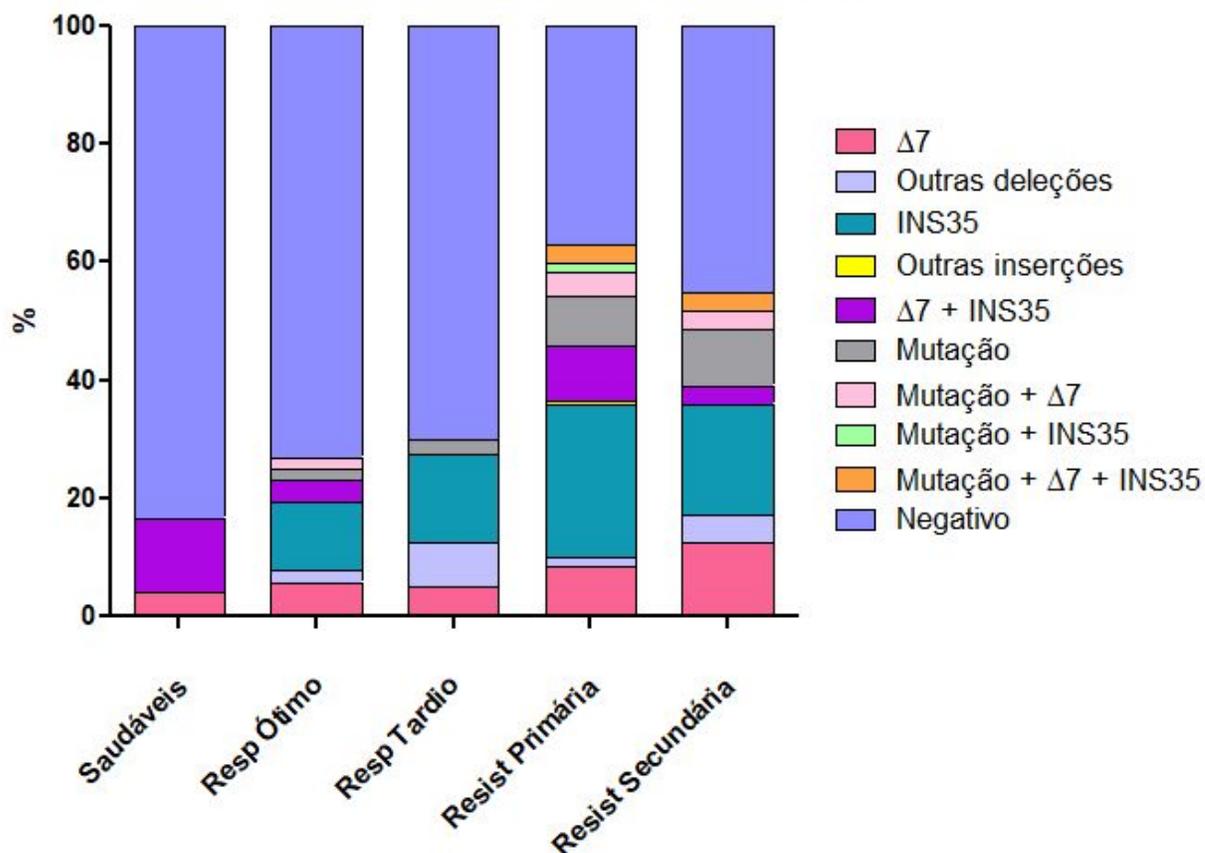
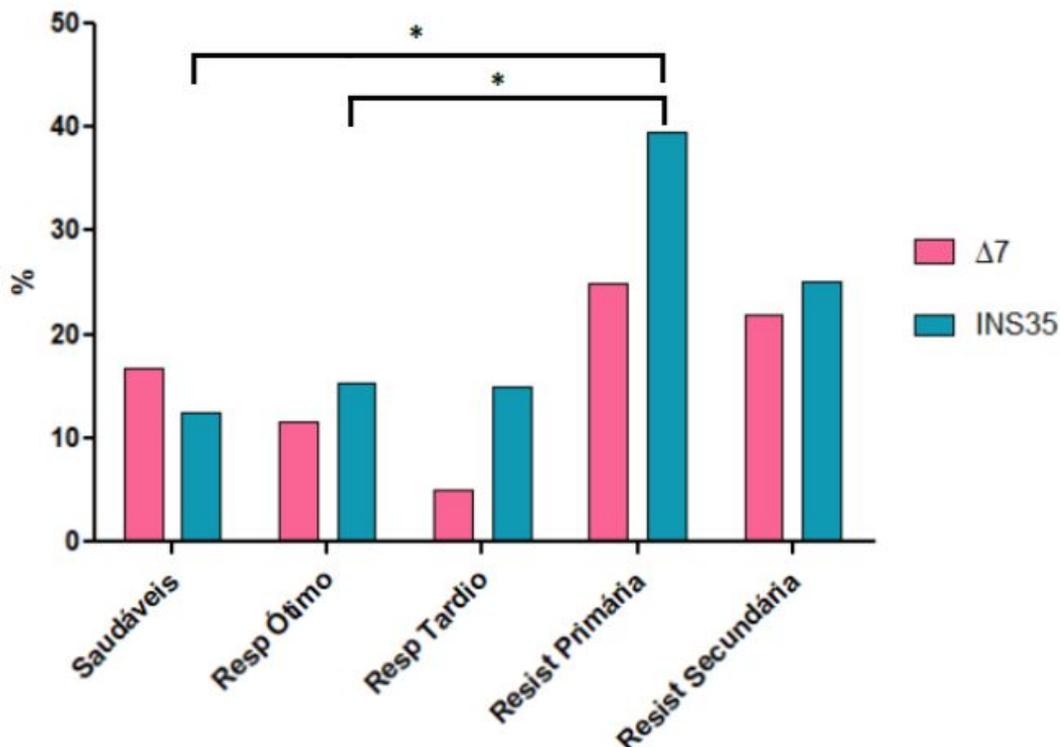


