

PAULO VILLAS BÔAS DE CARVALHO

***O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA COMO
TERAPÊUTICA PARA PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA***

CAMPINAS

2003

PAULO VILLAS BÔAS DE CARVALHO

**O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA COMO
TERAPÊUTICA PARA PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica*

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

CAMPINAS

2003

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	unicamp C253t
V	EX
TOMBO BC	55439
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/08/03
Nº CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CM00158594-2

BIBID 298903

C253t

Carvalho, Paulo Villas Bôas de

O Transplante autólogo de medula óssea como terapêutica para pacientes com leucemia mielóide crônica / Paulo Villas Bôas de Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientadores : Carmen Silvia Passos Lima, Cármino Antônio de Souza

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Interferon. 2. Hidroxiuréia. 3. Citogenética. I. Carmen Silvia Passos Lima. II. Cármino Antônio de Souza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa.Dra. Carmen Silvia Passos Lima*

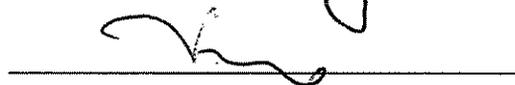


Membros:

1. Professor Doutor Frederico Luiz Dulley



2. Professor Doutor Fernando Ferreira Costa



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/03

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) cujo apoio financeiro possibilitou a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, pela orientação e principalmente pelo comprometimento sério e constante, que possibilitou o término deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e à Profa. Dra. Irene Lorand-Metzle pelo apoio recebido durante a realização do projeto e no atendimento ambulatorial aos pacientes.

Ao Dr. José Francisco Marques Jr., ao Eduardo e à Marluce, do Setor de Aféreses do Hemocentro, que com a presteza das coletas, possibilitou a rápida inserção dos pacientes.

Ao Dr. Francisco Aranha, Dr. Afonso Vigorito, Dra. Kátia Eidi, Dra. Kátia Pagnano, Dra. Gislaine Oliveira e aos colegas e residentes da Hematologia pelo apoio recebido.

À Ligia, Silvia e Sofia, do laboratório de histocompatibilidade pelo esforço e rapidez na realização das tipagens HLA.

A Moniquinha e a Hélia pela presteza com os hemogramas.

A Maristela, ao Gustavo, a Manoela e a Natasha, dos laboratórios de citogenética e biologia molecular pela ajuda prestada.

Especial agradecimento à Cida, que com sua capacidade de trabalho, muito colaborou com esta dissertação.

À Arlete, à Nicete e à Sandrinha, pelo trabalho de “secretaria” e pelas inúmeras formatações dos relatórios ao longo destes anos.

Ao Roberto pela análise estatística e pela amizade.

Aos meus pais que não mediram esforços para que eu pudesse começar, e aos meus filhos Paula, Júlia, Thaís e André que saberão entender um dia algumas das ausências.

À Sandra, minha companheira incondicional e minha razão, por absolutamente tudo.

Muito obrigado.

	PÁG.
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xii</i>
INTRODUÇÃO	14
1. Considerações gerais.....	15
2. Aspectos clínicos.....	15
3. Cromossomo Philadelphia e o gene BCR-ABL.....	16
4. Terapêutica.....	18
4.1. Medicamentosa.....	18
4.2. Transplante de medula óssea.....	19
OBJETIVOS	22
CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
1. Aspectos Clínicos.....	25
1.1. Avaliação Clínica.....	25
1.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene BCR-ABL.....	26
1.2.1. Avaliação do cromossomo Philadelphia por citogenética.....	26
1.2.2. Avaliação do gene BCR-ABL por meio do método FISH.....	28
1.2.3. Avaliação do gene BCR-ABL por meio da RT-PCR.....	30
2. Procedimentos que precederam o transplante autólogo de medula óssea.....	34
2.1. Coleta de célula precursora periférica para criopreservação.....	34
3. Procedimentos relacionados ao transplante autólogo de medula óssea.....	35
3.1. Mobilização e obtenção da célula precursora periférica.....	35
3.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene BCR-ABL em célula precursora periférica do produto da leucaférese.....	36
3.3. Transplante autólogo de medula óssea.....	37
4. Seguimento clínico e laboratorial após o transplante autólogo de medula óssea....	38
4.1. Administração do interferon alfa.....	38
4.2. Avaliação da resposta hematológica.....	39
4.3. Avaliação da resposta citogenética.....	39

4.4. Avaliação da resposta molecular.....	39
4.5. Condição clínica no momento da análise do estudo.....	40
5. Aspectos éticos.....	40
6. Análise Estatística.....	40
RESULTADOS	41
1. Aspectos Clínicos.....	42
1.1. Avaliação Clínica.....	42
1.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene BCR-ABL.....	46
2. Procedimentos que precederam o transplante autólogo de medula óssea.....	51
2.1. Coleta da célula precursora periférica para criopreservação.....	51
3. Procedimentos relacionados ao transplante autólogo de medula.....	52
3.1. Mobilização e obtenção da célula precursora periférica.....	52
3.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene BCR-ABL em célula precursora periférica do produto da leucaférese.....	55
3.3. Transplante autólogo de medula óssea.....	55
4. Seguimento clínico e laboratorial após o transplante autólogo medula óssea.....	57
4.1. Administração de interferon alfa.....	57
4.2. Avaliação da resposta hematológica.....	57
4.3 Avaliação da resposta citogenética.....	60
4.4. Avaliação da resposta molecular.....	61
4.5. Condição clínica no momento da análise do estudo.....	63
DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

LMC	Leucemia mielóide crônica
MO	Medula óssea
HU	Hidroxiuréia
IFN	Interferon 2 alfa
Ph	Philadelphia
KDa	Quilodaltons
ARA-C	Arabinosil-citosina
TMO-alo	Transplante de medula óssea alogênico
TMO-auto	Transplante de medula óssea autólogo
G-CSF	Fator estimulador do crescimento de células da linhagem granulocítica
CPP	Célula precursora periférica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
RT-PCR	Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
EBMT	Grupo Europeu de Transplante de Medula Óssea
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
DNA	Acido desoxirribonucléico
µl	Microlitro
DAPI	Diamino fenilindole
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
TRITC	Isotiocianato de rodamina
RNA	Acido ribonucléico
c-DNA	Acido desoxirribonucléico complementar
K562	Linhagem celular gene <i>BCR-ABL</i>
HL60	Linhagem celular desprovida do gene <i>BCR-ABL</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
PE	Ficoeritrina
CD34+	Antígeno de superfície da célula hematopoética precursora
MINI-ICE	Idarrubicina, etoposido, arabinosil-citosina
DP	Desvio padrão
%	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
TABELA 1: Representação esquemática dos possíveis resultados a serem obtidos na avaliação do gene BCR-ABL por RT-PCR.....	33
TABELA 2: Esquema terapêutico com IFN para pacientes que receberam o TMO auto.....	38
TABELA 3: Critérios de resposta citogenética para pacientes que receberam o TMO auto.....	39
TABELA 4: Características clínicas, do sangue periférico e da MO dos pacientes avaliados ao diagnóstico.....	45
TABELA 5: Porcentagens de metáfases e núcleos interfásicos anormais, e resultados da pesquisa do gene <i>BCR-ABL</i> , por meio da análise citogenética, método FISH e RT-PCR, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico.....	47
TABELA 6: Coleta da CPP de pacientes ao diagnóstico.....	51
TABELA 7: Esquemas de mobilização da CPP e resultados obtidos.....	53
TABELA 8: Números de células CD34 ⁺ , porcentagens de metáfases e núcleos interfásicos anormais e resultados da pesquisa do gene <i>BCR-ABL</i> , por meio da análise citogenética, método FISH e RT-PCR, em CPP dos produtos de leucaférese utilizados para o TMO-auto.....	56

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
FIGURA 1: Representação esquemática dos genes BCR e ABL.....	17
FIGURA 2: Representação esquemática da sonda LSI ASS-ABL.....	28
FIGURA 3: Representação esquemática da sonda LSI BCR.....	29
FIGURA 4: Representação esquemática dos resultados da hibridização - método FISH.....	32
FIGURA 5: Representação esquemática do procedimento de mobilização da célula precursora periférica com mini-ICE.....	35
FIGURA 6: Representação esquemática o procedimento de condicionamento para o TMO-auto.....	37
FIGURA 7: Representação esquemática da distribuição dos pacientes de acordo com a terapêutica a ser administrada.....	43
FIGURA 8: Cariótipo com a translocação t(9,22).....	48
FIGURA 9: Núcleo interfásico normal e com o gene BCR-ABL.....	49
FIGURA 10: Produtos da RT-PCR em gel de agarose 2%.....	50
FIGURA 11: Representação esquemática dos resultados da mobilização da CPP.....	54
FIGURA 12: Representação esquemática do início e duração do tratamento com IFN dos pacientes após o TMO-auto.....	58
FIGURA 13: Distribuição dos pacientes de acordo com a resposta hematológica obtida após o TMO-auto.....	59
FIGURA 14: Box-plots da distribuição dos pacientes de acordo com as porcentagens de cromossomo Philadelphia em amostras de MO obtidas após o TMO-auto.....	61
FIGURA 15: Box-plots da distribuição dos pacientes de acordo com as porcentagens do gene <i>BCR-ABL</i> pelo método FISH em amostras de MO obtidas após o TMO-auto.....	62



RESUMO

INTRODUÇÃO: O papel do transplante autólogo de medula óssea (TMO-auto) para o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC) permanece incerto. **PACIENTES E MÉTODOS:** Onze pacientes com LMC foram indicados para receber o TMO-auto com célula precursora periférica (CPP) mobilizada até seis meses após o diagnóstico, com o mini-ICE (três pacientes) ou a hidroxiuréia (oito pacientes), e obtida por leucaférese. Os pacientes receberam o interferon alfa (IFN) após o TMO-auto. Amostras de medula óssea (MO) obtidas ao diagnóstico e durante o seguimento foram avaliadas por meio da análise citogenética convencional, do método de hibridização “in situ” com fluorescência (FISH) e por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), para a identificação e a quantificação do cromossomo Philadelphia (Ph) e do gene *BCR-ABL*. **RESULTADOS:** A mediana de seguimento dos pacientes após o TMO-auto foi de 22,7 meses (variação, 0,7-49,1). Um paciente evoluiu para o óbito durante o período de aplasia da MO após a mobilização da CPP. Dez pacientes foram transplantados com CPP com o Ph⁺ (mediana: 100,0%; variação: 25,0-100,0) e com o gene *BCR-ABL* (mediana: 68,2%; variação: 27,3-83,5). Um paciente evoluiu para óbito durante a aplasia da MO determinada pelo condicionamento para o TMO-auto. Oito pacientes (88,9%) obtiveram resposta hematológica, sete (77,8%) resposta citogenética, todos (100,0%) obtiveram resposta citogenética molecular por FISH e um paciente (10,0%) obteve resposta molecular por RT-PCR. A mediana das porcentagens de cromossomo Ph, em amostras de MO obtidas seis meses após o TMO-auto (78,0%), foi menor do que a observada ao diagnóstico (100,0%; $P=0,035$). Foram também menores as medianas das porcentagens de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL* em amostras de MO obtidas três, seis e nove meses após o TMO-auto (4,0%, 7,3% e 15,7%, respectivamente), em comparação a observada ao diagnóstico (82,5%; $P<0,050$). Ao final do estudo, nove pacientes estavam vivos, em fase crônica da doença, sendo que quatro deles apresentavam respostas hematológica, citogenética e citogenética molecular. **CONCLUSÃO:** O TMO-auto em associação com o IFN possibilita a obtenção de respostas hematológica, citogenética, citogenética molecular e molecular para pacientes com fases iniciais da LMC.



ABSTRACT

INTRODUCTION: The role of the autologous stem cell transplantation (ASCT) as a treatment procedure for chronic myeloid leukaemia (CML) patients remains uncertain. **PATIENTS AND METHODS:** Eleven CML patients were indicated to receive ASCT with peripheral blood progenitor cells (PBPCs) mobilised within six months from diagnosis with mini-ICE (three patients) or hydroxyurea (eight patients) and obtained by leukapheresis. The interferon alpha (IFN) was administered to patients after ASCT. Bone marrow (BM) samples obtained at diagnosis and during evaluations after ASCT were analysed by cytogenetics, fluorescence “in situ” hybridisation (FISH) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), with the purpose of identifying and quantifying the Philadelphia chromosome (Ph⁺) and the *BCR-ABL* gene. **RESULTS:** The median follow-up of patients after ASCT was 22.7 months (range: 0.7-49.1). One patient died during the aplastic period determined by the mobilisation regimen of PBPCs. Ten patients received ASCT with PBPCs with Ph⁺ (median: 100.0%; range: 25.0-100.0) and FISH⁺ cells (median: 68.2%; range: 27.3-83.5). One patient died during the aplastic phase due to BM conditioning regimen. Eight patients (88,9%) achieved haematological response, seven (77.8%), all of them (100.0%) molecular cytogenetics response by FISH, and one unique patient (10,0%) achieved molecular response by RT-PCR. The median percentage of Ph metaphases in BM samples obtained after three months of ASCT (78.0%) was lower than the percentage obtained at diagnosis (100,0%; *P*=0.035). The median percentages of FISH⁺ interphase nuclei obtained after three, six, and nine months after ASCT (4.0%, 7.3% and 15.7%, respectively) were also lower than that obtained at diagnosis (82,5%; *P*<0.050). At the end of the study, nine patients were alive, in chronic phase of CML. Four of them presented haematological, cytogenetics, and cytogenetics responses. **CONCLUSION:** The ASCT associated with IFN therapy results in haematological, cytogenetics, molecular cytogenetics and molecular responses in early chronic phase of CML’s patients.



INTRODUÇÃO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A primeira descrição de um caso de leucemia mielóide crônica (LMC) foi publicada na Escócia, por John Hughes Bennett, em outubro de 1845. Apenas cinco semanas depois, Robert Virchow, em Berlin, publicou, um outro caso de paciente com a doença. Estas publicações e estes pesquisadores são considerados marcos na história das leucemias. Reuniram informações clínicas e anatomopatológicas e propuseram as primeiras descrições fisiopatológicas da doença (GEARY, 2000).

A incidência da LMC em países do hemisfério norte é de 1,6 casos por 100.000 habitantes por ano, com discreto predomínio em pacientes do sexo masculino (LEE, 2000).

Segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer, a incidência das leucemias agudas e crônicas, em conjunto, no ano de 2002, foi de cerca de 7,47 casos por 100.000 habitantes do Brasil (INCA, 2002). Em nosso conhecimento, não há dados sobre a incidência da LMC em nosso país.

2. ASPECTOS CLÍNICOS

A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal, com origem na célula precursora multipotencial da medula óssea (MO), que determina o aumento da produção de granulócitos (FIALKOW, et al., 1977). Ela ocorre principalmente em pacientes com idade entre 40 e 50 anos, com discreto predomínio em indivíduos do sexo masculino, que mantém com os do sexo feminino uma relação de 1,3:1 (LICHTMAN & LIESVELD, 2001).

A doença evolui habitualmente em três fases clínicas distintas. A primeira fase, denominada crônica, é caracterizada por um curso clínico indolente e tem duração aproximada de quatro a cinco anos. Os sintomas são relacionados principalmente ao aumento do tamanho do baço, como o empachamento pós-prandial e a sensação de peso no abdome (SAVAGE et al., 1997). São controlados com relativa facilidade por medicamentos como a hidroxiuréia (HU) ou o bussulfano. A segunda fase, denominada acelerada, é caracterizada por deterioração do estado geral, com emagrecimento, dores ósseas, febre e sudorese noturna. A duração é de cerca de seis meses e o controle medicamentoso é insatisfatório (LICHTMAN & LIESVELD, 2001). A última fase, denominada blástica,

assemelha-se à leucemia aguda dos pontos de vista clínico e laboratorial. Durante esta fase, a resposta a regimes quimioterápicos agressivos é apenas eventual e o óbito ocorre em três a seis meses (KANTARJIAN et al., 1985; LICHTMAN & LIESVELD, 2001).

Esta evolução inexorável da doença para o óbito, fez com que inúmeros investigadores avaliassem diversos fatores clínicos e do sangue periférico, com a finalidade de identificar fatores prognósticos que permitissem um melhor manejo dos pacientes (GOMEZ et al., 1981; KANTARJIAN et al., 1990). Os mais utilizados na prática diária são o índice de Sokal (SOKAL et al., 1984) e o Euro (HASFORD et al., 1998).

O índice de Sokal considera a idade, o tamanho do baço, o número de plaquetas e a porcentagem de blastos no sangue periférico. Já o índice EURO acrescenta as porcentagens de basófilos e eosinófilos do sangue periférico aos parâmetros considerados pelo índice de Sokal. Os dois índices possibilitam a identificação de três grupos de pacientes com riscos relativos distintos relacionados à sobrevida: os de baixo risco, os de risco intermediário e os de alto risco. As sobrevidas medianas para os grupos de baixo, intermediário e alto risco foram de 105, 76 e 45 meses com o índice de Sokal e de 105, 65 e 45 meses com o índice EURO, respectivamente (HEHLMANN, et al., 1997; BONIFAZI, et al., 2000; THOMAS, et al., 2001).

3. O CROMOSSOMO PHILADELPHIA E O GENE *BCR-ABL*

Um grande interesse sobre a doença teve início com a descrição, por NOWELL & HUNGERFORD (1960), da ocorrência de um pequeno cromossomo anormal em células leucêmicas de portadores de LMC. Ficou conhecido como cromossomo Philadelphia (Ph) em homenagem à cidade da sua descoberta (HEIM & MITELMAN, 1995). Apenas em 1973, ficou conhecido que o cromossomo Ph resulta da translocação entre as porções terminais dos braços longos dos cromossomos 9 e 22, com pontos de quebra nas regiões 9q34 e 22q11 (ROWLEY, 1973; PRAKASH & YUNIS, 1984).

Inúmeras publicações dos anos seguintes, indicaram que a translocação determina a fusão do gene *ABL* do cromossomo 9 com o gene *BCR* do cromossomo 22, constituindo o gene quimérico *BCR-ABL*, locado no cromossomo 22 (LION, 1994; LION, 1996; MELO, 1996). Este gene determina, na maior parte dos casos, a produção de uma

proteína com peso molecular de 210 quilodaltons (kDa), a p210. Em alguns casos de LMC, com pontos de quebra em outras regiões do gene *BCR*, ocorre a produção de uma proteína com 190 kDa, a p190 ou mais raramente com 230 kDa, a p230 (RADICH, et al., 1994; RADICH, 1996). Todas essas proteínas apresentam elevada atividade tirosina quinase, com papel fundamental na proliferação celular (MELO, 1996).

A representação esquemática dos genes *BCR* e *ABL*, dos pontos de quebra cromossômicos e das proteínas produzidas pelo gene *BCR-ABL* está apresentada na Figura 1.