Figura 14: Frequência total observada da presença de $\Delta 7$ e INS35 associadas ou não à mutação pontual em porcentagem de amostras nos diferentes grupos. * equivale a $p < 0,05$.

Distribuição de INS35 e Del7 de acordo com o grupo de resposta ao ITK



2.2.2.5 Distribuição das alterações de acordo com o ITK em uso

Para avaliar se a frequência de inserções, deleções ou mutações variava de acordo com o tipo de ITK utilizado no tratamento, os resultados foram agrupados por tipo de ITK em uso (Figura 15). Os inibidores foram Imatinibe (STI), Dasatinibe (BMS) ou Nilotinibe (AMN).

Como resultado, observou-se que 8,571% do grupo de pacientes em uso de STI apresentou mutações pontuais em suas sequências, enquanto os grupos em uso de BMS e AMN tiveram 18,461% e 15,909%, respectivamente (Figura 15).

Quanto às deleções, a $\Delta 7$ esteve presente em todos os grupos, presente em 14,281% do grupo em tratamento com STI, em 27,692% no grupo com BMS e em 25%

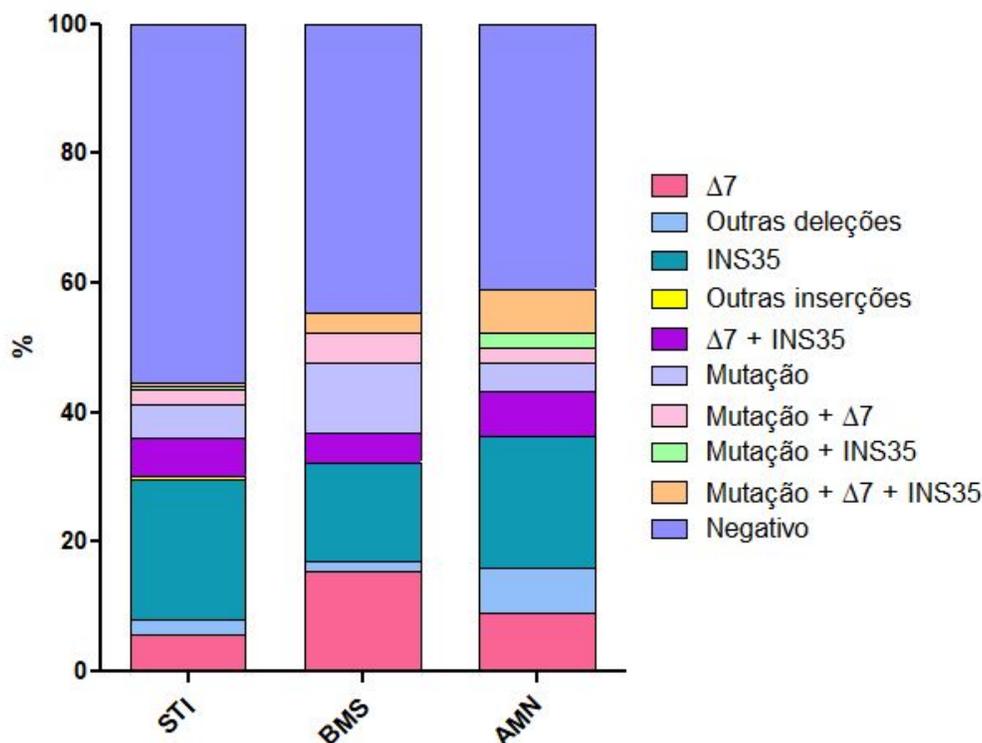
no grupo com AMN (Figura 15). Outras deleções tiveram incidência em 2,286% do grupo em tratamento com STI, 1,5385% em BMS e 6,818% em AMN (Figura 15).

A INS35 foi a inserção mais frequente e, assim como as alterações já citadas, esteve presente em todos os grupos. Sua presença foi confirmada em 28,57% do pacientes em uso de STI, 23,077% no grupo em uso de BMS e em 36,364% no grupo de AMN (Figura 15). Outras inserções foram observadas somente em 0,571% do grupo em tratamento com STI, sendo a presença dessas alterações exclusiva para esse grupo (Figura 15).

Não houve diferença estatística entre a frequência dos eventos nos diferentes tipos de inibidor em uso (*Two-way ANOVA*). Este dado indica que o tipo de inibidor utilizado não influencia na ocorrência dos eventos avaliados.

Figura 15: Gráfico normalizado da relação entre porcentagem de alterações observadas nas análises dos eletroferogramas e o ITK utilizado durante o tratamento. STI (N=163); BMS (N=65); AMN (N=44). 13 pacientes foram excluídos da análise pois não possuíam dados de ITK em uso.

Distribuição de alterações de acordo com o ITK



2.2.2.6 Relação entre níveis de transcritos BCR-ABL1^{EI} (escala internacional) e INS35 e Δ7

Para que fosse avaliada a relação entre a incidência de deleção e inserção e o valor de níveis de transcritos, os grupos foram separados de acordo com a presença ou não dessas alterações nas sequências analisadas. Os níveis de transcritos de BCR-ABL1 é um dos critérios utilizados para se acompanhar a resposta do paciente ao tratamento. Níveis de transcritos acima do esperado, de acordo com o tempo de tratamento (Baccarani et al., 2013), podem ser resultado de resistência ao ITK em uso.

Os valores de transcritos BCR-ABL1^{EI} utilizados para a análise foram obtidos através de quantificação absoluta por *qPCR* dos transcritos de BCR-ABL1 e do gene constitutivo *ABL1*, na razão BCR-ABL1/ABL, multiplicada por 100 para ter o valor em

porcentagem. Este valor então, multiplicado por um fator de conversão para a escala internacional, normaliza os resultados nesta escala internacional e permite a comparação entre os valores de transcritos BCR-ABL1^{EI} obtidos em qualquer laboratório validado em qualquer lugar do mundo. Os valores de BCR-ABL1^{EI} das amostras utilizadas neste estudo foram obtidos durante a rotina de exames do Laboratório de Biologia Molecular (CEMO).

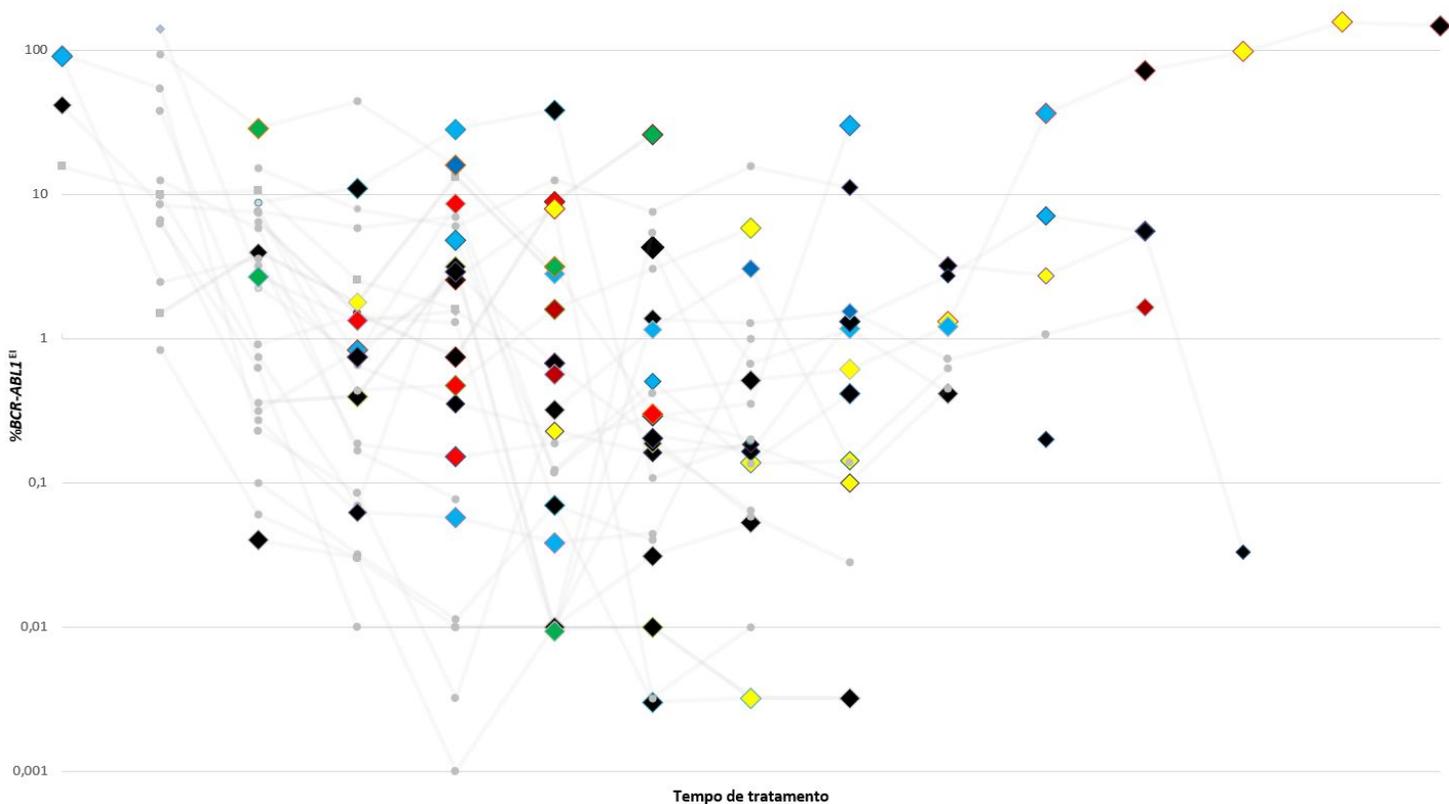
No gráfico 5, foi plotado em escala logarítmica ao longo do tempo em meses (eixo X) os níveis de transcritos de BCR-ABL1^{EI} de 25 pacientes com pelo menos 4 amostras sequenciadas ao longo de seu acompanhamento, sendo essas amostras sequenciais ou não. A figura mostra que não só as mutações (vermelho), mas também a INS35 (amarelo) e $\Delta 7$ (azul) são mais frequentes nas amostras sem resposta molecular maior (com níveis de transcritos BCR-ABL1^{EI} acima de 0,1). Ao contrário das mutações, que parecem ter uma distribuição em períodos mais iniciais do tratamento e presentes também em amostras com baixos níveis de transcritos BCR-ABL1^{EI}, a INS35 e $\Delta 7$ apresentam uma distribuição visualmente mais homogênea ao longo de todo período de acompanhamento, sendo que a INS35 parece se distribuir homogêneamente ao longo de todo o eixo Y, em diferentes níveis de transcritos, ao contrário de $\Delta 7$, que parece ter uma localização preferencialmente superior, junto a níveis altos de BCR-ABL1^{EI}.