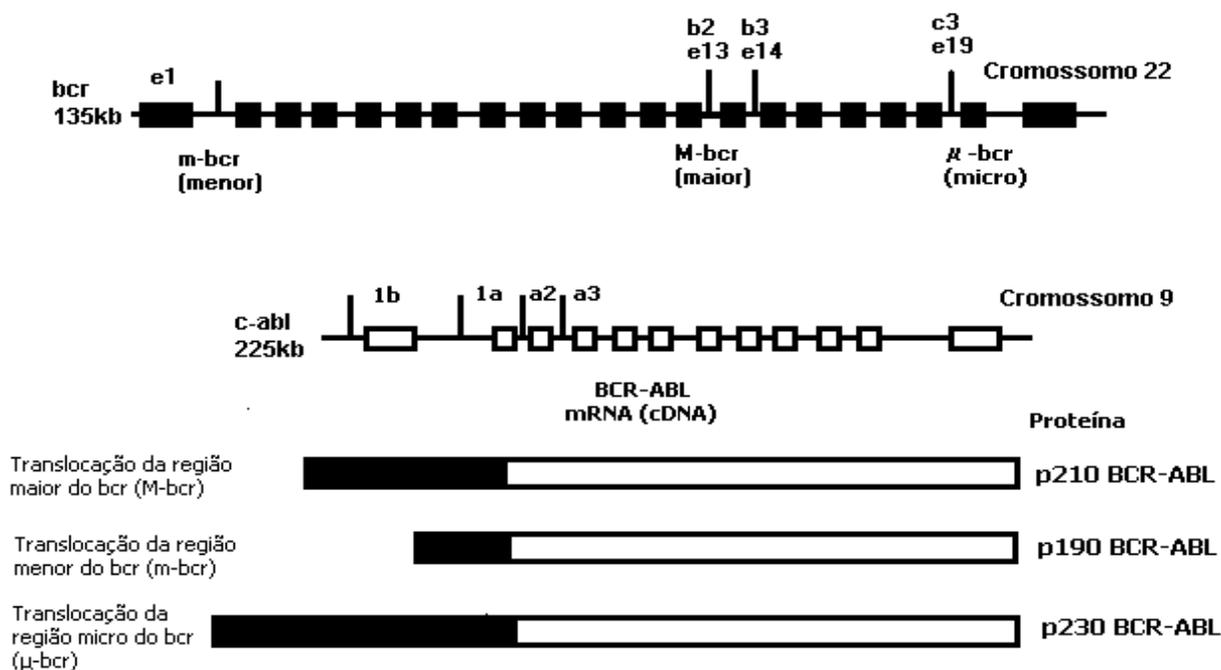


Figura 1. Representação esquemática dos genes *BCR* e *ABL*, dos pontos de quebra cromossômicos e das proteínas originadas da fusão *BCR-ABL*

A evidência direta de que a doença é determinada por esta anormalidade gênica resultou do estudo conduzido por DALEY & VAN ETTEN (1990). O transplante em ratos, de célula precursora trans-infectada com um retrovírus, que expressava o gene *BCR-ABL*, produziu uma doença similar a LMC.

O cromossomo Ph foi identificado em cerca de 90% dos pacientes com LMC. Em 5% deles, a anormalidade cromossômica foi encontrada em meio a translocações complexas comprometendo três ou mais cromossomos, sempre incluindo o 9 e o 22. O cromossomo Ph não foi identificado por meio da análise citogenética convencional em cerca de 10% dos pacientes com LMC. Entretanto, o gene *BCR-ABL* foi identificado por meio do método de hibridização “in situ” com fluorescência, método FISH, e da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em mais da metade desses casos, indicando que de fato, está associado com a origem da doença. Assim, passou a ser considerado um marcador da LMC (LION, 1996; MELO, 1996).

4. TERAPÊUTICA

4.1. Medicamentosa

O tratamento convencional com a HU (STEVENS, 1999) ou o busulfano foi suficiente para o controle dos sintomas, mas não interferiu com a evolução natural da doença (KANTARJIAN et al., 1985; HEHLMANN et al., 1993).

Já o tratamento com o interferon alfa, IFN, (ITALIAN..., 1995; ALLAN et al., 1995; WETZLER et al., 1995; BONIFAZI et al., 2001; GOLDMAN & DRUKER, 2001; GOLDMAN, 2002; KIRKWOOD, 2002) ou com o IFN em associação com a arabinosil-citosina, ARA-C (GUILHOT et al., 1997; BONIFAZI et al., 2001; BACCARANI et al., 2002) promoveu resposta hematológica, definida como a manutenção por três meses, do número de leucócitos menor que $10,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, concentração da hemoglobina maior que 10g/dl e número de plaquetas menor do que $500,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, em mais de 80% dos pacientes em fase crônica da doença. Vale ainda ressaltar, que 10% a 25% deles obtiveram resposta citogenética, definida como a diminuição do número de cromossomos Ph ou mesmo a não identificação desta anormalidade cromossômica nas amostras examinadas (BONIFAZI et al., 2001). Os resultados destes estudos indicaram que apenas os pacientes que obtiveram resposta citogenética após o tratamento com IFN ou IFN e ARA-C apresentaram maior sobrevida do que a descrita tradicionalmente para a doença. Entretanto, vale também comentar que remissões moleculares, definidas como a ausência do gene *BCR-ABL*, foram observadas em pacientes que receberam os medicamentos (KAEDA et al., 2002).

HEHLMANN et al. (1994) não observaram diferenças de sobrevida entre os pacientes tratados com IFN e aqueles tratados com HU ou bussulfano. Ainda, apesar dos resultados citogenéticos obtidos com o tratamento com IFN ou IFN associado ao ARA-C, não ocorreram diferenças na sobrevida dos pacientes (BACCARANI et al., 2002) .

Mais recentemente, foi descrito um fármaco que atua como inibidor da atividade tirosina quinase da proteína produzida pelo gene *BCR-ABL*, o mesilato de imatinibe (DRUKER, et al., 2001; O'BRIEN & DRUCKER, 2002; SAWYERS et al., 2002;). Os resultados de estudos com 454 pacientes com a fase crônica da doença, que falharam ao uso do IFN, mostraram respostas hematológicas em 95% dos pacientes, sendo que 60% deles apresentaram a diminuição do número de cromossomos Ph (KANTARJIAN et al., 2002). Ainda, os resultados de um estudo multicêntrico indicaram a superioridade do mesilato de imatinibe em relação ao IFN associado ao ARA-C, no tratamento de pacientes com LMC (DRUKER, 2001). Também, vale comentar que remissões moleculares foram obtidas com o medicamento (KAEDA et al., 2002).

Entretanto, é importante comentar que até o momento, não foi observado o aumento da sobrevida global dos pacientes tratados com o mesilato de imatinibe. Ainda, nem todos os pacientes respondem a esta terapêutica. Cerca de 10% dos pacientes em fases crônicas tardias são primariamente resistentes ao medicamento (TSAO et al., 2002). Resistências adquiridas por mecanismos ainda desconhecidos, foram também descritas em pacientes que apresentaram uma resposta inicial ao tratamento (DRUCKER et al., 2001)

No Brasil, a liberação do medicamento está regulamentada por uma portaria do Ministério da Saúde (SAS/MS 431, 03/10/2991). Apenas os portadores de LMC em fase crônica que não tenham obtido resposta citogenética após seis meses de IFN, aqueles com efeitos colaterais inaceitáveis durante o IFN e aqueles em crise blástica podem receber o medicamento.

4.2. Transplante de medula óssea

A única possibilidade concreta de cura para a doença, no momento, é o transplante alogênico de MO (TMO-alo). Este possibilita sobrevida livre de doença em cinco anos para 30 a 80% dos pacientes com LMC (GOLDMAN et al., 1993; CLIFT et al.,

1994; CLIFT, 1995; HOROWITZ et al.,1996; GALE et al., 1998; CWYNARSKI, 2002). Entretanto, o procedimento só pode ser oferecido a pacientes com idade menor do que 55 anos e que tenham doador compatível no sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA). A disponibilidade de doador compatível é realidade para menos da metade do número de pacientes com a doença (CARELLA et al., 1997), o que torna a busca de terapêuticas alternativas para os demais, um procedimento obrigatório.

A possibilidade da utilização do transplante autólogo de MO (TMO-auto), como opção de tratamento para os pacientes com LMC, foi considerada a partir da identificação de precursores hematológicos normais coexistindo com precursores com o cromossomo Ph, particularmente em pacientes em fase inicial da doença (COULOMBEL et al., 1983; BARNETT et al., 1994; FRASSONI et al., 1999a ; FRASSONI et al., 1999b).

Um interesse maior pelo procedimento foi observado com a descrição da obtenção de grande número de célula precursora normal, após tratamento quimioterápico dos pacientes com a HU (JOHNSON et al., 1997; PRATT et al., 1998) ou com a idarrubicina, o ARA-C e o etoposide, seguido pela administração do fator estimulador do crescimento de colônias da linhagem granulocítica, G-CSF (CARELLA et al., 1993; WALLER, 1998).

A possibilidade da utilização da célula precursora periférica (CPP) como fonte para o TMO-auto tornou o procedimento ainda mais animador para pacientes com doenças hematológicas, uma vez que parece ser tão eficaz quanto o transplante com célula precursora obtida da MO e apresentar ainda, as vantagens de ser menos agressivo para o paciente e poder ser repetido tantas vezes quanto forem necessárias para a obtenção do número de células desejadas (VERFAILLIE et al., 1998).

O TMO-auto realizado com célula precursora obtida do sangue periférico ou MO, após mobilização “in vivo” com quimioterápicos e citocinas, determinou pelo menos temporariamente, a restauração da hematopoiese normal em pacientes com LMC (KORBLING et al., 1981; REIFFERS et al., 1991; CARELLA et al., 1993; REIFFERS et al., 1994; HOYLE et al., 1994; BARNETT et al., 1994; CARELLA et al., 1997; BATHIA et al., 1997; BATHIA et al., 1997; CHALMERS et al., 1997; PIGNEUX et al., 2001; JOHNSON et al., 1997; PRATT et al., 1998; FISHER et al., 1998; WALLER et al., 1998;

APPERLEY et al., 1999; CARELLA et al., 1999; FRASSONI et al., 1999b; HEHLMANN et al., 2000; OLAVARRIA et al., 2000; MELONI et al., 2001; OLAVARRIA, 2002).

A quantificação do cromossomo Ph em células obtidas de amostras de MO de pacientes com LMC, que receberam o TMO-auto, foi utilizada para a identificação de doença residual. A doença residual pode também ser identificada por meio do método que utiliza a hibridização “in situ” com fluorescência, método FISH, e da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, RT-PCR, sendo que foram descritos como mais efetivos para esta determinação do que a análise citogenética convencional (MELO, 1996; WALLER et al., 1998; HESS et al., 2000).

A diminuição da porcentagem do cromossomo Ph (CARELLA et al., 1993; JOHNSON et al., 1997; PRATT et al., 1998) e do número de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, por FISH (DEWALD et al., 1998; HESS et al., 2000), em amostras de MO obtidas após o TMO-auto, bem como a ausência do gene *BCR-ABL*, por RT-PCR, nestas amostras (KAEDA et al., 2002) sugeriram que o procedimento poderia beneficiar os pacientes com a doença.

Entretanto o relativo pequeno número de pacientes incluídos na maioria dos estudos, o curto período de observação dos mesmos e o seguimento irregular dos pacientes, impossibilitaram a obtenção de conclusões consistentes sobre a eficácia do procedimento em pacientes com a doença.

Assim, um estudo prospectivo, randomizado, multicêntrico e internacional foi proposto pelo Grupo Europeu de Transplante de Medula Óssea, EBMT (EUROPEAN..., 1999). Segundo o protocolo um grupo de pacientes recebeu o IFN e o outro o TMO-auto e IFN.

Frente ao exposto, foram definidos os objetivos deste estudo.



OBJETIVOS

Foram estudados os pacientes portadores de LMC atendidos no ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da Universidade de Campinas (UNICAMP), que receberam terapêutica com o TMO-auto em associação com o IFN, tendo como objetivos:

- Avaliar as porcentagens de obtenção de respostas hematológica, citogenética, citogenética molecular e molecular após o procedimento e
- Avaliar a condição clínica dos mesmos ao final do estudo



*CASUÍSTICA E
MÉTODOS*

1. ASPECTOS CLÍNICOS

1.1. Avaliação clínica

Foram estudados, prospectivamente, os pacientes adultos com LMC, atendidos no Ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da Unicamp, no período de novembro de 1997 a outubro de 2002.

Os dados de identificação, como a idade e o sexo, as anormalidades do exame físico, o hemograma, o mielograma, a biópsia de MO, o cariótipo e a pesquisa do gene *BCR-ABL* foram obtidos durante a primeira consulta médica.

As contagens dos números globais de células do sangue foram realizadas com a utilização de contadores automatizados de células do sangue (Cell-Dyn 1600, Cell-Dyn 1700, Abbott; Advia 120, Bayer). Os números dos diferentes tipos de leucócitos foram obtidos por contagem manual de 200 leucócitos em esfregaço de células do sangue periférico corados pelo Leishman.

Os índices de Solkal e Euro foram obtidos de acordo com os critérios propostos por SOKAL et al. (1984) e HASFORD et al. (1998), respectivamente.

O estudo citológico da MO foi realizado em esfregaços de MO obtidos por punção aspirativa da crista ilíaca posterior e corados pelo Leishman. As porcentagens dos diferentes tipos celulares foram obtidas por meio da contagem de duzentas células (DACIE & LEWIS, 1984). O estudo histológico da MO foi realizado em cortes de fragmentos de MO obtidos de crista ilíaca posterior, incluídos em parafina e corados pela Hematoxilina e Eosina (LUNA, 1968).

O cariótipo foi obtido por meio da análise citogenética convencional e a pesquisa do gene *BCR-ABL* foi realizada por meio do método FISH e da transcrição reversa e da reação em cadeia da polimerase, de acordo com os métodos descritos a seguir, nas sessões específicas.

O diagnóstico da doença foi estabelecido por meio da análise do sangue periférico e dos resultados dos estudos citológico e histológico da MO, do cariótipo e da identificação do gene *BCR-ABL* (RADICH, 1996), de acordo com os critérios apresentados no Anexo 1.

Foram inicialmente excluídos do estudo os pacientes com baixo nível sócio-econômico ou com condições clínicas insatisfatórias, que não permitiam a adesão ao tratamento proposto e aqueles que optaram pelo seguimento em outro serviço.

Foi realizada a busca de doadores de MO compatíveis em irmãos consangüíneos dos pacientes com idade menor ou igual a 55 anos. Aqueles com doador de MO foram encaminhados para receber o TMO-alo.

Aqueles sem doador de MO, com idade maior ou igual a 18 anos ou menor ou igual a 65 anos, cujo diagnóstico havia sido feito em período menor do que seis meses e que apresentavam a doença em sua fase crônica, foram convidados a participar do estudo multicêntrico proposto pelo EBMT, que se propôs a avaliar de forma prospectiva e randomizada dois protocolos terapêuticos: um com a utilização do TMO-auto associado ao IFN e outro com a utilização somente do IFN (EUROPEAN..., 1999).

Os dados dos pacientes que aceitaram participar do estudo proposto foram encaminhados para o escritório do EBMT em Londres, onde foi realizado o sorteio para a escolha da terapêutica a ser administrada. Os pacientes foram distribuídos de acordo com o encaminhamento terapêutico final.

Apenas os pacientes que receberam o TMO-auto em associação com o IFN alfa constituíram a casuística do presente estudo. Estes foram distribuídos de acordo com as características clínicas, do sangue periférico e com os índices de Sokal e EURO.

Dez indivíduos normais, doadores de MO, forneceram uma alíquota adicional do produto de suas doações para avaliar a eficácia da hibridização pelo método FISH e, desta forma, constituíram o grupo controle do estudo.

1.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene *BCR-ABL*

1.2.1. Avaliação do cromossomo Philadelphia por meio da análise citogenética convencional

A identificação e a quantificação do cromossomo Ph foram realizadas em amostras de MO de pacientes, colhidas ao diagnóstico, e de controles, colhidas no momento da doação da MO. Para os pacientes, foram também realizadas em amostras dos produtos

das leucaféreses utilizadas para o TMO-auto e em amostras da MO obtidas a cada três meses durante dezoito meses após o TMO-auto e a cada seis meses a partir desta data.

A técnica de cultura de células utilizada foi a descrita por SWANSBURY (1997). De forma sucinta, foi coletado 3 ml de MO em heparina dos pacientes e controles. As células obtidas foram cultivadas em meio de cultura (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino, por incubação a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 24 e 72 horas. Após estes períodos, 400 µl de demecolcine (1,0 µg/ml) foi adicionado à cultura durante 20 minutos. A seguir, as células foram tratadas com solução hipotônica de cloreto de potássio (0,075 mol/L) por 20 minutos. Para a fixação, o material foi centrifugado por três vezes a 1500 rpm durante dez minutos, em solução de metanol-ácido acético glacial (3:1). Parte dele foi distribuído em lâminas de vidro.

O material, a seguir, foi processado para a obtenção de bandas G com o uso de tripsina e EDTA (Sigma). A coloração utilizada foi a de Wright. Os cromossomos em metáfase e os núcleos interfásicos restantes foram conservados em freezer a -20°C, para análise posterior pelo método FISH.

As imagens dos cromossomos em metáfases foram captadas por câmera digital e analisadas em um sistema automatizado de análise, Cytovision versão 4.4, Applied Imaging Corporation (Santa Clara, CA, USA). Foram analisados todos os cromossomos em metáfase obtidos de pacientes e vinte cromossomos em metáfase obtidos de controles. Um número mínimo de dez cromossomos em metáfase foi exigido para a identificação do cariótipo. Os resultados desta análise foram descritos obedecendo-se às normas do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (MITELMAN, 1995).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com as porcentagens de cromossomos em metáfase com o cromossomo Ph, obtidas em amostras de MO ao diagnóstico, em amostras dos produtos das leucaféreses utilizadas para o TMO-auto e em amostras de MO obtidas a cada três meses durante dezoito meses após o TMO-auto e a cada seis meses após esta data.

1.2.2. Avaliação do gene *BCR-ABL* por meio do método FISH

Para o método FISH, foram utilizadas lâminas recém preparadas contendo núcleos interfásicos e cromossomos em metáfase, de amostras de MO de pacientes ao diagnóstico e de controles, de material fixado e congelado do laboratório de Citogenética do Hemocentro da UNICAMP. A avaliação por este método foi também realizada em núcleos interfásicos e cromossomos em metáfase de pacientes, em amostras dos produtos das aféreses utilizadas para o TMO-auto e de MO obtidas a cada três meses durante dezoito meses após o TMO-auto e a cada seis meses a partir desta data. O método FISH foi realizado com a utilização da sonda comercial LSI *BCR/ABL* ES 32-191022 (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), contendo as sondas LSI *ASS-ABL* e a LSI *BCR*.

As extensões das sondas, as regiões cromossômicas por elas cobertas e os pontos de quebra em cada cromossomo comprometido pela t(9;22) estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Os procedimentos inerentes ao método seguiram as especificações do fabricante das sondas. De forma sucinta, o ácido desoxirribonucléico (DNA) contidos nos preparados cromossômicos e núcleos interfásicos das lâminas foi desnaturado em solução a 70% de formamida/2xSSC (pH=7,0-8,0), a 76°C durante cinco minutos. Em seguida, o material foi desidratado por lavagens sucessivas em etanol a 70%, 85% e 100%, durante um minuto em cada concentração, à temperatura ambiente.

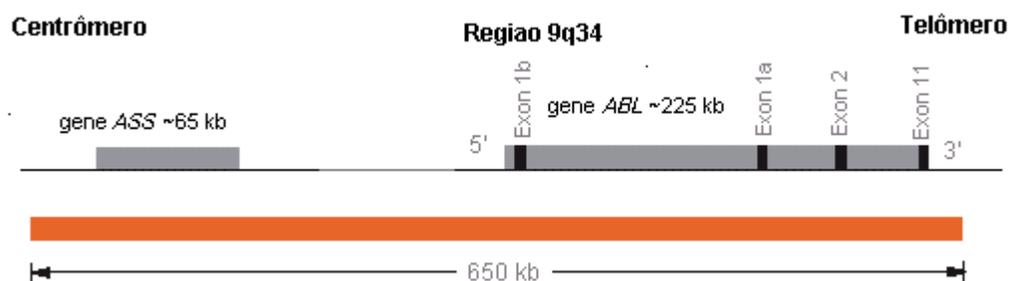


Figura 2. Representação esquemática da sonda LSI *ASS-ABL* marcada com fluoresceína de espectro vermelho

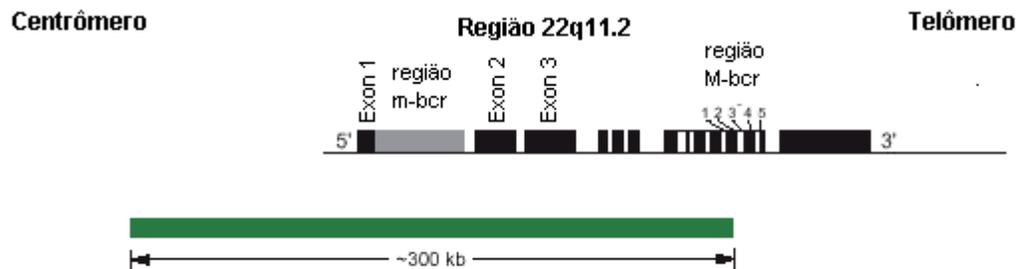


Figura 3. Representação esquemática da sonda LSI *BCR* marcada com fluoresceína de espectro verde

As sondas foram diluídas em tampão próprio e água estéril e a seguir desnaturadas a 76°C por cinco minutos. Imediatamente após a desnaturação, 10 µl da solução das sondas (5µl de cada sonda) foram aplicadas à lâmina com o preparado celular e em seguida cobertas com lamínula de vidro. As lâminas contendo os preparados celulares e cromossômicos e as sondas foram incubadas em câmara escura umedecida com solução a 50% de formamida/2xSSC a 37°C, por um período de 14-15 horas.