Vale ressaltar também que, de acordo com o protocolo “*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems ®), a sensibilidade dessa técnica de sequenciamento é de 20%, o que possibilita a presença de resultados falso-negativos para amostras em que a carga do alelo mutado esteja abaixo de 20%, que poderia refletir em uma frequência menor da observação dessas alterações em amostras com baixos níveis de transcritos BCR-ABL1.

Amostras com baixos níveis de transcritos BCR-ABL1 (até mesmo com resultado indetectável pela técnica de qPCR) também resultam em eletroferogramas com qualidade, o que não seria esperado já que o desenho do experimento leva a

seleção do ABL da translocação BCR-ABL1 em detrimento ao ABL1 não translocado pela 1ª etapa de amplificação do gene *BCR-ABL1*. Acredita-se que esses eletroferogramas obtidos dos pacientes em baixos níveis de transcritos BCR-ABL1 tiveram como molde o gene *ABL1* não translocado, produto apenas da segunda fase de amplificação para o domínio quinase do gene *ABL1*. Com níveis menores transcritos BCR-ABL1, as sequências não translocadas passam a estar presentes em maioria, fato que favorece sua amplificação em relação às demais sequências. Para testar essa hipótese foi realizado um teste com *cDNA* de indivíduos saudáveis no qual as amostras foram diluídas em água de injeção para que fosse simulada a realização da primeira etapa do *PCR* de amplificação do DQ e o restante da metodologia foi realizada de maneira igual. Como não houve reação de amplificação na primeira etapa, esse teste serviu para avaliar se a segunda etapa seria suficiente para amplificar o DQ e gerar um sequenciamento de qualidade. Como resultado, foi confirmado que a segunda etapa funcionou corretamente e amplificou de maneira satisfatória o DQ, confirmando que, mesmo que não haja translocação BCR-ABL1 no *cDNA*, há amplificação suficiente para que o sequenciamento funcione (dado não mostrado).

Figura 16: Distribuição de mutações, INS35 e $\Delta 7$ ao longo do tratamento de 25 pacientes, de acordo com o número de transcritos BCR-ABL1^{EI}. Gráfico de cinéticas sobrepostas de 25 pacientes que possuíam mais de 4 amostras analisadas durante o tratamento com ITK evidenciando a distribuição das alterações observadas ao longo do curso da doença. Legenda: Amarelo - INS35; Vermelho - Mutação pontual; Azul claro - $\Delta 7$; Azul escuro – Outras deleções; Verde - $\Delta 7$ + INS35; Preto – Negativo.



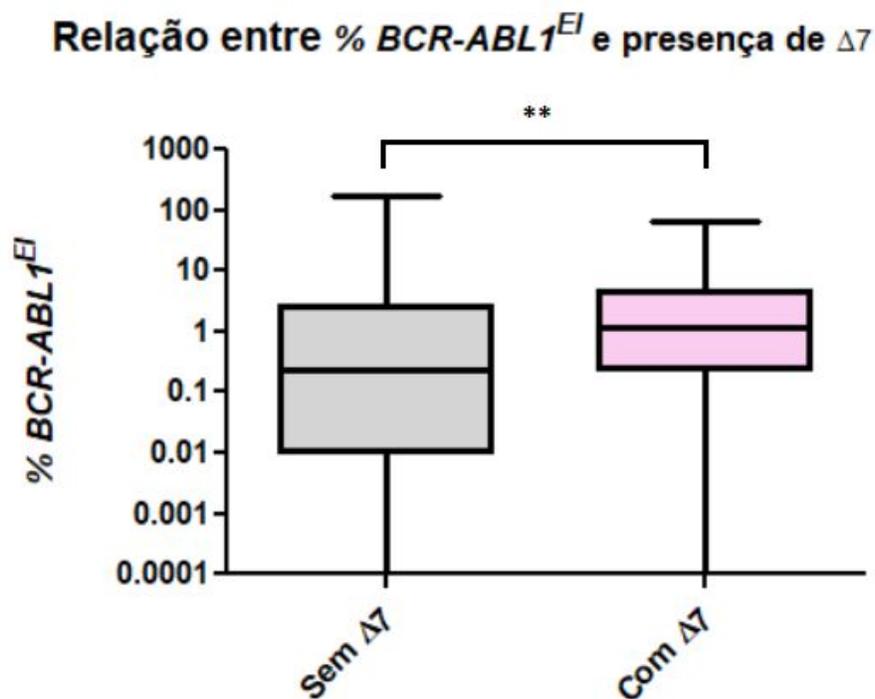
Para verificar se havia uma correlação estatística entre a quantidade de transcritos BCR-ABL1^{EI} e a ocorrência de INS35 e $\Delta 7$, separadamente, os dados foram plotados num gráfico tipo box-plot e foram analisados por testes T não-pareados (*Mann-Whitney*) para estabelecer a relação entre o splicing alternativo e os níveis de transcritos.

2.2.2.7 Comparação entre a relação de níveis de transcritos BCR-ABL1^{EI} nos grupos com e sem $\Delta 7$

As amostras foram separadas em dois grupos: com ou sem $\Delta 7$ (Figura 17). O grupo sem a $\Delta 7$ teve valores de: média = 6.6095; mediana = 0.2273; e desvio padrão = 22.1698. O grupo que possuía $\Delta 7$ obteve valores de: média = 7.3089; mediana: 1.1642; e desvio padrão = 14.4590.

A análise estatística (*Mann-Whitney*) dos grupos revelou associação estatisticamente significativa entre a presença de $\Delta 7$ e maiores valores de BCR-ABL1 ($p=0,0023$). Este dado sugere que a $\Delta 7$ apesar de não estar relacionada à resistência ao ITK (Figura 14), está associada a pacientes com alta carga leucêmica.

Figura 17: Box plot relacionando a porcentagem de transcritos BCR-ABL1^{EI} com resultado positivo para $\Delta 7$ associada ou não à outras alterações e/ou mutação pontual. Cinza – Sem $\Delta 7$ (N = 233); Rosa – Com $\Delta 7$ (N = 52); “***” equivale a $p<0,01$.

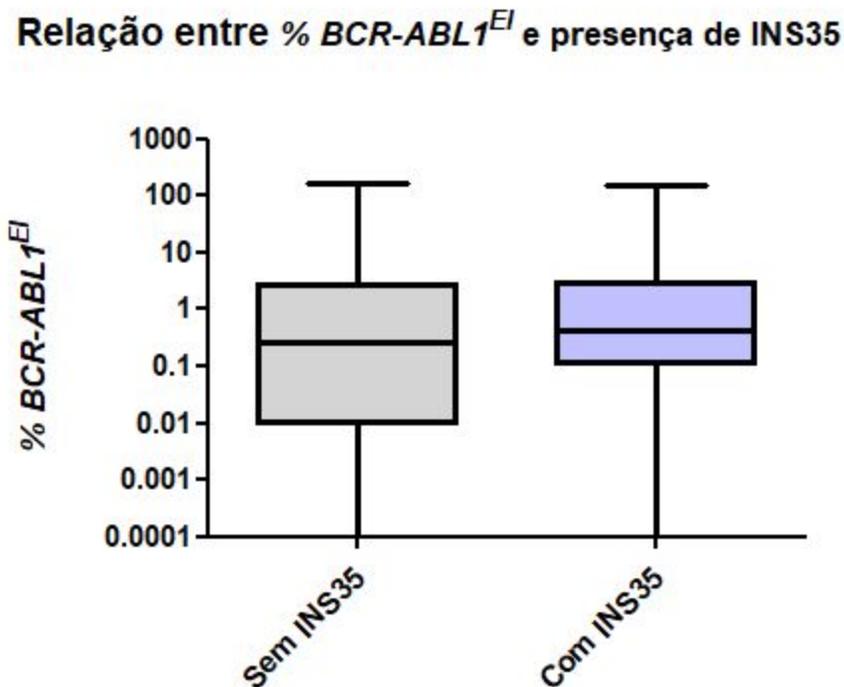


2.2.2.8 Comparação entre a relação de níveis de transcritos BCR-ABL1^{EI} nos grupos com e sem INS35

Em seguida, foi avaliado a possível associação entre INS35 e os níveis de transcritos (Figura 18). Os grupos também foram separados em amostras que apresentavam resultado positivo para a alteração e que não possuíam essa alteração. O grupo sem INS35 teve valores de: média = 6.0292; mediana = 0.2650; e desvio padrão = 19.4762. O grupo com INS35 teve valores de: média = 8.5199; mediana = 0.4256; e desvio padrão = 24.3281.

Curiosamente, apesar de INS35 ser mais frequente no grupo de pacientes com resistência primária (Figura 14), nesta análise (*Mann-Whitney*), não houve relação estatisticamente significativa entre a presença de INS35 e os níveis de BCR-ABL1 ($p=0.2872$). Isto sugere que a INS35 está relacionada com resistência primária, e não apenas com pacientes com alta carga leucêmica.

Figura 18: Box plot relacionando a porcentagem de transcritos BCR-ABL1^{EI} com resultado positivo para INS35 associada ou não à outras alterações e/ou mutação pontual. Cinza – Sem INS35 (N = 204); Azul – Com INS35 (N = 81).



2.2.2.9 Resultado do sequenciamento de amostras ao diagnóstico

Como nossos dados indicaram que tanto a INS35 e a $\Delta 7$ são isoformas variantes de splicing alternativo e sabe-se que alteram o quadro de leitura da proteína BCR-ABL1 e resultam num códon de parada prematuro, uma das questões investigadas a seguir foi se a ocorrência dessas alterações, já ao diagnóstico dos pacientes com LMC, seria diferente entre os grupos de resposta ao ITK.