Após a incubação, a lamínula foi retirada e as lâminas foram lavadas para a remoção do excesso de sonda e fluorocromos, com três banhos consecutivos de solução a 50% de formamida/2xSSC (pH=7,0-8,0) a 46°C, por dez minutos cada e em um banho de 2xSSC (pH=7,0) a 46°C, também por dez minutos. Posteriormente, foram lavadas em solução de 2xSSC/Tween 20 (pH=7,0) a 46°C durante cinco minutos.

Após secagem em estufa aquecida a 37°C, os cromossomos em metáfase e os núcleos interfásicos receberam contra coloração com 10 µl de diamino fenilindole, DAPI, (125 ng/ml) e o material foi coberto com lamínula de vidro.

Os loci *ABL* foram visualizados como sinais fluorescentes vermelhos (um sinal para cada locus) e os *BCR* como sinais fluorescentes verdes (um sinal para cada locus). Os núcleos interfásicos e os cromossomos em metáfase foram visualizados em cor azul.

Cada núcleo interfásico ou metáfase recebeu uma classificação de acordo com o número e a localização dos sinais fluorescentes. Estes foram identificados por meio de um microscópio de fluorescência marca Olympus BX60 com lâmpada de mercúrio HBO 100W

equipado com filtros para o DAPI, o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o isotiocianato de rodamina (TRITC) e, de um sistema computadorizado para a captação das imagens, com uma uma câmara digital e um programa analisador de imagem, o Cytovision versão 4.4 (Applied Imaging Cooperation, Santa Clara, CA, USA).

Todos os cromossomos em metáfase e pelo menos duzentos núcleos interfásicos foram avaliados para paciente e controle do estudo.

A representação esquemática dos possíveis padrões de hibridização obtidos em núcleos interfásicos e cromossomos em metáfase dos indivíduos avaliados esta apresentada na Figura 4.

Os pacientes e controles foram distribuídos de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, núcleos interfásicos normais e núcleos não informativos obtidos de amostras de MO colhidas ao diagnóstico ou durante a doação da MO, respectivamente.

O valor de corte considerado para a identificação do gene *BCR-ABL*, para pacientes, foi a porcentagem média de núcleos interfásicos com a anormalidade gênica obtida em controles acrescida de três desvios padrão (ANASTASI et al., 1990).

1.2.3. Avaliação do gene *BCR-ABL* por meio da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

O ácido ribonucléico (RNA) foi isolado de amostras de sangue total ou MO obtidas de pacientes, ao diagnóstico e a cada três meses durante dezoito meses após o TMO-auto e a cada seis meses a partir desta data e também de amostras de bolsas de CPP colhidas após a mobilização. O RNA foi transcrito em uma fita de DNA complementar (c-DNA) por transcrição reversa. Este produto foi então submetido a uma reação de PCR, usando-se iniciadores específicos para os pontos de quebra maior ou menor do gene *BCR* e do gene *ABL*.

Os iniciadores, o c-DNA, nucleotídeos livres e a enzima Taq polimerase, foram colocados em um tubo de reação. A amplificação das regiões de interesse foi obtida com a utilização dos procedimentos descritos por FRENOY et al. (1994). Esta amplificação

produziu dois fragmentos de 234 ou 304 pares de base, dependentes da presença ou não do éxon 3 do gene *BCR* no rearranjo *BCR-ABL*, em casos com ponto de quebra na região maior do gene *BCR*. Fragmentos de 196 pares de base foram obtidos em casos com ponto de quebra na região menor do gene *BCR*. Os produtos da amplificação do c-DNA foram visualizados em gel de agarose a 2%.

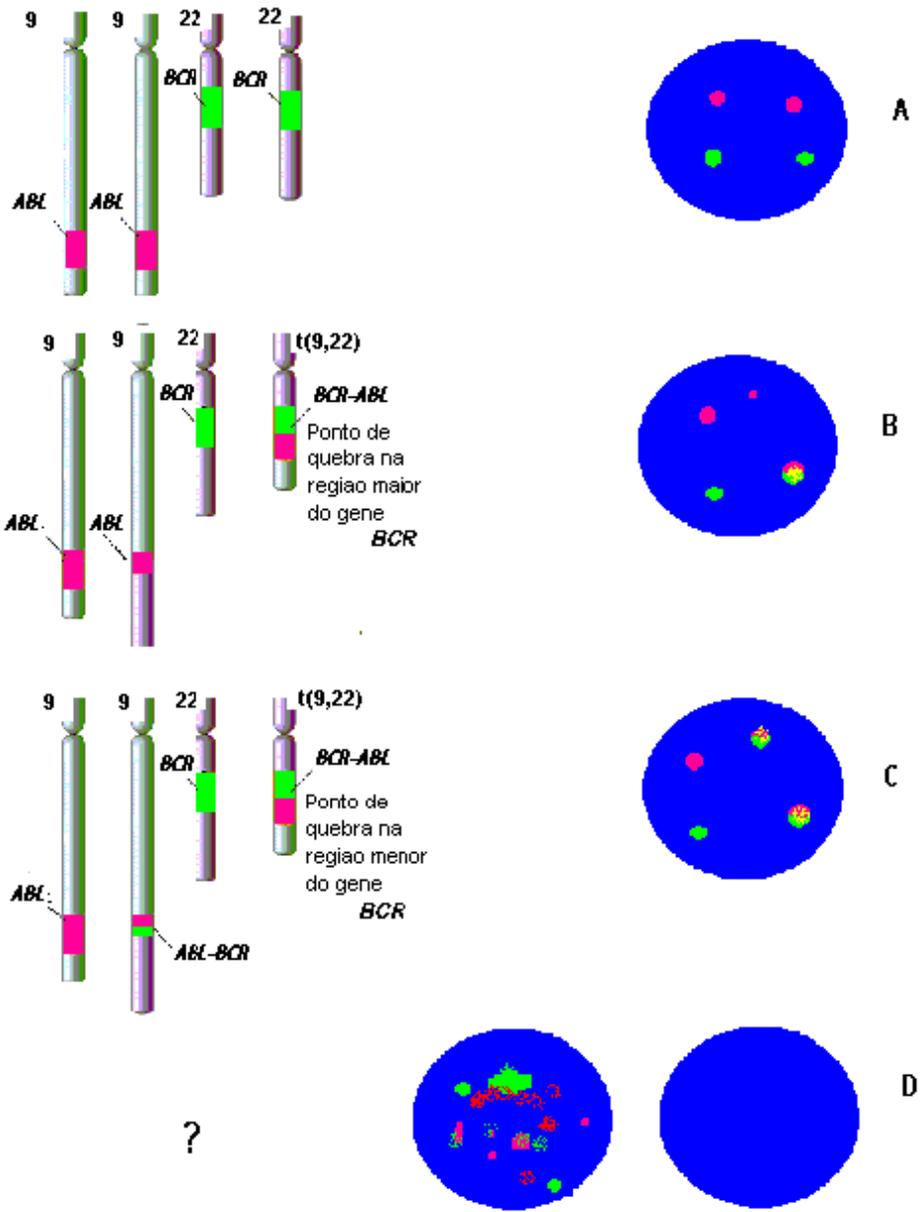


Figura 4. Representação esquemática dos possíveis resultados da hibridização pelo método FISH em cromossomos em metáfase e núcleos interfásicos de pacientes com leucemia mielóide crônica com a utilização das sondas *ABL* (●) e *BCR* (●), sendo: **A**, dois loci *ABL* e dois loci *BCR* normais; **B**, gene *BCR-ABL* com ponto de quebra na região maior do gene *BCR*; **C**, gene *BCR-ABL* com ponto de quebra na região menor do gene *BCR*; **D**, células não informativas

A sensibilidade do método da RT-PCR foi avaliada por meio da utilização de duas diluições diferentes de um controle positivo e de um controle negativo, constituídos pelas linhagens celulares K562 e HL60, respectivamente. Para a avaliação da integridade do RNA extraído, foi utilizada a RT-PCR para a amplificação de uma região de 370 pares de base que constitui a expressão do gene da β_2 microglobulina.

A representação esquemática dos possíveis resultados obtidos na pesquisa do gene *BCR-ABL* nas amostras examinadas e a interpretação dos mesmos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Representação esquemática dos possíveis resultados a serem obtidos na avaliação do gene *BCR-ABL* por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase e interpretações

<i>BCR-ABL</i>	β_2 microglobulina	Controle positivo	Controle negativo	Interpretação
+	+	+	-	<i>BCR-ABL</i> positivo
-	+	+	-	<i>BCR-ABL</i> negativo
+	+	+	+	Sem interpretação
-	-	-	-	Sem interpretação
-	+	+	+	Sem interpretação

Considerou-se como presença do gene *BCR-ABL* as amostras onde foram identificados produtos com 234 ou 304 pares de bases. Resultados negativos em amostras de água com DEPC e controle negativo foram necessários para a validação dos resultados obtidos em amostras de pacientes. A não amplificação do controle negativo e as ampliações do controle positivo e da β_2 microglobulina foram também necessárias para a validação dos resultados obtidos em amostras de pacientes. Foram também consideradas como tendo o gene *BCR-ABL* as amostras onde foram identificados fragmentos com 196 pares de base.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com os resultados obtidos da pesquisa do gene *BCR-ABL* em amostras de sangue periférico ou MO obtidas ao diagnóstico, em amostras de aféreses utilizadas para o TMO-auto e em amostras de MO obtidas a cada três meses após o TMO-auto.

2. PROCEDIMENTOS QUE PRECEDERAM O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

2.1. Coleta da célula precursora periférica para criopreservação

Os pacientes foram submetidos à coleta da CPP, com a finalidade de armazenar células da MO para a restauração da hematopoese após quimioterapia mieloablativa, caso fosse necessário. Estas células foram obtidas de duas maneiras. Pacientes com números de leucócitos no sangue periférico maiores do que $200,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, no momento da coleta, foram submetidos à coleta simples de bolsa de sangue e separação da camada de leucócitos com o uso de hidróxi-etil-starch (Fresenius, Campinas, SP, Brasil) Aqueles com números menores de leucócitos foram submetidos à coleta da CPP por leucaférese. Tivemos como objetivo a obtenção de $10,0 \times 10^8/\text{kg}$ de células nucleadas ou de $5,0 \times 10^6/\text{kg}$ de células CD34 positivas (CD34⁺) em cada produto.

Os números de leucócitos e de células nucleadas foram obtidos com a utilização de contadores automatizados de células do sangue (Cell-Dyn 1600, Cell-Dyn 1700, Abbott; Advia 120, Bayer). A quantificação das células CD34⁺ foi realizada por citometria de fluxo no citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA) com a utilização dos anticorpos monoclonais anti CD34 ligado a ficoeritrina (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA) e anti CD45 ligado ao isotiocianato de fluoresceína (DAKO AIS, Glostrup, Denmark). Os procedimentos realizados para tais determinações seguiram as descrições de GRATAMA et al. (1998). Foram considerados eficazes os procedimentos que possibilitaram a obtenção de número de células nucleadas maior ou igual a $5,0 \times 10^8/\text{kg}$ ou número de células CD34⁺ maior ou igual a $2,0 \times 10^6/\text{kg}$. Os produtos obtidos foram criopreservados.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o tipo de procedimento realizado e os números de células nucleadas e de células CD34⁺ por eles obtidos.

3. PROCEDIMENTOS RELACIONADOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

3.1. Mobilização e obtenção da célula precursora periférica

Um protocolo de mobilização da CPP utilizado foi o MINI-ICE. Os quimioterápicos utilizados no esquema e as doses e os tempos de administração de cada um deles estão apresentados na Figura 5.

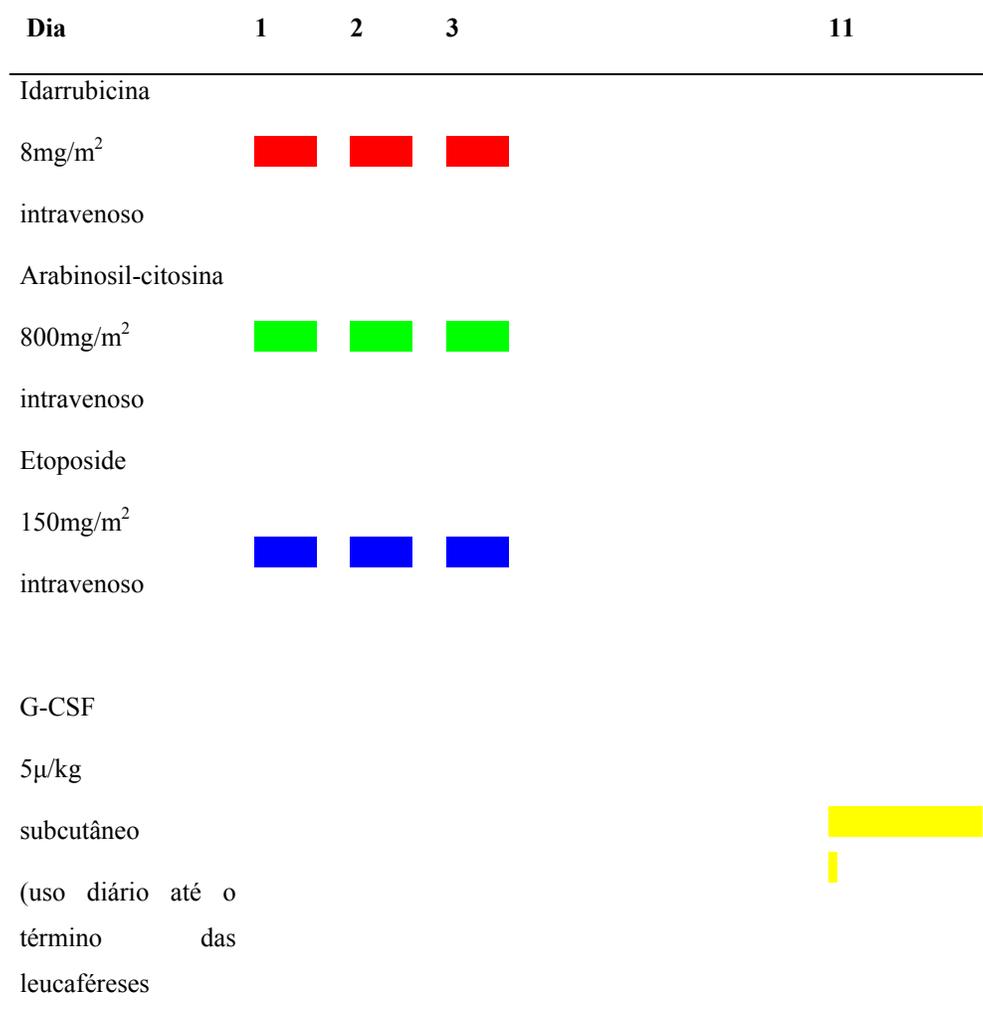


Figura 5. Representação esquemática do condicionamento de pacientes com leucemia mielóide crônica para a mobilização da célula precursora periférica com o esquema mini-ICE

O G-CSF (Hoffman-La Roche, Basiléia, Suíça) foi administrado na dose de 5μg/kg/dia, por via subcutânea até que as coletas da CPP estivessem completas.

Outro protocolo de mobilização da CPP utilizado teve como base a administração de $2\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ de HU (Bristol-Myers, São Paulo-SP, Brasil), por via oral, até que o número de neutrófilos fosse menor ou igual a $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, por no máximo quatorze dias. A dose do medicamento foi aumentada para $3\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$, por mais quatorze dias, no máximo, em casos em que esta condição não foi atingida. Se o número de neutrófilos desejado não foi obtido após o aumento da dose da HU, o procedimento foi suspenso. Atingido o número de neutrófilos desejado, a administração de HU foi suspensa. Após 24 horas da suspensão do medicamento, foi administrado $5\text{ug}/\text{kg}/\text{dia}$ do G-CSF até que o número de células CD34^+ periféricas fosse maior do que $5,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ e até a finalização dos procedimentos de leucaféreses.

O G-CSF, como agente mobilizador único, foi administrado na dose de $10\text{ug}/\text{kg}/\text{dia}$ por cinco dias, em casos em que não foi possível a obtenção da CPP com os esquemas acima descritos.

As leucaféreses para a coleta da CPP foram realizadas de acordo com os procedimentos protocolares do Serviço, com a utilização do aparelho Fresenius AS 104 (Fresenius Hemocare, Schineinfurt, Germany). Foram iniciadas quando o número de neutrófilos foi menor do que $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$. As vias de acesso para o procedimento foram as veias periféricas dos membros superiores. Foram processados no máximo doze litros de sangue em cada procedimento de coleta, sem ultrapassar cinco horas de duração total. Foram realizadas sessões diárias, tendo como objetivo a obtenção de um total de $5,0 \times 10^6/\text{kg}$ de células CD34^+ .

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o tipo do protocolo de mobilização utilizado, os números de células nucleadas e CD34^+ obtidas com os procedimentos e de acordo com a eficácia de cada procedimento de mobilização.

3.2. Avaliação do cromossomo philadelphia e do gene bcr-abl em célula precursora periférica do produto da leucaférese

As amostras dos produtos da leucaférese foram avaliadas por meio da análise citogenética convencional para a quantificação do cromossomo Ph, pelo método FISH para a quantificação dos números de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL* e por RT-PCR

para a identificação do gene *BCR-ABL*. Os pacientes foram distribuídos de acordo com os resultados obtidos em cada uma destas investigações.

3.3. Transplante autólogo de medula óssea

Os pacientes foram internados na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UNICAMP para receber o TMO-auto. O condicionamento dos mesmos para o procedimento foi realizado de acordo com o esquema apresentado na Figura 6.

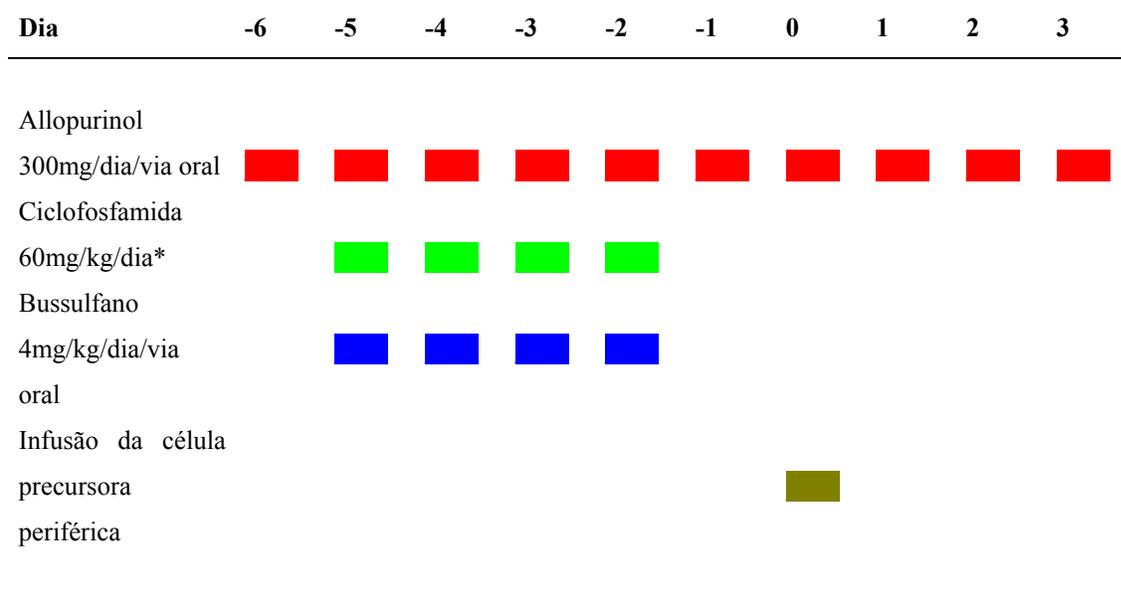


Figura 6. Representação esquemática do regime de condicionamento de pacientes com leucemia mielóide crônica para o transplante autólogo de medula óssea

As medidas convencionais de suporte ao paciente, durante o período de aplasia de MO inerente ao procedimento, incluíram a transfusão de concentrado de hemácias e plaquetas irradiadas e a antibioticoterapia para a profilaxia das infecções, com o uso de associação de trimetropin-sulfametoxazol, ciprofloxacina, fluconazol.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com os números de células nucleadas e CD34⁺, as porcentagens do cromossomo Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH, e dos resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL* por RT-PCR, em amostras da CPP utilizada para o TMO-auto.