A presença de eventos de splicing alternativo em amostras ao diagnóstico poderia ser uma possível causa para o atraso na obtenção de RMM pelos pacientes aos 12 meses de tratamento e, dessa maneira, seriam importantes fatores prognósticos ligados à falha terapêutica.

Na rotina laboratorial de acompanhamento molecular da LMC, não é usual realizar o sequenciamento de amostras ao diagnóstico, já que este procedimento é realizado em casos de falha ao tratamento à ITK.

Enquanto respondedores ótimos não apresentaram nenhuma alteração em suas sequências, todos os outros grupos tiveram porcentagens de eventos de deleção e inserção iguais ou superiores à 50% (Figura 19). Essas alterações, assim como nos resultados de amostras de acompanhamento mais longo, estava ou não ocorrendo simultaneamente com outra alteração, não necessariamente em um mesmo transcrito. Respondedores tardios obtiveram 75% das amostras com algum tipo de variante; Resistentes primários possuíram 50% de amostras positivas para inserções e deleções; Resistentes secundários tiveram 60% de amostras com alterações (Figura 19).

Assumindo que as variantes de splicing estão associadas à resistência ao tratamento com ITKs, de acordo com os dados obtidos neste estudo, os resultados obtidos para os grupos de respondedores ótimos e resistentes primários já eram esperados.

A presença de $\Delta 7$ na maioria das amostras ao diagnóstico de pacientes respondedores tardios corrobora a hipótese de como essa variante de splicing poderia contribuir com a diminuição da sensibilidade dos pacientes ao tratamento com ITKs. Estes resultados indicam que essa alteração não impede a ligação do ITK ao sítio de ligação de ATP (*P loop*), mas que a alteração estrutural das isoformas variantes de splicing diminuem a ligação da droga à proteína, promovendo assim um atraso na resposta ao inibidor. Isto explicaria o maior tempo que esses pacientes necessitam para atingir RMM ou mais profunda.

No caso dos pacientes resistentes secundários, antes da perda da resposta, o paciente respondia ao tratamento e, portanto, era um respondedor ótimo ou tardio, dependendo do tempo que levam para atingir RMM (Figura 5b). Dessa forma, tornou-se necessário que os pacientes desse grupo fossem realocados entre os grupos

de respondedores tardios e ótimos (Figura 20). Foi constatado que os pacientes com resistência secundária que apresentaram uma variante de splicing alternativo ao diagnóstico foram pacientes inicialmente respondedores tardios que se tornaram resistentes secundários durante o tratamento enquanto os que não possuíam nenhuma alteração eram respondedores ótimos (Figura 20).

Apesar de uma pequena coorte, os dados indicam fortemente uma possível relação com esses eventos de splicing com um pior prognóstico para o paciente, causando uma demora para atingir resposta molecular maior ou mais profunda. Estudos numa coorte maior de pacientes ao diagnóstico são necessários para determinar esta relação.

Figura 19: Gráfico normalizado de amostras de pacientes ao diagnóstico. Respondedores ótimos (N=7); Respondedores tardios (N=8); Resistentes primários (N=14); Resistentes secundários (N=5).

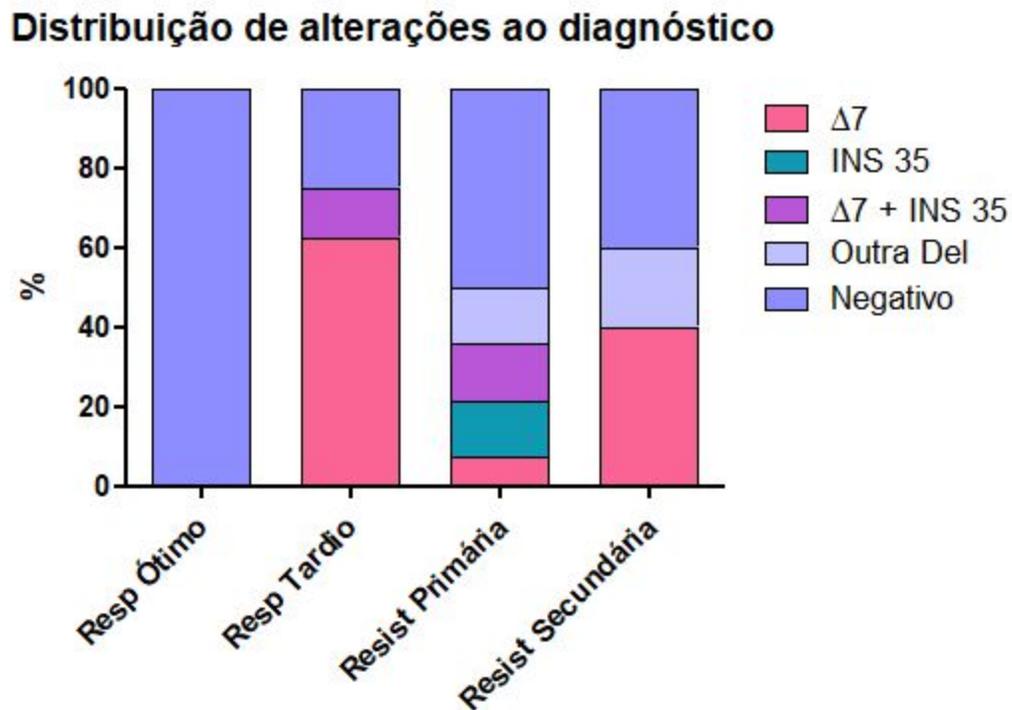
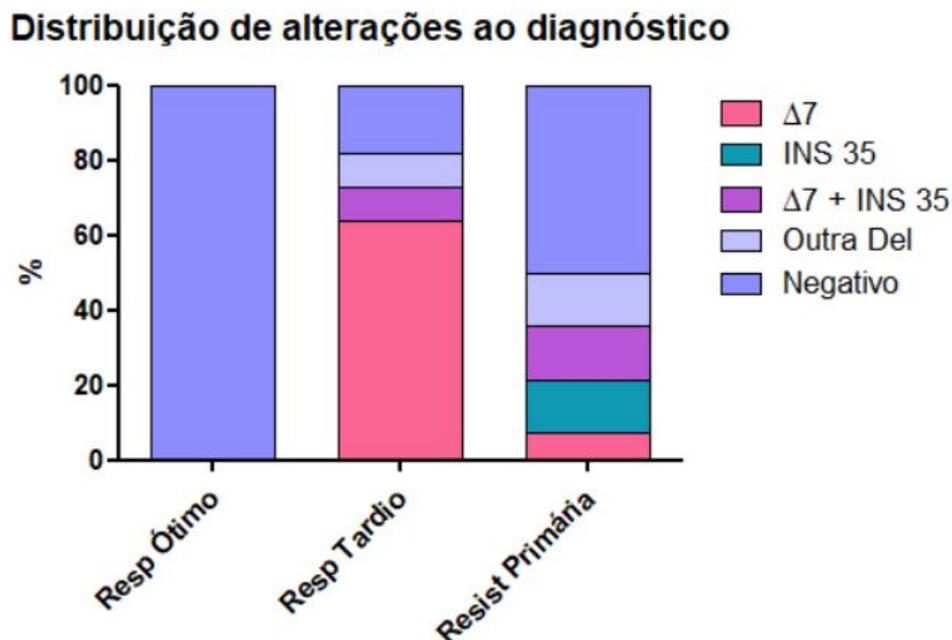


Figura 20: Gráfico normalizado de amostras de pacientes ao diagnóstico após redistribuição do grupo de resistentes secundários. Respondedores ótimos (N=9); Respondedores tardios (N=11); Resistentes primários (N=14).



3. CONCLUSÃO

Pode-se concluir através dos resultados obtidos nesse estudo que $\Delta 7$ e INS35 são as variantes mais frequentes observadas nas sequências dos pacientes avaliados. Foi verificado neste estudo que esses eventos também são observados em indivíduos saudáveis, o que leva à conclusão de que se tratam de eventos de splicing alternativo e, por tanto, ocorrem na população geral. Apesar dessas alterações estarem proporcionalmente presentes em maior número nos grupos de pacientes resistentes, somente houve relação estatisticamente significativa entre a presença de INS35 e resistência ao tratamento com ITKs ($p < 0,05$). Quando relacionado os resultados dos sequenciamentos com os níveis de transcritos, obteve-se valor de p significativo somente para $\Delta 7$, apesar de todos os grupos terem, de maneira geral, um aumento no número de transcritos. Não foi observada nenhuma associação com um ITK específico.

Análises de amostras de um mesmo paciente foram avaliadas e foi constatado que essas variantes flutuam durante o curso do tratamento, não sendo uma condição fixa observada nas análises de sequenciamento. Ao diagnóstico, respondedores ótimos foram os únicos que não possuíam nenhum tipo de splicing alternativo, enquanto respondedores tardios e resistentes primários tinham altas frequências dessas alteração em sua sequências. A partir desses resultados, é possível que essas variantes não causem resistência propriamente dita, mas uma certa dificuldade na ligação do ITK à enzima quinase, dificultando a inibição e contribuindo para o atraso na resposta ao medicamento. Esse dado será avaliado em uma maior coorte para que haja maior entendimento e comprovação do papel desses eventos de splicing alternativo ao diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, R., Hsyu, P.H. Clinical Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Bosutinib. **Clin. Pharmacokinet.** v. 55, p. 1191-1204, out, 2016.

Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Kantarjian, H.M., Kim, D.W., Larson, R.A., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Martinelli, G., Mayer, J., Muller, M.C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J.P., Rousselot, P., Saglio, G., Saubele, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J.L., Goldman, J.M., Hehlmann, R. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, p. 872–884, ago, 2013.

Berman, E., Jhanwar, S., Hedvat, C., Arcila, M.E., Wahab, O.A., Levine, R., Maloy, M., Ma, W., Albitar, M. Resistance to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia and the splice variant BCR-ABL1(35INS). **Leuk. Res.** v. 49, p. 108-112, out, 2016.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Herrmann, R., Lynch, K.P., Hughes, T.P. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) RESISTANCE. **Blood**. v. 99, p. 3472-3475, 2002.

Chereda, B., Melo, J.V. Natural course and biology of CML. **Ann. Hematol.** v. 94, p. 107-121, abr, 2015.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nat. Protoc.** v. 1, p. 581–585, 2006.

Chu, S.C., Tang, J.L., Li, C.C. Dasatinib in chronic myelogenous leukemia. **N.Engl. J. Med.** v. 355, p. 1062, 2006.

Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gatterman, N., et al., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fisher, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R.A. Five year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia, **N. Engl. J. Med.** v. 355, p. 2408–2417, dez, 2006.