Considerou-se como pega do enxerto o número de leucócitos no sangue periférico maior do que $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$. A alta hospitalar ocorreu após a pega do enxerto e para pacientes que não apresentavam complicações clínicas.

Os pacientes foram distribuídos também de acordo com os números de dias necessários para a recuperação dos números de leucócitos e de plaquetas.

4. SEGUIMENTO CLÍNICO E LABORATORIAL APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

Foi realizado por meio de consultas médicas, do hemograma mensal e do estudo citogenético, citogenético molecular e molecular em células da MO, colhidas cada três meses durante dezoito meses após o TMO-auto e a cada seis meses após esta data.

4.1. Administração do interferon alfa

Para os casos com persistência do cromossomo Ph ou do gene *BCR-ABL*, foi administrado o IFN quando os números de leucócitos e de plaquetas foram maiores do que $5,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $100,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente. As doses e os tempos de administração do medicamento estão apresentados na Tabela 2

Tabela 2. Esquema terapêutico com interferon alfa para os pacientes com leucemia mielóide crônica que receberam o transplante autólogo de medula óssea

Dose de Interferon alfa	Tempo de administração *
$1,0 \times 10^6 \text{U}/\text{via}$ subcutânea/3vezes por semana	2 semanas
$3,0 \times 10^6 \text{U}/\text{via}$ subcutânea/3vezes por semana	2 semanas
$5,0 \times 10^6 \text{U}/\text{via}$ subcutânea/3 vezes por semana	2 semanas
$5,0 \times 10^6 \text{U}/\text{m}^2/\text{via}$ subcutânea/3 vezes por semana	2 semanas
$5,0 \times 10^6 \text{U}/\text{m}^2$ por dia/via subcutânea/5 vezes por semana	Até progressão doença

*: tempo mínimo de administração de seis meses

As doses acima descritas foram reduzidas pela metade sempre que os números de leucócitos ou plaquetas foram menores que $5,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ou $100,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente. A administração do IFN foi suspensa quando os números de leucócitos ou plaquetas foram menores que $2,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ou $50,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o momento da introdução e a duração do tratamento com o IFN.

4.2. Avaliação da resposta hematológica

Foram considerados em resposta hematológica os pacientes que apresentaram a concentração da hemoglobina maior que 10,0g/dL e os números de leucócitos e plaquetas menores que $10,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $500,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente, por período mínimo de três meses, sem o uso de outra terapêutica além do IFN.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a obtenção e a duração da resposta hematológica.

4.3. Avaliação da resposta citogenética

Os critérios de resposta citogenética estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Critérios de resposta citogenética para os pacientes com leucemia mielóide crônica que receberam o transplante autólogo de medula óssea como medida terapêutica

Cromossomo Philadelphia (%)	Resposta citogenética
0% Ph-positivo	Resposta completa
1 a 32% Ph positivo	Resposta maior
33 a 65% Ph positivo	Resposta menor
66 a 99% Ph positivo	Resposta mínima
100% Ph positivo	Sem resposta
< 10 metáfases	Não avaliável

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a obtenção de resposta citogenética.

4.4. Avaliação da resposta molecular

Respostas moleculares obtidas por FISH foram definidas de acordo com a descrição de HESS et al. (1999), da seguinte forma: resposta completa: número de núcleos interfásicos sem a anormalidade gênica maior do que 98%; resposta maior: 66% a 98% dos núcleos interfásicos sem a anormalidade gênica; resposta menor: 33% a 65% dos núcleos sem a anormalidade gênica e ausência de resposta, a identificação da anormalidade gênica em número maior do que 98% dos núcleos de amostras de MO avaliadas.

Foram considerados em resposta molecular, avaliada por meio da RT-PCR, os pacientes que não apresentaram o gene *BCR-ABL*, em amostras de MO avaliadas.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por FISH e de acordo com a presença ou a ausência do gene *BCR-ABL*, identificados por RT-PCR.

4.5. Condição clínica no momento da análise do estudo

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a situação clínica em que se encontravam no momento do término do estudo, considerando o óbito ou o estar vivo. Os vivos foram distribuídos de acordo com a presença ou a ausência de resposta hematológica, citogenética, citogenética molecular e molecular.

5. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados após a obtenção das cartas de consentimento pós-informação, assinadas por pacientes e controles que aceitaram participar do estudo (Anexo 2) e após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Processo no 128/99).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das porcentagens do cromossomo Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, obtidos por meio da análise citogenética convencional e do método FISH, respectivamente, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e durante o seguimento após o TMO-auto, foi realizado com o teste não paramétrico para a comparação de medianas de Wilcoxon (ALTMAN, 1991). Foi usado o programa estatístico S-Plus 2000 Professional Release 1, Copyright 1988-1999 (MathSofft Inc, Seatton, Washington, USA).



RESULTADOS

1. ASPECTOS CLÍNICOS

1.1. Avaliação clínica

Foram atendidos 64 casos novos de LMC no Ambulatório de Onco-Hematologia do Hemocentro da UNICAMP no período do estudo.

Foram excluídos da avaliação doze pacientes: dois com baixo nível sócio-econômico, seis com condições clínicas desfavoráveis, como a insuficiência cardíaca, a insuficiência respiratória e a desnutrição crônica e quatro que optaram por tratamento em outro serviço.

Doadores de MO com compatibilidade aos antígenos HLA foram disponíveis para 23 pacientes. Um doador recusou-se a submeter aos procedimentos de doação da MO e o outro era portador de hepatite C. Portanto, 21 pacientes foram encaminhados para receber o TMO-alo.

Vinte e nove pacientes foram convidados a participar do protocolo de tratamento da LMC proposto pelo EBMT. Seis deles recusaram o convite e dois ultrapassaram o período estabelecido de seis meses do diagnóstico para o início do tratamento, enquanto decidiam pela participação no estudo. Vinte e um pacientes foram sorteados pelo escritório do EBMT, para a inclusão em cada um dos braços terapêuticos. Dez pacientes foram sorteados para receber o TMO-auto associado ao IFN e onze pacientes para receber somente o IFN. Os dois pacientes que tinham disponibilidade de doador de MO com compatibilidade HLA mas que não puderam receber as MO destes doadores, foram encaminhados para receber o TMO-auto.

A representação esquemática da distribuição dos 64 casos novos de LMC atendidos no serviço no período do estudo, de acordo com o encaminhamento terapêutico final, está apresentada na Figura 7.

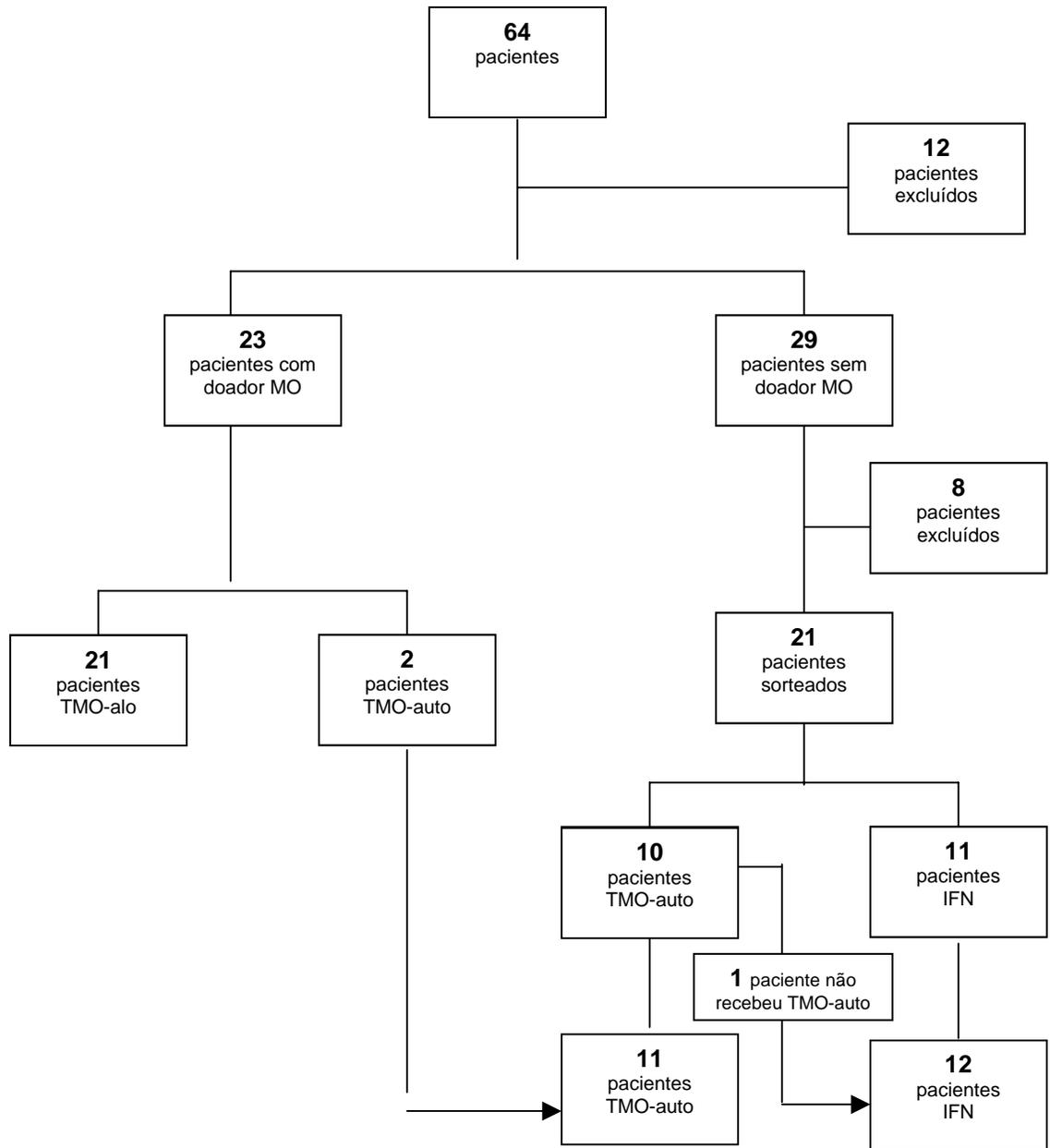


Figura 7. Representação esquemática da distribuição dos pacientes com leucemia mielóide crônica, atendidos no Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, considerando o encaminhamento terapêutico para o transplante alogênico de medula óssea (TMO-alo), o interferon alfa (IFN) e o transplante autólogo de medula óssea (TMO-auto)

Um paciente sorteado para receber o TMO-auto apresentou exacerbação do enfisema pulmonar, que determinou acentuada insuficiência respiratória no momento da internação hospitalar para a realização do TMO-auto, o que contra-indicou a realização do procedimento.

Assim, onze pacientes com LMC foram encaminhados para receber o TMO-auto associado ao uso de IFN como medida terapêutica para a doença e constituíram a casuística deste estudo.

As distribuições dos onze pacientes incluídos no estudo e avaliados ao diagnóstico de acordo com as características clínicas, do sangue periférico, as porcentagens de blastos na MO e os índices prognósticos Euro e de Sokal estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuições dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica incluídos para o transplante autólogo de medula óssea de acordo com as características clínicas, do sangue periférico, as porcentagens de blastos na medula óssea e os índices de Euro e de Sokal

Variável	Números ou valores de medianas (variação)
Características clínicas	
Idade (anos)	36,8 (20,6-56,6)
Sexo	
Masculino	8
Feminino	3
Raça	
Caucasóide	11
Baço* (cm)	14 (4-20)
Características do sangue periférico	
Hemoglobina (g/dl)	10,5 (7,2-14,4)
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	264,0 (58,4-436,0)
Blastos (%)	1,0 (0,0-10,0)
Basófilos (%)	2,0 (0,0-9,0)
Eosinófilos (%)	2,0 (0,0-5,0)
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	290,0 (100,0-906,0)
Blastos na medula óssea (%)	1,3 (0-3)
Índice de Sokal	
Risco baixo	2
Risco intermediário	7
Risco alto	2
Índice Euro	
Risco baixo	5
Risco intermediário	5
Risco alto	1

Sendo: *, dimensão do baço medido a partir do rebordo costal esquerdo

A distribuição dos pacientes de acordo com as características clínicas mostrou que o baço foi palpável em todos eles.

A distribuição dos pacientes de acordo com os achados do sangue periférico mostrou que apenas um deles não apresentou anemia. Plaquetose foi identificada em 54,5% dos casos e plaquetopenia em um único caso.

A distribuição dos pacientes de acordo com o índice prognóstico de Sokal mostrou que a maioria deles (81,8%) foi classificada como de riscos intermediário e alto. Já a maioria dos pacientes incluídos no estudo (90,9%) foram de riscos baixo e intermediário, quando distribuídos de acordo com o índice EURO.

1.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene *BCR-ABL*

O cromossomo Ph não foi identificado em qualquer dos cromossomos em metáfase obtidos de amostras de MO de controles.

O padrão de hibridização da presença do gene *BCR-ABL* foi identificado em 0,0% a 1,5% dos núcleos interfásicos dos controles (média+3DP: 0,3+1,4). Assim, 1,7% foi o valor de corte para a identificação do gene *BCR-ABL* pelo método FISH em pacientes do estudo.

As distribuições individualizadas dos controles e pacientes de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com padrões de hibridização indicativos da presença do gene *BCR-ABL*, da ausência do gene *BCR-ABL* e não informativos, em amostras de MO colhidas ao diagnóstico estão apresentadas no Anexo 3.

As porcentagens de células com o cromossomo Ph e com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio da análise citogenética convencional e método FISH, respectivamente, e a pesquisa do gene *BCR-ABL* por meio da RT-PCR, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico, estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuições dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com as porcentagens de cromossomos em metáfase com o cromossomo Philadelphia, identificadas por meio da análise citogenética convencional e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificadas por meio do método FISH, e com os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL*, por meio da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, em amostras de medula óssea obtidas ao diagnóstico

Número Caso	Metáfases anormais/ metáfases analisadas (%)	Núcleos interfásicos anormais/ núcleos interfásicos analisados (%)	<i>BCR-ABL</i> (RT-PCR)
1	10/16 (62,5)	Não realizado	Positivo
2	20/20 (100,0)	Não realizado	Positivo
3	20/20 (100,0)	165/206 (80,09)	Positivo
4	25/25 (100,0)	90/200 (45,00)	Positivo
5	24/24 (100,0)	165/200 (82,50)	Positivo
6	16/16 (100,0)	178/200 (89,00)	Positivo
7	20/20 (100,0)	173/200 (86,50)	Positivo
8	20/20 (100,0)	160/200 (79,60)	Positivo
9	15/15 (100,0)	173/200 (86,50)	Positivo
10	20/20 (100,0)	169/200 (84,50)	Positivo
11	6/20 (30,0)	156/200 (78,00)	Positivo

O cromossomo Ph foi identificado em 100,0% dos cromossomos em metáfase obtidos de células da MO de nove pacientes incluídos no estudo. Em apenas dois pacientes foi identificado o cromossomo Ph em 62,5% e 30,0% dos cromossomos em metáfase analisados. A presença do gene *BCR-ABL* foi identificada por meio do método FISH e da RT-PCR em todas as amostras de MO dos pacientes incluídos no estudo. Pontos de quebra na região menor do gene *BCR* (*m-BCR*) foi identificado em apenas um paciente do estudo (Caso 4).

Um cariótipo com o cromossomo Ph, identificado por meio da análise citogenética convencional, núcleos interfásicos normal e com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH e o gene *BCR-ABL*, identificado por meio da RT-PCR, estão apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

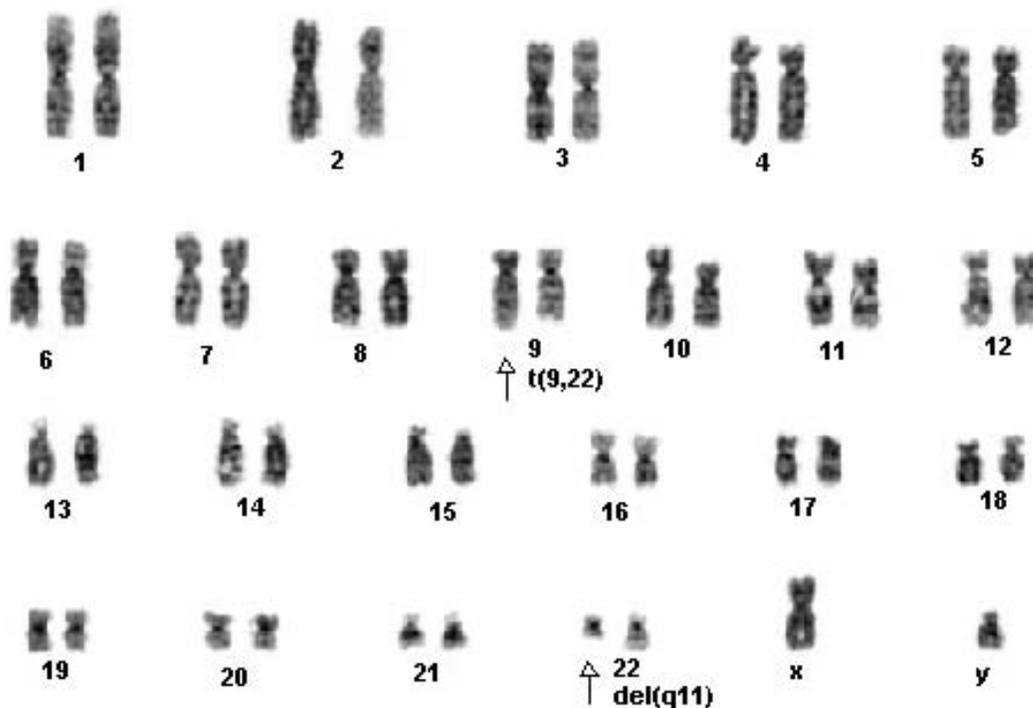
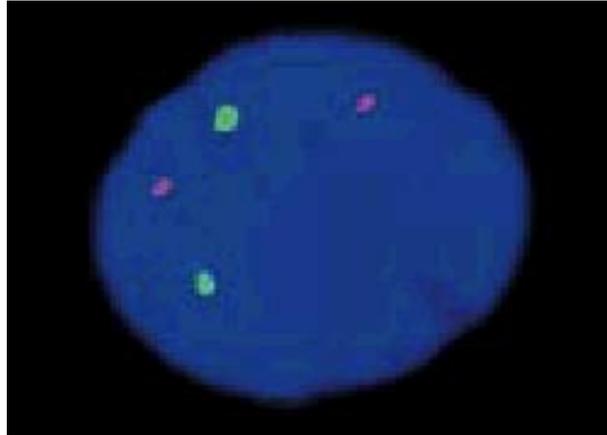


Figura 8. Cariótipo 46, XY, t(9,22)(q34;q11) em um paciente com leucemia mielóide crônica (Caso 3)