Fava, C., Rege-Cambrin, G., Saglio, G. The choice of first-line chronic myelogenous leukemia treatment. **Ann. hematol.** v. 94, p.123-131, abr, 2015.

Gaillard, J.B., Arnould, C., Bravo, S., Donadio, D., Exbrayat, C., Jourdan, E., Reboul, D., Chiesa, J., and Lavabre-Bertrand, T. Exon 7 deletion in the bcr-abl gene is frequent in chronic myeloid leukemia patients and is not correlated with resistance against imatinib. **Mol. Cancer Ther.** v. 9, p. 3083–3089, 2010.

Grove, C.S., Follows, G.A., Erber, W.N. Incidental finding of lymphocytosis in an asymptomatic patient. **BMJ.** v. 338, p. 2119, 2009.

Gruber, F.X., Lundán, T., Goll, R., Silye, A., Mikkola, I., Rekvig, O.P., Knuutila, S., Remes, K., Gedde-Dahl, T., Porkka, K., Hjorth-Hansen, H. BCR-ABL isoforms associated with intrinsic or acquired resistance to imatinib: more heterogeneous than just ABL kinase domain point mutations? **Med. Oncol.** v. 29, p. 219–226, mar, 2012.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell.** v. 144, p. 646-674, mar, 2011.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. “O que é câncer?” 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 22 novembro 2018.

Instituto Nacional do Câncer. “**INCA estima que haverá cerca de 600 mil casos novos de câncer em 2018**”. 05 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/sala_imprensa/releases/2018/inca-estima-havera-cerca-600-mil-novos-casos-cancer-2018>. Acesso em: 29 novembro 2018.

Jabbour, E., Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Am. J. of Hematol.** v. 93, p. 442-459, dez 2017.

Kuan, J.W., Su, A.T., Leong, C.F., Osato, M., Sashida, G. Systematic review of pre-clinical chronic myeloid leukemia. **Intl. J. Hematol.** v. 108, p. 465-484, nov, 2018.

Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. Neoplasia. **Robbins Patologia Básica.** 9 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2013, p. 161-214.

Lee, T.S., Ma, W., Zhang, X., Giles, F., Cortes, J., Kantarjian, H., and Albitar, M. BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. **Mol. Cancer Ther.** v. 7, p. 3834–3841, 2008.

Meggyesi, N., Kalmár, L., Fekete, S., Masszi, T., Tordai, A., Andrikovics, H. Characterization of ABL exon 7 deletion by molecular genetic and bioinformatic methods reveals no association with imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. **Med. Oncol.** v. 29, p. 2136–2142, 2012.

National Câncer Institute - NIH. “**What is câncer?**” 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 27 novembro 2018.

National Câncer Institute - NIH. “**Review: Introduction to Leukemia**” 2018. Disponível em: <<https://training.seer.cancer.gov/leukemia/intro/review.html>>. Acesso em: 27 novembro 2018.

National Câncer Institute - NIH. “**Types of Leukemia**” 2018. Disponível em: <<https://training.seer.cancer.gov/leukemia/intro/types.html>>. Acesso em: 27 novembro 2018.

Nowell, P.C., Hungerford, D.A. A minute chromossome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**. v. 142, p. 1497, 1960.

O’Hare, T., Zabriskie, M.S., Eide, C.A., Agarwal, A., Adrian, L.T., You, H., Corbin, A.S., Yang, F., Press, R.D., Rivera, V.M., Toplin, J., Wong, S., Deininger, M.W., Druker, B.J. The BCR-ABL35INS insertion/truncation mutant is kinase-inactive and does not contribute to tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. **Blood**. v. 118, p. 5250–5254, 2011.

Organização Mundial da saúde - OMS (WHO). “**What is cancer?**” 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 22 novembro 2018.

Rachin, J.P., Deininger, M., Abboud, C.N., Altman, J.K., Berman, E., Bhatia, R., Bhatnagar, B., Curtin, P., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Hobbs, G., Jagasia, M., Kantarjian, H.M., Maness, L., Metheny, L., Moore, J.O., Pallera, A., Pancari, P., Patnaik, M., Purev, E., Rose, M.G., Shah, N.P., Smith, B.D., Snyder, D.S., Sweet, K.L., Talpaz, M., Thompson, J., Yang, D.T., Gregory, K.M., Sundar, H. Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J. Natl. Compr. Canc. Netw**. v. 16, p. 1108-1135, 2018.

Soverini, S. Hochhaus, A., Nicolini, F.E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., Pane, F., Muller, M.C., Ernst, T., Rosti, G., Porkka, K., Baccarani, M., Cross, N.C., Martinelli, G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. **Blood**. v. 118, p. 1208-1215, ago, 2011.

Strhakova, L., Bujalkova, M.G., Hojsikova, I., Lukackova, R., Behulova, R., Mistrik, M., Repiska, V. Use of direct sequencing for detection of mutations in the BCR-ABL kinase domain in Slovak patients with chronic myeloid leukemia. **Neoplasma**. v. 58, p. 548–553, 2011.

Yuda, J., Miyamoto, T., Odawara, J., Ohkawa, Y., Semba, Y., Hayashi, M., Miyamura, K., Tanimoto, M., Yamamoto, K., Taniwaki, M., Akashi, K. Persistent detection of alternatively spliced BCR-ABL variant results in a failure to achieve deep molecular response. **Cancer Sci**. v. 108, p. 2204-2212, nov, 2017.