A



B

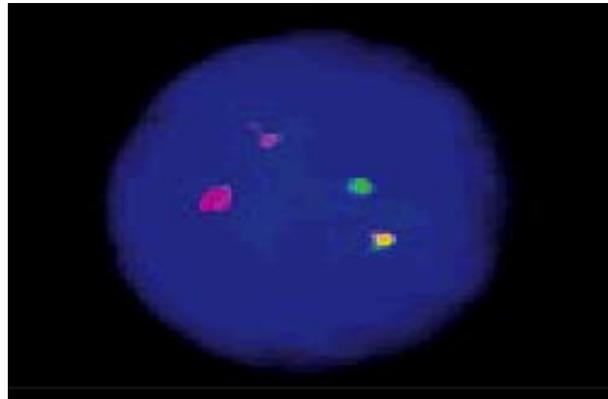


Figura 9. Núcleos interfásicos de um paciente com leucemia mielóide crônica (caso 10), avaliado por meio do método FISH, com a utilização simultânea de sondas para os loci dos genes *BCR* (●) e *ABL* (●), sendo: **A**, dois sinais verdes e dois sinais vermelhos afastados indicam um padrão normal de hibridização; **B**, a fusão de um sinal verde com um sinal vermelho indica a presença do gene *BCR-ABL* em um único cromossomo, com ponto de quebra na região maior do gene *BCR*

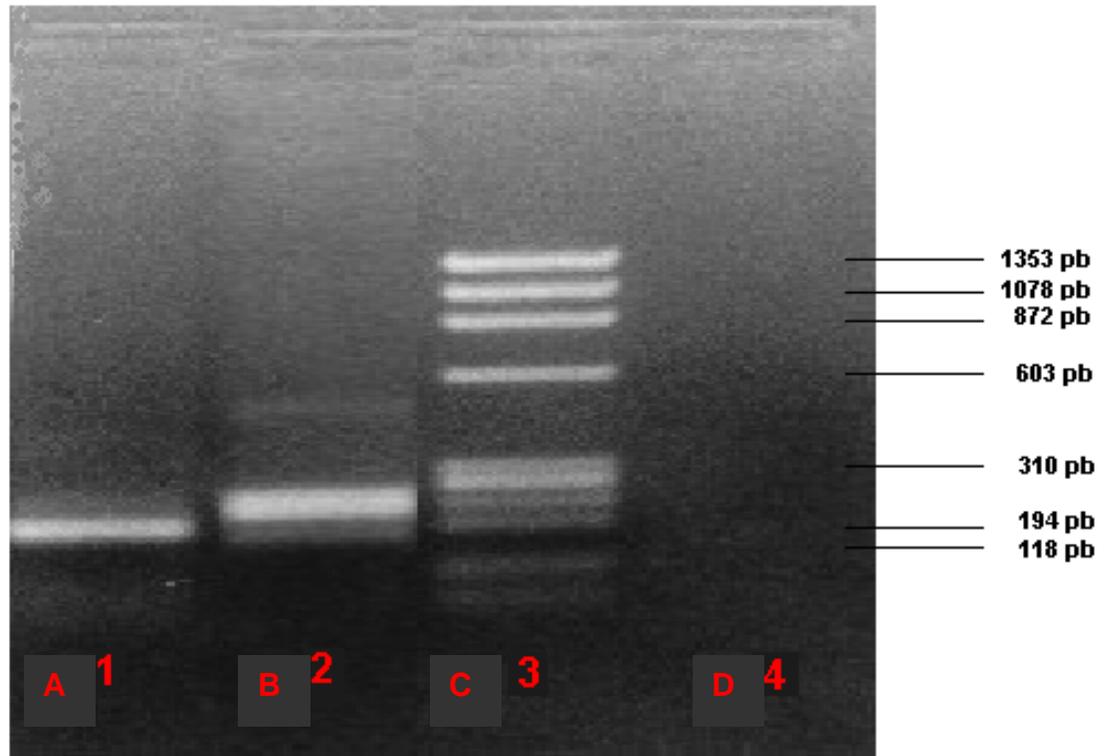


Figura 10. Eletroforese dos produtos da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase do gene *BCR-ABL* em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Sendo: **A**, paciente com leucemia mielóide crônica (caso 4) com uma banda de 196pb correspondente a p190, produto do gene; **B**, controle positivo representado por um paciente com leucemia linfóide aguda pré B com a p190; **C**, marcador do tamanho dos fragmentos de RNA ϕ X 174RF; **D**, controle negativo (H_2O)

2. PROCEDIMENTOS QUE PRECEDERAM O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

2.1. Coleta da célula precursora periférica para criopreservação

Os tipos de procedimentos realizados e os números de células nucleadas e CD34+ por eles obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuições dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com o tipo de coleta de células da medula óssea e os números de células nucleadas e CD34 positivas obtidas com os procedimentos

Número Caso	Procedimento	Células nucleadas (x10 ⁸ /kg)	Células CD34+ (x10 ⁶ /kg)
1	Não realizada	Não realizada	Não realizada
2	Não realizada	Não realizada	Não realizada
3	Leucaférese	2,16	1,69
4	Leucaférese	4,26	15,42
4	Leucaférese	2,80	1,81
5	Leucaférese	18,87	17,92
6	Leucaférese	11,77	6,69
7	Leucaférese	18,73	8,75
8	Bolsa de sangue	12,24	36,12
9	Leucaférese	18,00	23,13
10	Leucaférese	13,33	2,74
11	Leucaférese	6,69	11,08

Números adequados, tanto de células nucleadas, maiores do que $10,0 \times 10^8/\text{kg}$ de peso, como de células $\text{CD}34^+$, maiores do que $5,0 \times 10^6/\text{kg}$ de peso, foram obtidas em cinco dos nove pacientes submetidos ao procedimento. Em dois pacientes, apenas os números de células $\text{CD}34^+$ coletadas foram adequados e em outros dois pacientes, os procedimentos foram inadequados para a obtenção de número desejado tanto de células nucleadas como de células $\text{CD}34^+$.

3. PROCEDIMENTOS RELACIONADOS AO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

3.1. Mobilização e obtenção da célula precursora periférica

Os esquemas de mobilização da CPP utilizados, o tempo decorrido para a leucaférese, os números de leucaféreses realizadas e os números de células nucleadas e $\text{CD}34^+$ obtidas com os procedimentos, estão apresentados na Tabela 7.

Foram obtidos números adequados de células $\text{CD}34^+$, maior do que $5,0 \times 10^6/\text{kg}$ de dois pacientes que receberam inicialmente o Mini-ICE como esquema de mobilização da CPP.

Números inadequados de células $\text{CD}34^+$ foram obtidos de quatro pacientes que receberam a HU para a mobilização da CPP (Casos 5, 6, 9 e 11). Para um deles, não foi realizado novo procedimento de mobilização (Caso 5). Os outros três foram submetidos a novo protocolo de mobilização. Um deles (Caso 6) recebeu o esquema Mini-ICE, mas evoluiu para o óbito por septicemia durante o período de aplasia de MO. O G-CSF foi administrado para os outros dois pacientes (Casos 9 e 11) e possibilitou a obtenção de número adequado de células $\text{CD}34^+$ em um deles (Caso 9).

A representação esquemática dos resultados obtidos com a mobilização da CPP com os esquemas de quimioterapia utilizados está apresentada na Figura 11.

Tabela 7. Distribuição dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com os esquemas de mobilização da célula precursora periférica utilizados, o tempo decorrido para a realização da leucaférese, os números de leucaféreses realizados e os números de células nucleadas e células CD34⁺ obtidos com o procedimento

Número Caso	Tipo de mobilização (dias de utilização)	Número dias até aférese	Número aféreses	Células nucleadas (x10 ⁸ /kg)	Células CD34+ (x10 ⁶ /kg)
1	Mini-ICE (3)	12	3	2,28	6,17
2	Mini-ICE (3)	12	2	5,81	5,08
3	HU (21)	22	2	5,85	7,02
4	HU (16)	37	3	5,03	5,47
5	HU (23)	36	5	10,92	1,32
6	HU (20)	26	2	2,72	0,02
	*Mini-ICE (3)	Não realizada	Não realizada	Não realizada	Não realizada
7	HU (14)	18	2	1,62	8,4
8	HU (15)	20	2	13,05	4,98
9	HU (16)	35	9	0,00	0,00
	G-CSF (5)	7	1	4,22	15,21
10	HU (29)	30	8	11,06	6,30
11	HU (18)	41	2	0,00	0,00
	G-CSF(5)	7	2	0,00	0,00

Sendo: Mini-ICE, idarrubicina, etoposide e arabinosil-citosina; HU, hidroxiuréia; G-CSF, fator estimulador o crescimento de células de linhagem granulocítica; *óbito durante fase aplástica após mini-ICE

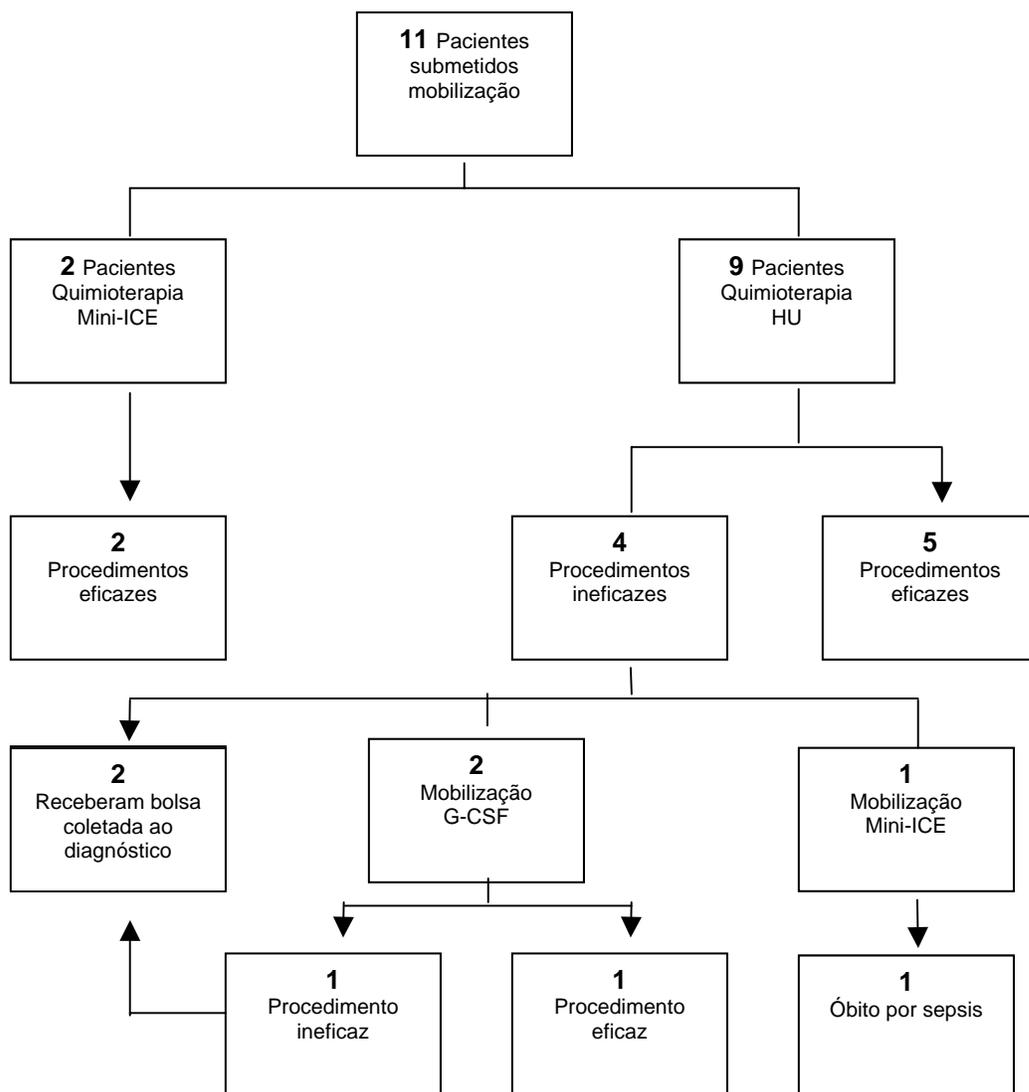


Figura 11. Representação esquemática dos resultados obtidos com a mobilização da célula precursora periférica com o esquema de quimioterapia Mini-ICE (idarrubicina, etoposido, arabinosil-citosina), com a hidroxiuréia (HU) e com o fator estimulador do crescimento de células da linhagem granulocítica (G-CSF)

3.2. Avaliação do cromossomo Philadelphia e do gene BCR-ABL em célula precursora periférica do produto da leucaférese

As distribuições individualizadas dos onze pacientes com LMC de acordo com os números de células nucleadas e CD34⁺, as porcentagens de cromossomos Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH, e os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL*, por RT-PCR, obtidas em CPP dos produtos de leucaférese, estão apresentadas no Anexo 4.

A mediana das porcentagens do cromossomo Ph, obtidos por meio da análise citogenética convencional em CPP de todos os produtos de leucaférese de sete pacientes efetivamente avaliados pelo método foi de 100,0% (variação: 10,0-100,0).

A mediana do número de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, obtidos por meio do método FISH em célula precursora periférica de todos os produtos de leucaférese de nove pacientes efetivamente avaliados pelo método foi de 54,7% (variação: 5,5-83,9).

O produto do gene *BCR-ABL* foi identificado por meio da RT-PCR em todas as amostras de CPP de dez pacientes efetivamente avaliados pelo método.

3.3. Transplante autólogo de medula óssea

O TMO-auto foi a terapêutica definida para um grupo de onze pacientes com LMC. Um deles (Caso 6) evoluiu para o óbito por falência de múltiplos órgãos causada por septicemia, que ocorreu durante a fase de aplasia de MO determinada pelo esquema quimioterápico utilizado para a mobilização da CPP. Assim sendo, o TMO-auto foi realizado em dez pacientes. O condicionamento com o bussulfano em associação com a ciclofosfamida foi utilizado apenas para os dois primeiros pacientes incluídos no estudo. O bussulfan como medicamento único foi utilizado para o condicionamento dos demais.

Um paciente (Caso 5) recebeu junto com a CPP mobilizada, células colhidas no momento do diagnóstico, com o intuito de completar o número de células CD34⁺ necessárias para a realização do TMO-auto. Um outro paciente (Caso 11) recebeu a infusão

da CPP colhida por ocasião do diagnóstico, uma vez que não foi obtido um número adequado de células após o procedimento de mobilização.

As distribuições dos onze pacientes com LMC de acordo com os números de células CD34⁺, as porcentagens de cromossomos Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH, e os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL*, por RT-PCR, obtidas em CPP dos produtos de leucaférese efetivamente infundidos durante o procedimento do TMO-auto estão apresentadas no Anexo 5 e na Tabela 8.

Tabela 8. As distribuições dos onze pacientes com LMC de acordo com os números de células CD34⁺, as porcentagens de cromossomos Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH, e os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL*, por RT-PCR, na avaliação da célula precursora periférica dos produtos de leucaférese efetivamente infundidos durante o procedimento do TMO-auto

Número	Células CD34 ⁺	%Células Ph ⁺	% Células FISH ⁺	<i>BCR-ABL</i>
Caso	(x10 ⁶ /kg)	(variação)	(variação)	(RT-PCR)
1	3,73	Não realizado	Não realizado	Positivo
2	5,08	Não realizado	Não realizado	Positivo
3	5,22	100,0	46,0	Positivo
4	5,47	65,0-85,0	6,5-83,9	Positivo
5	4,90	100,0	14,0-82,5	Positivo
6	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
7	6,08	73,0-95,0	72,1-78,1	Positivo
8	4,78	100,0	7,0-67,5	Positivo
9	15,21	100,0	75,0	Positivo
10	6,31	Material inadequado	5,5-70,9	Positivo
11	11,08	25,0	86,5	Positivo

Todos os pacientes receberam a infusão da CPP com anormalidades citogenéticas ou moleculares.

A mediana do número de dias necessários para a recuperação do número de neutrófilos foi de 14 dias (variação: 8-20). As medianas do números de dias necessários para a obtenção de números de plaquetas maiores do que $20,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $50,0 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente, foram de 15 dias (variação: 12-112) e 70 dias (variação: 17-172).

Um paciente (Caso 11) evoluiu para o óbito no vigésimo primeiro dia após a infusão da CPP, em consequência da falência de múltiplos órgãos causada por septicemia, independente da pega do enxerto ter ocorrido no décimo primeiro dia após o TMO-auto.

4. SEGUIMENTO CLÍNICO E LABORATORIAL APÓS O TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA

4.1. Administração do interferon alfa

Nove dos dez pacientes receberam o IFN após a realização do TMO-auto. A mediana do intervalo de tempo para o início da utilização do IFN foi de 7,0 meses (variação: 2,1-9,2). A mediana da duração do tratamento com o IFN foi de 9,4 meses (variação: 1,9-42,0). Quatro pacientes receberam o medicamento até o término do estudo.

A distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com o momento da introdução do IFN e a duração do tratamento está apresentada na Figura 12.

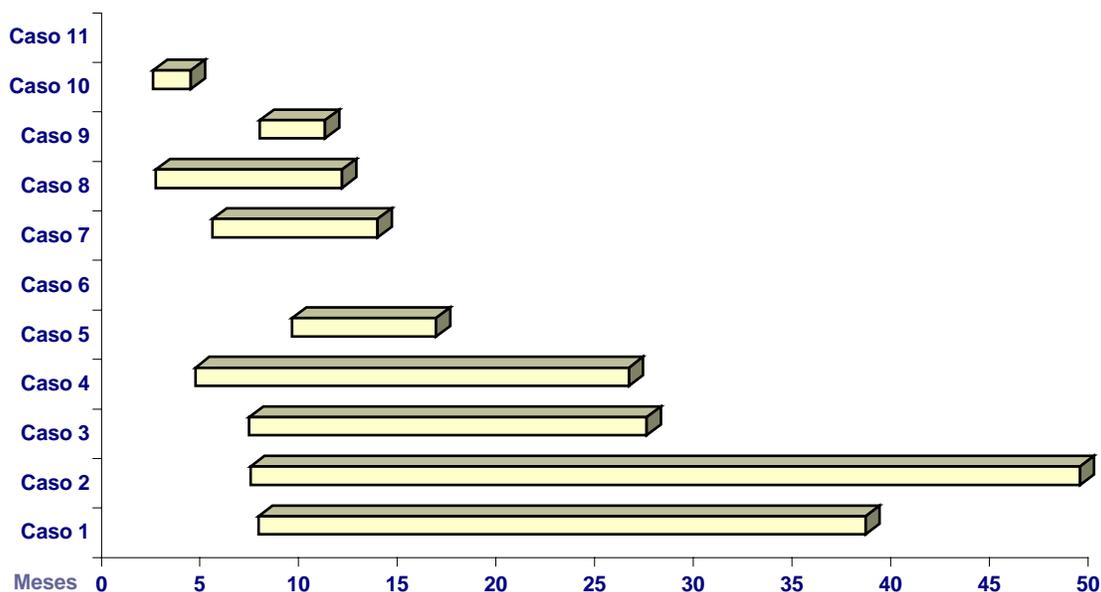


Figura 12. Representação esquemática da distribuição dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com o momento da introdução do IFN e a duração do tratamento

4.2. Avaliação da resposta hematológica

A resposta hematológica foi observada em oito dos nove pacientes (88,9%) que puderam ser avaliados após receberam o TMO-auto. A mediana da duração da resposta hematológica foi de 19,5 meses (variação: 9-49). Um paciente evoluiu para o óbito após o TMO-auto imediato (Caso 11). Um outro (Caso 10) apresentou o aumento do número de leucócitos refratário ao tratamento com IFN e HU, após dois meses do TMO-auto, mantendo a doença em sua fase crônica, e recebeu terapêutica com o mesilato de imatinibe.

A resposta hematológica foi observada em oito de nove pacientes (88,9%) avaliados após o sexto mês e em seis de oito pacientes (75,0%) avaliados após o décimo segundo mês do seguimento laboratorial. O número de pacientes avaliados em outros períodos do estudo não foi suficiente para uma análise satisfatória.

A distribuição dos onze pacientes com LMC indicados para receber TMO-auto e o IFN, de acordo com a ocorrência e duração da resposta hematológica, está apresentada na Figura 13.

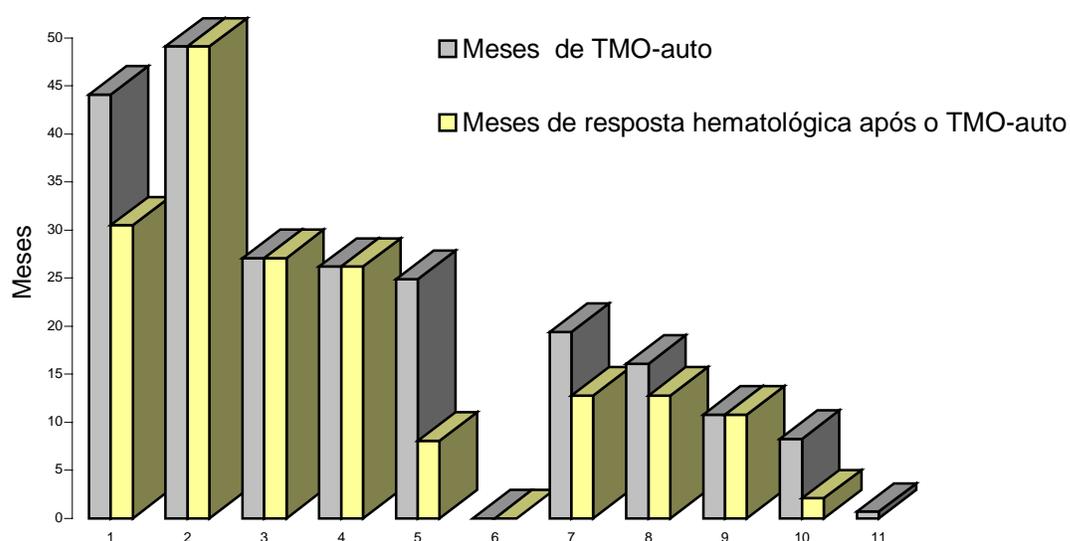


Figura 13. Distribuição dos pacientes com leucemia mielóide crônica indicados para receber o transplante autólogo de medula óssea (TMO-auto) e interferon alfa como terapêutica, de acordo com a ocorrência e a duração da resposta hematológica

Quatro dos oito pacientes que obtiveram resposta hematológica, a mantiveram até o término do estudo. Os outros quatro pacientes apresentaram o aumento dos números de leucócitos e plaquetas durante o IFN e receberam outras terapêuticas como o ARA-C ou o mesilato de imatinibe.

4.3. Avaliação da resposta citogenética

A resposta citogenética foi observada em sete dos nove pacientes (77,8%) que puderam ser avaliados após o TMO-auto.

Ao sexto mês da avaliação laboratorial, oito pacientes puderam ser avaliados por este método, sendo que um único (12,5%) apresentou resposta maior, dois (25,0%) apresentaram resposta menor, dois (25,0%) apresentaram resposta mínima e três (37,5%) não apresentaram resposta citogenética.

Ao décimo segundo mês da avaliação laboratorial, seis pacientes puderam ser avaliados por este método, sendo que um único (16,7%) apresentou resposta completa, dois (33,3%) apresentaram resposta menor e três (50,0%) não apresentaram resposta citogenética.

O número de pacientes avaliados em outros períodos do estudo não foi suficiente para uma análise satisfatória.

A distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com as porcentagens do cromossomo Ph em amostras de MO obtidas a cada três meses durante o seguimento clínico está apresentada no Anexo 6 e na Figura 14.

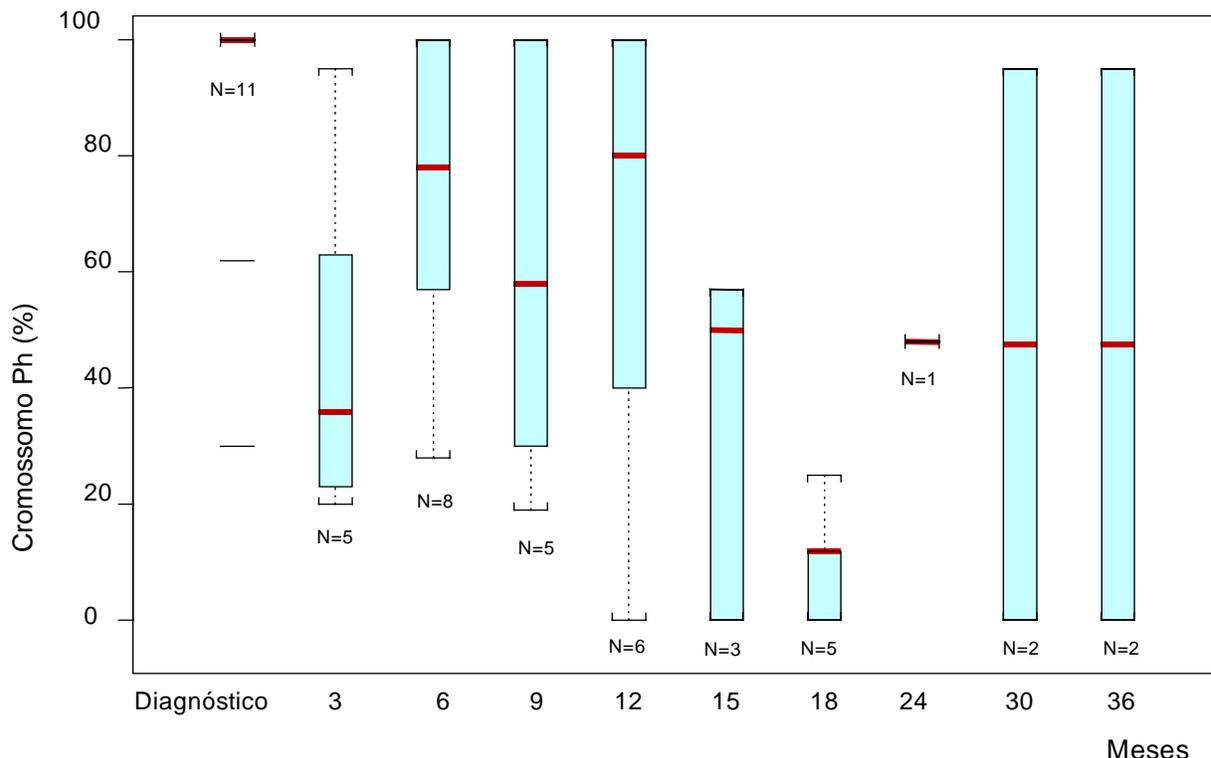


Figura 14. Box-plots da distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com as porcentagens do cromossomo Ph em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e durante o seguimento clínico, após o transplante autólogo de medula óssea

A mediana das porcentagens do cromossomo Ph em amostras de MO obtidas no terceiro mês (36,0%) após o TMO-auto tendem a ser menor do que a observada ao diagnóstico (100,0%), $P=0,06$. A mediana das porcentagens do cromossomo Ph em amostras de MO obtidas no sexto (78,0%) mês após o TMO-auto foi menor do que a observada ao diagnóstico ($P=0,035$). Já as medianas obtidas do nono ao trigésimo sexto mês (58,0%; 80,0%; 50,0%; 12,0%; 48,0%; 47,5%; 47,5%) foram similares às observadas ao diagnóstico ($P=0,12$; $P=0,11$; $P=0,25$; $P=0,05$; $P=1,0$; $P=1,00$; $P=1,00$).

4.4 Avaliação da resposta molecular

A resposta citogenética molecular foi observada em todos os sete pacientes (100,0%) que puderam ser avaliados após o TMO-auto.

Ao sexto mês da avaliação laboratorial, sete pacientes puderam ser avaliados por este método, sendo que um único (14,3%) apresentou resposta completa, cinco (71,4%) apresentaram resposta maior e um único paciente (14,3%) não apresentou resposta.

Ao décimo segundo mês da avaliação laboratorial, cinco pacientes puderam ser avaliados por este método, sendo que todos (100,0%) apresentaram resposta maior.

O número de pacientes avaliados em outros períodos do estudo não foi suficiente para uma análise satisfatória.

A distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL* analisadas pelo método FISH, em amostras de MO colhidas ao diagnóstico e nas avaliações após o TMO-auto, está apresentada no Anexo 7 e na Figura 15.

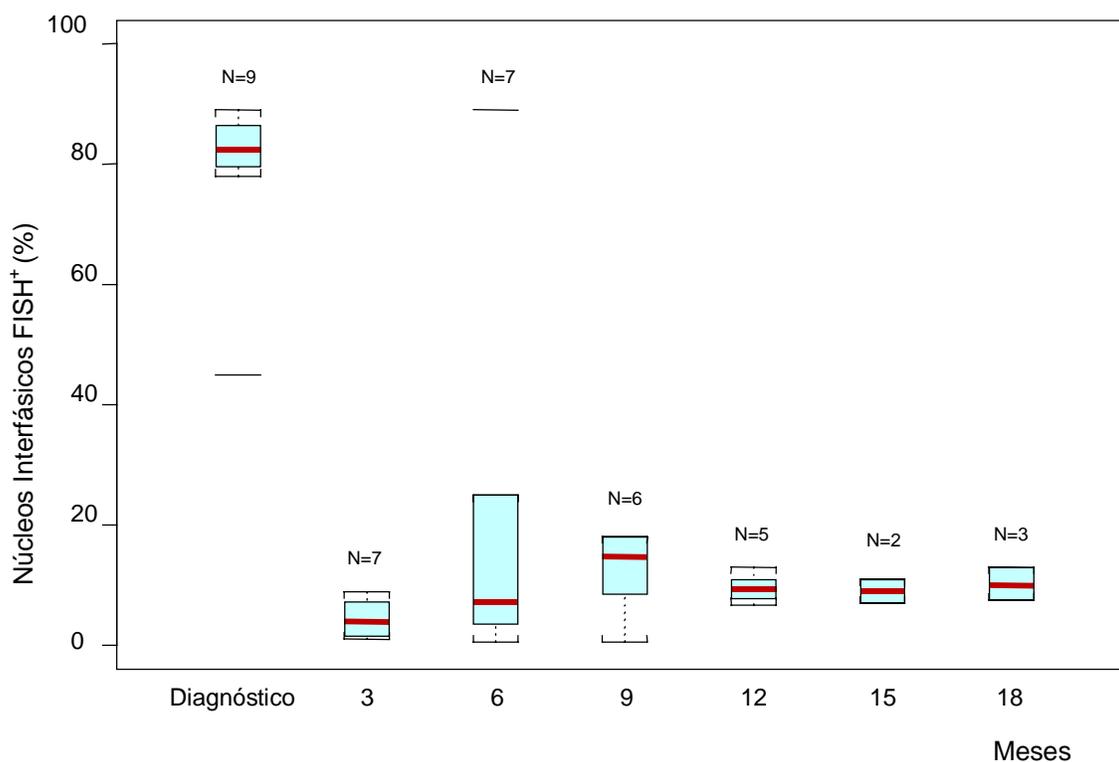


Figura 15. Box-plots da distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com as porcentagens do núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e durante o seguimento clínico, após o transplante autólogo de medula óssea

As medianas das porcentagens de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, em amostras de MO obtidas no terceiro (4,0%), sexto (7,3%) e nono (15,7%) meses após o TMO-auto foram menores do que a observada ao diagnóstico, 82,5%, ($P=0,01$; $P=0,03$; $P=0,03$; respectivamente). Já as medianas obtidas no décimo segundo, décimo quinto e décimo oitavo meses após o TMO-auto (9,3%; 9,0%; 10,0%) foram similares às observadas ao diagnóstico ($P=0,06$; $P=0,50$; $P=0,25$).

A distribuição dos onze pacientes com LMC de acordo com os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL* em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e após o TMO-auto, analisados por RT-PCR, está apresentada no Anexo 8.

O produto do gene *BCR-ABL* não foi identificado apenas na amostra de MO obtida ao décimo quinto mês do acompanhamento de um único paciente (Caso 2), configurando portanto, resposta molecular completa da doença, com duração aproximada de três meses.

4.5. Condição clínica no momento da análise do estudo

As medianas dos números de dias de seguimento dos pacientes avaliados, considerando a data do diagnóstico e do fim do estudo e a data do TMO-auto e do fim do estudo foram de 23,2 meses (variação: 9,0-58,8) e 22,7 meses (variação: 0,7-49,1), respectivamente. Foram incluídos em nosso estudo onze pacientes com LMC. Um paciente (Caso 6) evoluiu para o óbito, durante a fase de aplasia de MO determinada pelo procedimento de mobilização da CPP. Um outro paciente (Caso 11) evoluiu para o óbito devido a complicações relacionadas ao TMO-auto. Cinco pacientes ao final do estudo passaram a utilizar outros medicamentos para o controle da doença, devido a perda de resposta hematológica. Quatro pacientes em fase crônica estavam em resposta hematológica. Um deles estava em resposta citogenética mínima, dois em resposta citogenética maior e um em resposta citogenética completa. Três deles estavam em resposta citogenética molecular e o outro não pode ser avaliado pelo método.



DISCUSSÃO

A LMC é uma doença exaustivamente estudada há mais de 150 anos (GEARY, 2000). Sendo assim, suas características clínicas e seu comportamento biológico estão entre os melhor estabelecidos dentre as neoplasias malignas. Entretanto, em nosso conhecimento, não há descrições sobre as características clínicas de pacientes com a doença em nosso meio e a terapêutica adequada para determinar a cura da doença ainda está por ser determinada com exatidão, o que justificou a realização deste estudo.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos por idade, notamos que a mediana, 36,8 anos, foi discretamente menor que a descrita por PRATT et al. (1998) e por BOLUDA et al (2002) para pacientes em estudos semelhantes, respectivamente de 46 e 43 anos. No entanto nossa série de casos é pequena para permitir analisar esse fato com precisão.

Já os resultados das distribuições dos nossos casos, por sexo, achados ao exame clínico e achados laboratoriais foram semelhantes aos descritos para outros países (SAVAGE et al., 1997; LICHTMAN & LIESVELD, 2001).

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com os índices de Sokal e EURO, notamos que a maioria deles pertenceu aos grupos de risco baixo e intermediário, sendo que mais de 50% deles esteve no grupo de risco intermediário. Numa série maior de casos BONIFAZI et al. (2000) encontrou 30% dos pacientes nessa faixa.

Um interesse sobre a LMC teve início em 1960, quando NOWELL & HUNGERFORD observaram um pequeno cromossomo, o cromossomo Ph, em pacientes com a doença. Assim, fizeram a primeira ligação consistente entre a anormalidade genética e a gênese da doença.

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com a presença ou a ausência do cromossomo Ph, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e avaliadas por meio da análise citogenética convencional, observamos que a anormalidade cromossômica esteve presente em todos eles. Em apenas dois casos, a porcentagem do cromossomo PH foi menor do que 100%. Este resultado está de acordo com as descrições prévias, uma vez que é fato esperado para o diagnóstico da LMC, que mais de 90% dos pacientes apresentem esta anormalidade cromossômica na maioria de suas células (MELO, 1996; WALLER et al., 1998).

Um interesse ainda maior sobre a LMC teve início com a descrição de que o cromossomo Ph resultava da translocação entre as porções dos braços longos dos cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973; PRAKASH & YUNIS, 1984), que determinava o gene quimérico *BCR-ABL*, com atividade na proliferação celular observada na doença (LION, 1996; MELO, 1996).

Os resultados das distribuições dos nossos pacientes de acordo a identificação e a quantificação do gene *BCR-ABL*, em amostras de MO obtidas ao diagnóstico e avaliadas por meio do método FISH e da RT-PCR, indicaram que a anormalidade gênica esteve presente em todos os casos incluídos no estudo. Estes resultados estão de acordo com as descrições de que afirmam que mais de 95% dos portadores de LMC, quando analisados por estes métodos obrigatoriamente apresentam a anormalidade gênica. (BRUÑO et al, 1998; SCHOCH et al., 2002). A importância deste fato é tal, que a última classificação da Organização Mundial de Saúde para as síndromes mieloproliferativas crônicas, define que o diagnóstico de LMC está sempre associado com a presença do gene *BCR-ABL* (VARDIMAN et al., 2002).

Tendo sido caracterizada a LMC em seus aspectos clínicos e moleculares, restou a questão de qual seria a terapêutica a ser administrada aos pacientes, tendo como objetivo o controle da doença e a cura. O tratamento medicamentoso convencional com a HU ou o bussulfano foi suficiente apenas para o controle dos sintomas mas, não interferiu com a evolução natural da doença (KANTARGIAN et al., 1985; GOLDMAN, 2002). Já o tratamento com o IFN (ITALIAN..., 1995; ALLAN et al., 1995, WETZLER et al., 1995; GOLDMAN, 2002) ou com o IFN em associação com o ARA-C (GUILHOT et al., 1997; BONIFAZI et al., 2001; KIRWOOD, 2002) pareceu prolongar a sobrevida dos pacientes com a doença. Mais recentemente, resultados animadores foram obtidos com o mesilato de imatinibe. Respostas hematológicas, citogenéticas e moleculares foram observadas em 90-94%, 50-67% e 1-4% dos pacientes incluídos em estudos variados (DRUKER et al., 2001; LARSON et al., 2002; KANTARJIAN et al., 2003). Em um único estudo conduzido por GOTLIB et al. (2002), respostas moleculares completas foram observadas em 22 de 35 pacientes (62,8%) tratados com o medicamento mas, todas foram de curta duração (variação: três a seis meses).

Ainda, a superioridade do mesilato de imatinibe sobre o IFN em associação com o ARA-C, no tratamento de cerca de mil pacientes com LMC, foi evidenciada no estudo conduzido por LARSON et al. (2002). Os autores observaram 95% de resposta citogenética completa em pacientes tratados com o mesilato de imatinibe e 55% de resposta citogenética completa naqueles tratados com o IFN e o ARA-C.

Entretanto, nem todos os pacientes respondem a esta terapêutica, resistências primárias e adquiridas ao medicamento foram descritas e ainda, permanece incerto se o tratamento prolonga a sobrevivência dos pacientes com LMC (O'BRIEN & DRUKER, 2002; ROCHE-LESTIENNE et al., 2002).

O transplante alogênico de MO, o TMO-alo, foi considerado a única possibilidade indiscutível de cura e a primeira indicação terapêutica para pacientes com LMC por muitos anos (GOLDMAN et al., 1993; McGLAVE et al., 1994; CLIFT et al., 1994; HOROWITZ et al., 1996; DRUKER et al., 2002), embora algumas desvantagens fossem a ele atribuídas, como a necessidade do doador de MO com compatibilidade aos antígenos HLA e a morbidade e mortalidade inerentes aos períodos de aplasia e a reação enxerto “versus” hospedeiro. Só mais recentemente, o procedimento passou a ser questionado após a descrição dos resultados obtidos com a administração do mesilato de imatinibe a pacientes com a doença (LARSON et al., 2002; O'BRIEN & DRUKER, 2002).

Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com a disponibilidade de doador de MO compatível, observamos que estes foram disponíveis para 23 dos 52 pacientes atendidos, de forma semelhante às descrições prévias. Vale comentar que a possibilidade de se encontrar um irmão consanguíneo compatível para um paciente com LMC está em torno de 30% a 40% (CARELLA et al., 1997).

O interesse no TMO-auto teve início com a descrição da coexistência de precursores hematológicos normais junto a precursores com o gene *BCR-ABL* em pacientes com LMC recém diagnosticados (COLOUMBEL et al., 1983; CARELLA et al., 1993). Esta proporção diminuía rapidamente com o passar do tempo (COLOUMBEL et al., 1983; CARELLA et al., 1993). Pelo menos no início da doença, em aproximadamente 75% dos pacientes, o reservatório de precursores hematopoiéticos normais estava relativamente bem preservado (FRASSONI et al., 1999a).

Vários estudos foram conduzidos empregando o TMO-auto no tratamento de pacientes com LMC. Inicialmente, pacientes em crise blástica foram transplantados, após altas doses de quimioterapia associadas ou não a radioterapia total, seguido do transplante de células criopreservadas colhidas da MO ou do sangue periférico, durante a fase crônica. Observou-se que a maioria dos pacientes, recuperou a hematopoiese e restabeleceu uma nova fase crônica, no entanto esta foi de curta duração e a progressão da doença e a morte ocorreram em seis a doze meses após o TMO-auto (HAINES et al., 1984; REIFFERS et al., 1991). Estes estudos, que mostraram a factibilidade do uso de células criopreservadas da MO ou periféricas como fonte para o TMO-auto, permitiram que estudos para estabelecer a eficácia do TMO-auto em pacientes em fase crônica da doença, fossem realizados.

Entre 1984 e 1992, HOYLE et al. (1994), usando o TMO-auto para tratar 21 pacientes na fase crônica da doença, mostraram que a sobrevida aos cinco anos foi significativamente maior (56%) do que a observada em pacientes tratados com quimioterapia convencional (28%). REIFFERS et al. (1994), em análise de 49 pacientes em fase crônica da doença que foram submetidos ao TMO-auto entre 1989 e 1991, também demonstraram o aumento da sobrevida e obtenção de respostas citogenéticas maiores em cerca de 50% deles. Os mecanismos envolvidos na obtenção de respostas citogenéticas em pacientes submetidos ao TMO-auto, realizados sem a mobilização ou a manipulação prévia do enxerto, permanecem incompreensíveis. É possível que a diminuição da população de células hematopoiéticas com o cromossomo Ph possa ser determinada pelos regimes de condicionamento pré-transplante. É possível também, que a célula precursora com o cromossomo Ph tenham desvantagens para a implante na MO em comparação às normais, favorecendo a pega do enxerto com célula precursora isenta do cromossomo Ph, após o transplante (BHATIA et al., 1997). Ainda, COLOUMBEL et al. (1983) observaram que o crescimento da célula precursora hematopoiética em cultura, provocou uma perda seletiva de células com o cromossomo Ph, favorecendo um maior número de células isentas da alteração gênica. Entre 1987 e 1992, 22 pacientes foram submetidos ao TMO-auto com células da MO cultivadas ex-vivo por dez dias. Dezesesseis pacientes apresentaram resposta citogenética, que foi completa para treze deles. No entanto, entre quatro e 36 meses após o TMO-auto, todos perderam esta resposta, com exceção de um único (BARNETT et al., 1994).

Outros estudos mostraram que a estratégia de tratar os pacientes com LMC com combinações de altas doses de quimioterápicos, similares aos utilizados para induzir remissão em leucemias agudas, resultou na obtenção de resposta citogenética transitória para até 50% dos pacientes (GOTO et al., 1982). Um paciente com LMC em fase blástica recebeu o TMO-auto com a CPP sem o cromossomo Ph, obtida após quimioterapia durante a sua fase crônica da doença e recuperou do transplante com resposta citogenética completa (KORBLING et al., 1981).

CARELLA et al. (1993) pode demonstrar que o uso nas fases iniciais da doença de um protocolo agressivo, permitia a obtenção de CPP isentas do cromossomo Ph. Outros investigadores também obtiveram coletas isentas do cromossomo Ph, utilizando a HU como quimioterápico (JOHNSON et al., 1997; PRATT et al., 1998).

Assim, na época do planejamento deste estudo, vários trabalhos mostravam indícios de que o tratamento da LMC com TMO-auto parecia trazer benefícios reais aos pacientes, aumentando a sobrevida, com um procedimento de menor morbidade. No entanto, não havia qualquer estudo controlado que reunisse casuística expressiva que permitisse responder com segurança a estas perguntas. O EBMT, através do protocolo EBMT-LMC 99, desenhou um ensaio clínico randomizado, multicêntrico e internacional, com objetivo primário de comparar o TMO-auto em associação com o IFN ao IFN como medicamento único no tratamento da LMC. A intenção era a de incluir setecentos pacientes para tal análise. Entretanto, a continuidade do estudo não foi possível devido a não inclusão de pacientes determinada pela possibilidade de tratamento com o mesilato de imatinibe. Assim, o projeto internacional foi concluído em novembro de 2001, após a inclusão de 82 pacientes, dos quais 21 eram procedentes do nosso serviço. Os pacientes submetidos ao TMO-auto representam a casuística deste estudo.

As coletas de CPP realizadas ao diagnóstico, cumpriram um objetivo ético, que era a de ter uma reserva em precursores hematológicos capazes de refazer a hemopoiese caso fosse necessário (EUROPEAN..., 1999). Não nos foi possível obter número adequado de células CD34⁺ ou células nucleadas em apenas três dos onze pacientes.

Quando nós realizamos os procedimentos quimioterápicos de mobilização para a coleta por leucaférese da CPP, os dois primeiros pacientes utilizaram o protocolo mini-ICE, em regime de internação hospitalar. Números maiores do que 5×10^6 /kg de células

CD34⁺ foram obtidos em ambos os pacientes. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por CARELLA (1999), utilizando o mesmo protocolo. As análises citogenética convencional e molecular de células obtidas dos produtos das leucaféreses, não puderam ser realizadas devido à inviabilidade da alíquota do material congelado para essa finalidade. Já as análises por RT-PCR foram realizadas e foram suficientes para evidenciar o gene *BCR-ABL*, em células das bolsas de CPP coletadas.

Já a HU foi o quimioterápico utilizado para a mobilização da CPP para os outros nove pacientes do estudo. Quando os nossos pacientes foram distribuídos de acordo com a eficácia da HU em possibilitar a coleta de número suficiente de células CD34⁺, notamos que ela foi adequada ao procedimento em cerca de 50% dos casos.

PRATT et al. (1998) usaram um protocolo semelhante ao nosso para a mobilização da CPP de dezoito pacientes portadores de LMC e não obtiveram número adequado de células CD34⁺ para o transplante em cerca de 30% dos casos, tendo considerado como número mínimo de células 2x10⁶/kg. Resultados semelhantes foram também obtidos no estudo conduzido por JOHNSON et al. (1997). Assim, podemos dizer que a eficácia da mobilização da CPP em nosso serviço, utilizando a HU, foi semelhante à obtida por estudos anteriores.

Nós realizamos novas tentativas para a obtenção da CPP em três dos quatro pacientes, com número insuficiente de células para o TMO-auto.

Quando analisamos nossos procedimentos de aférese para a coleta da CPP, considerando a presença do cromossomo Ph e do gene *BCR-ABL*, por meio da análise citogenética convencional, o método FISH e a RT-PCR, notamos que não conseguimos obter produtos celulares livres da contaminação pelo cromossomo Ph e pelo gene *BCR-ABL*. Resultados obtidos em outros estudos, com a utilização de protocolo de mobilização da CPP semelhante ao por nós utilizado indicaram que cerca de 20% dos produtos obtidos estavam livres de contaminação por células com o cromossomo Ph. No entanto, vale comentar que o gene *BCR-ABL* foi identificado nestes mesmos produtos, quando examinados pelo método FISH ou a RT-PCR. (JOHNSON et al., 1977; PRATT et al., 1998).

No entanto, como já apresentado, não foi esse o resultado por nós obtido. A explicação para este fato não é clara. Enfatizamos que o nosso estudo é constituído por pacientes recém diagnosticados e que foram submetidos aos procedimentos de mobilização da CPP precocemente, condições sugeridas por vários autores como ideais para a mobilização de grande número de precursores normais (CARELLA et al., 1993; BARNETT et al., 1994; FRASSONI et al., 1999b). É possível que em nossos casos a HU possa ter sido usada por período de tempo prolongado, determinado uma aplasia de MO de instalação lenta, incapaz de destruir os clones celulares doentes e desta forma, a recuperação medular se deu com precursores comprometidos pela anormalidade gênica.

Os procedimentos de mobilização da CPP mais agressivos e intensos, como o mini-ICE, apresentaram possibilidade de obtenção mais eficaz de precursores livres da doença (CARELLA et al., 1997; VERFAILLIE et al., 1998; WALLER, 1998; CARELLA, 2001a). Um caso, em que não foi possível obter número adequado de células para o TMO-auto, recebeu o protocolo mini-ICE como esquema de mobilização da CPP, em regime de internação hospitalar, como segunda tentativa de mobilização da célula. Desenvolveu período prolongado de aplasia de MO, com febre e toxemia. O paciente evoluiu para o óbito apesar do tratamento com antibióticos de amplo espectro e antimicóticos devido a falência de múltiplos órgãos, conseqüente à septicemia.

Vale comentar que a mortalidade associada aos esquemas quimioterápicos agressivos está em torno dos 5%. A neutropenia é na maioria das vezes prolongada, exigindo internações também prolongadas, que acaba expondo o paciente a maiores riscos de infecção por agentes hospitalares (CARELLA et al., 1997; MEHTA et al., 1996; CHALMERS et al., 1997; FISCHER et al., 1998).

Nove dos dez pacientes foram submetidos aos procedimentos do TMO-auto sem intercorrências. O condicionamento foi tolerado por todos, o número de células CD34⁺ infundidas foi maior que 2x10⁶/kg também para todos os pacientes e a “pega” do enxerto ocorreu com uma mediana de 14 dias. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores (CARELLA et al., 1997; FISHER et al., 1998; CARELLA et al., 1999).

Entretanto, um paciente, que havia apresentado a pega do enxerto no décimo primeiro dia, desenvolveu uma celulite em membro inferior, com evolução para septicemia e óbito no vigésimo primeiro dia após o TMO-auto, independentemente da antibioticoterapia administrada.

A taxa de mortalidade do nosso estudo foi de 18,2% (dois em onze pacientes incluídos no estudo) considerando o óbito relacionado aos procedimentos de mobilização da CPP e o óbito ocorrido no pós TMO-auto imediato.

As taxas de mortalidade relacionadas ao TMO-auto já foram maiores que 5% quando o condicionamento da MO era feito com irradiação corporal total ou quando os pacientes eram transplantados com células da MO (OLAVARRIA et al., 2000). Atualmente, a maioria dos serviços utiliza para o condicionamento, o bussulfano associado à ciclofosfamida ou como quimioterápico único e a fonte de células preferidas para o TMO-auto é a CPP. Isto contribui para redução dos índices de mortalidade relacionados ao procedimento (OLAVARRIA et al., 2000) mas, não para aboli-los.

Analisando a toxicidade do TMO-auto, PIGNEUX et al. (2001), concluíram que a mortalidade atribuída ao procedimento atualmente não excede 5% nas várias séries analisadas.

Entretanto, taxas de mortalidade similares à encontrada em nosso estudo foram descritas em outros estudos que reuniram pequenos grupos de pacientes. Taxas de mortalidade de 14% (1/7), 5% (5/105) e 15% (3/20) foram observadas nos estudos conduzidos por JOHNSON et al. (1997), CARELLA et al. (1999) e CHALMERS et al. (1997).

A mediana para o início do uso do IFN por nossos pacientes foi de seis meses. Havia um especial interesse no uso do IFN após o TMO-auto, porque relatos da literatura mostram que os melhores resultados com esse medicamento ocorrem em pacientes com pequena massa tumoral, sugerindo que seu uso logo após o TMO-auto, pudesse contribuir para a manutenção das respostas hematológica e citogenética completa obtida logo após o procedimento, ou mesmo para diminuir o número de cromossomos Ph nos que não respondessem imediatamente (PIGNEUX et al., 1999).

A resposta hematológica foi observada em cerca de 90,0% dos pacientes que receberam o TMO-auto e o IFN, sendo que esta se manteve em quatro pacientes até o término do estudo.

A resposta citogenética foi observada em cerca de 80,0% dos pacientes que receberam o TMO-auto e o IFN, sendo que esta se manteve em quatro pacientes até o término do estudo. Observamos ainda, que as medianas das porcentagens de cromossomo Ph em amostras de MO obtidas de pacientes durante o seguimento após o TMO-auto foram menores do que a observada em amostras de MO obtidas ao diagnóstico. Entretanto, a diferença de medianas só teve significado em amostras colhidas após seis meses do TMO-auto. Estes resultados estão em acordo com as descrições anteriores, nas quais o desaparecimento do cromossomo Ph ocorreu logo após o TMO-auto, mas, quase todos os pacientes perderam a resposta citogenética antes do primeiro ano de seguimento (FISHER et al., 1998; CARELLA & GOLDMAN, 2001b). É também possível que o pequeno número de casos avaliados em amostras obtidas em outros períodos do nosso estudo tenha interferido no significado estatístico das diferenças de medianas.

Já a resposta citogenética molecular por FISH, de graus variados, foi observada em todos os pacientes avaliados. Observamos que as medianas das porcentagens de núcleos interfásicos de amostras de MO obtidas de pacientes durante o seguimento após o TMO-auto foram menores do que a observada em amostras de MO obtidas ao diagnóstico. Também observamos que estas respostas foram em geral, maiores do que as observadas por meio da análise citogenética convencional, de acordo com os resultados obtidos por HESS et al. (2000). Uma possível explicação para esta diferença pode estar no fato de que o método FISH possibilita a avaliação de maior número de células e também de células que não estão em divisão, enquanto que a análise citogenética convencional tem como base apenas a avaliação de cromossomos em metáfase de células em divisão. Diferenças significativas de medianas foram observadas entre as amostras de MO obtidas de pacientes nos terceiro, sexto e nono meses após o TMO-auto e a observada em amostras obtidas ao diagnóstico. Estas descrições estão também de acordo com as descrições anteriores, nas quais a recidiva molecular da doença ocorreu durante o primeiro ano de TMO-auto (CARELLA et al., 1997; FISHER et al., 1998; CARELLA et al., 1999). É também possível

que o pequeno número de casos avaliados em amostras obtidas em outros períodos do nosso estudo tenha interferido no significado estatístico das diferenças de medianas.

Vale comentar que o método FISH possibilitou, em nosso estudo, a avaliação de casos, em que não foi possível obter um número suficiente de metáfases para a análise, uma vez que pode ser realizado em núcleos interfásicos. Assim, o método possibilitou a avaliação da doença residual, por meio da observação de duzentos ou até mesmo quinhentos núcleos interfásicos, de acordo com descrições anteriores (BRUÑO et al, 1998; DEWALD et al., 1998; HESS et al., 2000; SCHOCH et al., 2002).

A distribuição dos pacientes de acordo com os resultados obtidos da avaliação do gene *BCR-ABL* por RT-PCR, como já era esperado, indicou a presença do gene em todos os pacientes durante todo o estudo. Uma única paciente apresentou remissão molecular de curta duração identificada por este método.

Finalizando, todos os trabalhos que se propuseram a discutir o TMO-auto como terapêutica para pacientes com LMC, afirmam a necessidade da realização de estudos prospectivos e randomizados com grande número de casos para poder responder de forma definitiva qual o verdadeiro o papel representado pelo procedimento no tratamento de pacientes com a doença.

Com certeza este grande estudo randomizado não terá, pelo menos nos próximos anos, justificativa para ser realizado, na era do mesilato de imatinibe, que trouxe novas perspectivas para o tratamento de pacientes com LMC.

Entretanto, vale lembrar que os pacientes que receberam o TMO-auto com enxertos isentos de doença (MAcGLAVE et al., 1994; PODESTA et al., 2000; Olavarria et al., 2002) ou contaminados com a doença (MELONI et al., 2001) obtiveram nítidos benefícios relacionados ao aumento de sua sobrevida.

Ainda, as evidências de que recaídas citogenéticas ou moleculares podem ser tratadas com agentes pouco tóxicos, como o mesilato de imatinibe, indicam que o medicamento possa ser utilizado em associação com o TMO-auto, em um futuro próximo, de acordo com a proposta de DRUKER et al. (2001).



CONCLUSÕES

O TMO-auto em associação com o IFN possibilitou que pacientes com LMC obtivessem respostas hematológica, citogenética, citogenética molecular e molecular.

As porcentagens menores de cromossomo Ph e de núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL* em amostras de MO obtidas após o TMO-auto, em comparação às porcentagens das anormalidades cromossômica e gênica em amostras de MO obtidas ao diagnóstico, indicaram que o procedimento não determinou a extinção do clone anormal na MO dos pacientes avaliados mas, a diminuição numérica do mesmo.



*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

ALLAN, N. C.; RICHARDS, S. M.; SHEPHERD, P. C. – UK Medical Research Council randomized, multicentre trial of interferon-alpha for chronic myeloid leukemia: Improved survival irrespective of cytogenetic response: **Lancet**, 345: 1392, 1995.

ALTMAN, D. G. – Comparing groups-continuous data. In: ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research**. London: Chapman & Hall, 1991. 179p.

ANASTASI, J.; LE BEAU, M. M.; VARDIMAN, J. W.; WESTBROCK, C. A. – Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe: **Am J Pathol**, 136: 131, 1990.

BACCARANI, 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 randomised study of interferon- α versus interferon- α and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukaemia: **Blood**, 99: 1527, 2002.

BARNETT, M.; EAVES, C.; PHILLIPPS, G.; GASCOYNE, R.; HOGGE, D.; HORSMAN, D.; HUMPHRIES, R.; KLINGEMANN, H.; LANDSDORP, P.; NANTEL, S.; REECE, D.; SHEPHERD, J.; SPINELLI, J.; SUTHERLAND, H.; EAVES, A. – Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study: **Blood**, 84: 724, 1994.

BHATIA, R.; VERFAILLIE, C. M.; MILLER, J. S.; McGLAVE, P. B. – Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. **Blood**, 89: 2623, 1977.

BOLUDA, J. C.; CARRERAS, F. C.; MARIN, P.; RODRIGO, E. A.; ROVIRFA, M.; SOLE, F.; LLOVERAS, E.; ESPINET, B.; OCEJO, A.; MONTSERRAT, E. – Collection of Philadelphia-negative stem cells using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia patients treated with α -interferon: **Haematologica**, 87(1): 17, 2002

BONIFAZI, F.; VIVO, A.; ROSTI, G.; TIRIBELLI, M.; RUSSO, D.; TRABACCHI, E.; FIACCHINI, M.; MONTEFUSCO, E.; BACCARANI, M. – Testing Sokal's and the new prognostic score for chronic myeloid leukaemia treated with α -interferon: **Br J Haematol**, 111: 587, 2000.

BONIFAZI, F.; VIVO, A.; ROSTI, G.; GUILHOT, F.; GUILHOT, J.; TRABACCHI, E. – Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders: **Blood**, 98(10): 3074, 2001.

BRUÑO, I; WYATT, W. A.; ZINSMEISTER, A. R.; DIETZ-BAND, J.; SILVER, R. T.; DEWALD, G. W. – A special fluorescent in situ hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia: **Blood**, 92(7): 2315, 1998.

CARELLA A. M.; PODESTA, M.; FRASSONI, F.; RAFFO, M. R.; POLLICARDO, N.; PUNGOLINO, E. – Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia: **Bone Marrow Transplant**, 12(3): 267, 1993.

CARELLA, A. M.; CUNNINGHAM, I.; LERMA, E.; DEJANA, A.; BENVENUTO F.; PODESTÀ, M.; CELESTI, L.; CHIMIRRI, F.; ABATE, M.; VASSALLO, F.; FIGARI, O.; PARODI, C.; SESSAREGO, M.; VALBONESI, M.; CARLIER, P.; PRENCIPE, E.; GATTI, A. M.; BERG, D. V. D.; HOFFMAN, R.; FRASSONI, F. – Mobilization and transplantation of philadelphia-negative peripheral-blood progenitor cells early in chronic myelogenous leukemia: **J Clin Oncol**, 15: 1575, 1997.

CARELLA, A. M.; LERMA, E.; CORSETTI, M. T.; DEJANA, A.; BASTA, P.; VASSALLO, F. – Autografting with philadelphia chromosome-negative mobilized hematopoietic progenitor cells in chronic myelogenous leukemia: **Blood**, 93(5): 1534, 1999.

CARELLA, A. M. – Autografting with Ph-negative haematopoietic progenitor cells. In: CARRELA, A. M.; DALEY, G. Q.; EAVES, C. J.; GOLDMAN, J. M.; HEHMANN, R. **Chronic Myeloid Leukaemia**. London: Martin Dunitz, 2001a, 445p.

CARELLA, A. M.; MELO, J. V.; GOLDMAN, J. M. – Portofino International Conference on chronic myeloid leukemia: **Exp Hematol**, 29: 1147, 2001b.

CHALMERS, E. A.; FRANKLIN, I. M., KELSEY, S. M. – Treatment of chronic myeloid leukaemia in first chonic phase with idarubicin and cytarabine: mobilization of Philadelphia-negative peripheral blood stem cells: **Br J Haematol**, 96(3): 627, 1997.

CLIFT, R. A. – Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: **Cancer Treat Res**, 76: 1, 1995.

CLIFT, R. A.; BUCKNER, C. D.; THOMAS, E. D.; BRYANT, E.; ANASETTI, C.; BENSINGER, W. I. – Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia: **Blood**, 84(12): 4368, 1994.

COLOUMBEL, L.; KALOUSEK, D. K.; EAVES, C. J.; GUPTA, C. M.; EAVES, A. C. – Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: **N Engl J Med**, 308: 1493, 1983.

CWYNARSKI, K.; CRADDOCK, C.; COBBOLD, M.; APPLERLEY, J.; GOLDMAN, J. – Survival after bone-marrow transplantation: **Lancet**, 358(9288): 1157, 2002.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. – Basic haematological techniques. In: DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8.ed., Edinburg: Churchill Livingstone, 1995, 568p.

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

DEWALD, G. W.; WYATT, W. A.; JUNEAU, A. L.; CARLSON, R. O.; ZINSMEISTER, A. R.; JALA, S. M.; SPURBECK, J. L.; SILVER, R. T. – Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double *BCR/ABL* fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia: **Blood**, 91: 3357, 1998.

DRUKER, B. J.; SAWYERS, C. L.; KARTARJIAN, H.; RESTA, D. J.; REESE, S. F.; FORD, J. M.; CAPDEVILLE, R.; TALPAZ, M. – Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome: **N Engl J Med**, 344: 1038, 2001.

EUROPEAN Group for Blood and Marrow Transplantation. **Prospective randomized study comparing autologous stem cell transplantation with interferon-alpha with or without ARA-C in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukaemia in first chronic phase.** United Kingdom: EBMT, 1999, 27p.

FIALKOW, P. J.; JACOBSON, R. J.; PAPAYANNOPOULOU, T. – Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, platelet and monocyte/macrophage: **Am J Med**, 63(1): 125, 1977.

FISHER, T.; NEUBARNER, A.; MOHN, J.; HUHN, D.; DUSEMANN, C.; LINK, H.; ARSENIJEV, L.; BUSSING, B. – Chemotherapy-induced mobilization of karyotypically normal PBSC for autografting in CML: **Bone Marrow Transplant**, 21: 1029, 1998.

FRASSONI, F.; PODESTA, M.; PIAGGIO, G. – Normal and leukaemic haematopoiesis in bone marrow and peripheral blood of patients with chronic myeloid leukaemia: **Baillieres Best Pract Res Clin Haematol**, 12(1-2): 199, 1999a.

FRASSONI, F.; PODESTA, M.; PIAGGION, G.; ROSTI, V.; PITTO, A.; BENVENUTO, F.; FIGARI, O.; VASSALO, F.; CARELLA, A. M.; ZIKOS, P.; BERGAMASCHI, G.; FUGAZZA, G.; SESSAREGO, M.; CAZZOLA, M. – Normal primitive haemopoietic progenitors are more frequent than their leukaemic counterpart in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukaemia but rapidly decline with time: **Br J Haematol**, 104: 538, 1999b.

FRENOY, N.; CHABLI, A.; SOL, O.; GOLDSCHMIT, E.; LEMONNIER, M. P.; MISSET, J. L.; DEBUIRE, B. – Application of a new protocol for nested PCR to the detection of minimal residual bcr/abl transcripts: **Leukemia**, 8(8): 1411, 1994.

GALE, R. P.; HEHLMANN, R.; ZHANG, M-J.; HASFORD, J.; GOLDMAN, J. M.; HEIMPEL, H.; HOCHHAUS, A.; KLEIN, J. P.; KOLB, H-J.; McGLAVE, P. B.; PASSWEG, J. R.; ROWLINGS, P. A.; SOBOCINSKI, K. A.; HOROWITZ, M. M. German CML Study Group.– Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia: **Blood**, 91: 1810, 1998.

GEARY, C. G. – Historical Review: The story of chronic myeloid leukaemia: **Br J Haematol**, 110: 2, 2000.

- GOLDMAN, J. M. – Chronic myeloid leukaemia--the XXI century: **Leuk Lymphoma**, 11(Suppl 1): 7, 1993.
- GOLDMAN, J. M.; DRUKER, B. J. – Chronic myeloid leukemia: current treatment options: **Blood**, 98: 2039, 2001.
- GOLDMAN, J. M. – Treatment of chronic myeloid leukaemia: lessons and challenges:**Int J Hematol**, 76(Suppl 2): 189, 2002.
- GOMEZ, G. A.; SOKAL J. E.; WALSH, D. – Prognostic features at diagnosis of chronic myelocitic leukemia: **Cancer**, 47: 2470, 1981.
- GOTLIB, J.; CAO, T.; JONES, C.; YEUNG, C.; DUGAN, K.; FALKOW, R.; ZEHNDER, J. L.; COUTRE, S. E. – Serial real-time quantitative RT-PCR monitoring reveals frequent and rapid relapses after molecular remissions in chronic phase (CP) CML patients treated with mesylate (GLEEVECTM). In: Annals of Annual Meeting of the American Society of Hematology, 44th, 2002, Philadelphia: ASH, 2002.
- GOTO, T.; NISHIKORI, M.; ARLIN, Z.; GEE, T.; KEMPIN, S.; BURCHENAL, J.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEK, C.; LITTLE, C.; JHANWAR, S.; CHAGANTI, R.; CLARKSON, B. – Growth characteristics of leukemic and normal hematopoietic cells in Ph⁺ chronic myelogenous leukemia and effects of intensive treatment: **Blood**, 59(4): 793, 1982.
- GRATAMA, J. W.; ORFAO, A.; BARNETT, D.; BRANDO, B.; HUBER, A.; JANOSSY, G.; JOHNSEN, H. E.; KEENEY, M.; MARTI, G. E.; PREIJERS, F.; ROTHE, G.; SERKE, S.; SUTHERLAND, R. D.; SCHOOT, C. E.; SCHMITZ, G.; PAPA, S. – Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells: **Cytometry**, 34: 128, 1998.
- GUILHOT, F.; CHASTANG, C.; MICHALLET, M.; GUERCI, A.; HAROUSSEAU, J. L.; MALOISEL, F.; BOUABDALLAH, R.; GUYOTAT, D.; CHERON, N.; NICOLINI, F.; ABGRALL, J. F.; TANZER, J.; NAVARRO, M.; BORDERSOULE, D.; MORICE, P.; IFRAH, N.; ROCHANT, H.; VILQUE, J-P.; DELAIN, M.; BAUTERS, F.; GUILHOT, J.– Interferon alpha-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group:**N Engl J Med**, 337: 223, 1997.

HAINES, M. E.; GOLDMAN, J. M.; WORSELY, A. M.; McCARTHY, D. M.; WYATT, S. E.; DOWDING, C.; KEARNEY, L.; TH'NG, K. H.; WAREHAM, N. J.; POLLOCK, A.; GALVIN, M. C.; SAMSON, D.; GEARY, C. G.; CATOVSKY, D.; GALTON, D. A. G. – Chemoterapy and autografting for chronic granulocytic leukaemia in transformation: probable prolongation of survival for some patients: **Br J Haematol**, 58(4): 711, 1984.

HASFORD, J.; PFIRRMANN, M.; HEHLMANN, 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: **J Natl Cancer Inst**, 90: 850, 1998.

HEHLMANN, R.; ANSARI, H.; HEIMPEL, H.; HOSSFELD, D. K.; KOLB, H. J.; LUFFLER, H.; PRALLE, H.; QUEISSER, W.; REITER, A.; HOCHHAU'S, A.; GERMAN CML-STUDY GROUP – Comparative analysis of the impact of risk profile and of drug therapy on survival in CML using Sokal's index and a new score: **Br J Haematol**, 97: 76, 1997.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; KOLB, H. J.; PRALLE, H.; HOSSFELD, D. K.; QUEISSER, W.; LOFFLER, H.; HEINZE, B.; GEORGII, A. – Randomized comparison of bussulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German Study Group: **Blood**, 82(2): 398, 1993.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; KOLB, H. J.; PRALLE, H.; HOSSFELD, D. K.; QUEISSER, W.; LOFFLER, H.; HOCHHAUS, A.; HEINZE, B. GEORGII, A;BARTRAN, C. R.; GRIESSHAMMER, M.; BERGMAN, L.; ESSERS, U.; FALGE, C.; QUEISSER, U.; MEYER, P.; SCHIMITZ, N.; EIMERMACHER, H.; WALTER, F.; FETT, W. – Randomized comparison of interferon- α with bussulfan and hydroxyurea in chronic myeloid leukemia: **Blood**, 84: 4064, 1994.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BERGER, U.; REITER, A. – Current trends in the management of chronic myelogenous leukemia: **Ann Hematol**, 79: 345, 2000.

HEIM, S.; MITELMAN, F. – **Chronic Myeloid Leukemia**: 2 ed. New York: Willey-Liss, 1995.

HESS, G.; REIFENRATH, C.; FRIEDRICH-FREKSA, A.; BEYER, V.; NAUMANN, S.; SCHUCH, B.; HUBER, C.; FISHER, T.; DECKER, H-J. – Autologous transplantation of in vivo purged PBSC in CML: Comparison of FISH, Cytogenetics, and PCR detection of Philadelphia chromosome in leukapheresis products: **Cancer Genet Cytogenet**, 117: 1, 2000.

HOROWITZ, M. M.; ROWLINGS, P. A.; PASSWEG, J. R. – Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry: **Bone Marrow Transplant**, 17(Suppl 3): S5, 1996.

HOYLE, C.; GRAY, R.; GOLDMAN, J. – Autografting for patients with CML in chronic phase: an update. Hammersmith BMT Team LRF Centre for Adult Leukaemia: **Br J Haematol**, 86(1): 76, 1994.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. - Estimativa da Incidência e mortalidade por câncer no Brasil: Disponível em: www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa2002/leucemia.html. Acesso em 22 de dezembro de 2002.

ITALIAN Cooperative Group on Chronic Myeloid Leukemia. – Chronic myeloid leukemia, *BCR/ABL* transcript, response to alpha interferon and survival: **Leukemia**, 9: 1648, 1995.

JOHNSON, R. J.; SMITH, G. M. – Mobilisation and reinfusion of Philadelphia negative peripheral blood mononuclear cells in chronic myeloid leukaemia with hydroxyurea and G-CSF: **Leuk Lymphoma**, 27(5-6): 401, 1997.

KAEDA, J.; CHASE, A.; GOLDMAN, J. M. – Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia: **Acta Haematol**, 107(2): 64, 2002.

KANTARJIAN, H. M.; KEATING, J. M.; SMITH, T. L.; TALPAZ, M.; McCREDIE, K. B. – Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia: **Am J Med**, 88: 1, 1990.

KANTARJIAN, H. M.; SMITH, T. L.; MACCREDIE, K. B.; KEATING, M. J.; WALTERS, R. S.; TALPAZ, M.; HESTER, J. P.; BLIGHAM, G.; GEHAN, E.; FREIREICH, E. J. – Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival: **Blood**, 66: 1326, 1985.

KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; NIEDERWIESER, D.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R.; ZOELLNER, U.; TALPAZ, M.; DRUKER, B. – Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia: **N Engl J Med**, 347(6): 446, 2002.

KANTARJIAN, H. M.; CORTES, J. E.; O'BRIEN, S.; GILES, F.; GARCIA-MANERO, G.; FADERL, S.; THOMAS, D.; JEHA, S.; RIOS, M. B.; LETVAK, L.; 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 cytogenetic responses: **Blood**, 101(1): 97, 2003.

KIRKWOOD, J. – Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience: **Semin Oncol**, 29(Suppl 7): 18, 2002.

KORBLING, M.; BURKE, P.; BRAINE, H.; ELFENBEIN, G.; SANTOS, G.; KAIZER, H. – Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia: **Exp Hematol**, 9(6): 684, 1981.

LARSON, R. A. Imatinib (STI571, Gleevec™) as initial therapy for patients with newly diagnosed Ph⁺ chronic myeloid leukemia: Results of a randomized phase III study vs Interferon-Alpha + Cytarabine (IFN+AraC). In: Annals of Annual Meeting of the American Society of Hematology, 44th, 2002, Philadelphia: ASH, 2002.

LEE, S. J. – Review: chronic myelogenous leukaemia: **Br J Haematol**, 111(4): 993, 2000.

LICHTMAN, M. A.; LIESVELD, J. L. – Chronic myeloid leukemia and related disorders. In: Beutler, E ; Lichtman, M. A.; Coller, B. S. ; Kipps, T. J. ; Seligsohn, U. **Hematology**, 6th. New York: McGraw-Hill, 2001, 1085p.

LION, T. – Clinical implications of qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis in the monitoring of patients with chronic myelogenous leukemia: **Bone Marrow Transplant**, 14: 505, 1994.

LION, T. – Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia: methodological approaches and clinical aspects: **Leukemia**, 10: 896, 1996.

LUNA, L. G. – Methods for hematologic and nuclear elements. In: Luna, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology**: 3 ed. New York, McGraw-Hill, 1968.

McGLAVE, P. B.; De FABRITIS, P.; DEISSEROTH, A.; GOLDMAN, J.; BARNETT, M.; REIFFERS, J.; SIMONSSON, B.; CARELLA, A.; AEPPLI, D. – Autologous transplant for chronic chronic myelogenous leukaemia: Results from eight transplant groups: **Lancet**, 343: 1486, 1994.

MELO, J. V. – Overview. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia: **Leukemia**, 10: 751, 1996.

MELONI, G.; CAPRIA, S.; VIGNETTI, M.; ALIMENA, G.; FABRITIS, P.; MONTEFUSCO, E.; MANDELLI, F. – Ten-year follow-up of a single center prospective trial of unmanipulated peripheral blood stem cell autograph and interferon- α in early phase chronic myeloid leukemia: **Haematologica**, 86(6): 596, 2001.

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

O'BRIEN, S. G.; DRUKER, B. J. – Current status of trials of imatinib mesylate (STI571, GLEEVEC) alone and in combinations. In: Druker, B. J.; O'Brien, S. G.; Cortez, J.; Radich, J. **Chronic Myelogenous Leukemia - Educational Book**. American Society of Hematology, 2002, 111p.

OLAVARRIA, E.; KANFER, E.; SZYDLO, R. – High-dose busulphan alone as cytoreduction before allogeneic or autologous stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the MD Anderson experience: **Br J Haematol**, 108: 769, 2000.

OLAVARRIA, E.; REIFFERS, J.; BOQUE, C.; SUREDA, A.; MELONI, G.; MICHALLET, M.; CLARK, R. E.; BLAISE, D.; CARELLA, A. M.; CAHN, J-Y.; JOUET, J. P.; RIZOLLI, V.; BIEZEN, A. V.; GRATWOHL, A.; GOLDMAN, J. M.; NIEDERWIESER, D.; APPERLEY, J. F. – The post-transplant cytogenetic response to interferon is a major determinant of survival after autologous stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia in chronic phase: **Br J Haematol**, 118: 762, 2002.

PIGNEUX, A.; FABERES, C.; BOIRON, J.M. – Autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia: a single center experience: **Bone Marrow Transplant**, 24: 265,1999.

PIGNEUX, A.; OLAVARRIA, E.; MAHON, F. X.; REIFFERS, J. Autografting with unmanipulated stem cells: The European experience. In: Carrel, A. M.; Daley, G. Q.; Eaves, C. J.; Goldman, J. M.; Hehmann, R. **Chronic Myeloid Leukaemia**. London: Martin Dunitz, 2001, 421p.

PODESTA, M.; PIAGGION, G.; SESSAREGO, M.; PITTO, A.; FIGARI, O.; SORACCO, M.; CARELLA, A. M.; DEJANA, A.; ROSTI, V.; FUGAZZA, G.; RFAVERA, G.; LERMA, E.; CAZZOLA, M.; BACIGALUPO, A.; FRASSONI, F. – Autografting with Ph-negative progenitors in patients at diagnosis of chronic myeloid leukemia induces a prolonged prevalence of Ph-negative hemopoiesis: **Exp Hematol**, 28: 210, 2000.

PRAKASH, O.; YUNIS, J. J. – High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemia's: **Cancer Genet Cytogenet**, 11: 361, 1984.

PRATT, G.; JOHNSON, R. J.; RAWSTRON, A. C.; BARNARD, D. L.; MORGAN, G. J.; SMITH, G. M. Autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia using Philadelphia chromosome negative blood progenitors mobilised with hydroxyurea and G-CSF: **Bone Marrow Transplant**, 21: 455, 1998.

RADICH, J. P.; KOPECKY, K. J.; BOLDT, D. H.; HEAD, D.; SLOVAK, M.; BABU, R.; KIRK, J.; LEE, A.; KESSLER, P.; APPELBAUM, F.; GEHLY, G. – Detection of BCR-ABL fusion genes in adult acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction: **Leukemia**, 8: 1688, 1994.

RADICH, J. P. – Detection of minimal residual disease in acute and chronic leukemias: **Curr Opin in Hematol**, 3: 310, 1996.

REIFFERS, J.; TROUTTE, R.; MARIT, G.; MONTASTRUC, M.; FABERS, C.; CONYMAKHOUL, P.; DAVID, B.; BOURDEAU, M. J.; BILHOU-NABERA, C.; LACOMBE, F.; FEUILLATRE-FABRE, F.; VERZON, G.; BERNARD, P. H.; BROUSTET, A. – Autologous blood stem cell transplantation for chronic granulocytic leukaemia in transformation: a report of 47 cases: **Br J Haematol**, 77(3): 339, 1991.

REIFFERS, J.; GOLDMAN, J.; MELONI, G.; CAHN, J. Y.; GRATWOHL, A. – Autologous stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: a retrospective analysis of the European Group for Bone Marrow Transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the EBMT: **Bone Marrow Transplant**, 14(3): 407, 1994.

ROCHE-LESTIENNE, C.; SOENEN-CORNU, V.; GRARDEL-DUFLOS, N. – Several types of mutations of the ABL gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment: **Blood**, 100: 1014, 2002.

ROWLEY, J. D. – A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining: **Nature**, 243: 290, 1973.

SAVAGE, D. G.; SZYDLO, R. M.; GOLDMAN, J. M. – Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral center over a 16-year period: **Br J Hematol**, 96: 111, 1997.

SAWYERS, C. L.; HOCHHAUS, A.; FELDMAN, E.; GOLDMAN, J. M.; MILLER, C. B.; OTTMAN, O.G.; SCHIFFER, C. A.; TALPAZ, M.; GUILHOT, F.; DEININGER, M. W.; FISS, T.; O'BRIEN, S. G.; STONE, R. M.; GAMBACORTI-PASSERINI, C. B.; RUSSEL, N. H.; REIFFERS, J. J.; SHEAQ, T. C.; CHAPUIS, B.; COUTRE, S.; TURA, S.; MORRA, E.; LARSON, R. A.; SAVEN, A.; PESCHEL, C.; GRATWOHL, A.; MANDELLI, F.; BEN-AM, M.; GATHMANN, I.; CAPDEVILLE, R.; PAQUETTE, R. L.; DRUKER, B. J.– Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study:**Blood**, 99: 3530, 2002.

SCHOCH, C.; SCHNITTGER, S.; HOCHHAUS, A.; BERGER, U.; HEHLMANN, R.; HIDDEMAN, W.; HAFERLACH, T. – Comparison of chromosome banding analysis, interphase-and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases: **Leukemia**, 16: 53, 2002.

SOKAL, J. E.; COX, E. B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G. A.; ROBERTSON, J. E.; TSO, C. Y.; BRAUN, T. J.; CLARKSON, B. D.; CERVANTES, F.; ROZMAN, C.– Prognostic discrimination in ‘good risk’ chronic granulocytic leukemia. The Italian Cooperative CML Study Group: **Blood**, 63: 789, 1984.

STEVENS, M. R. – Hydroxyurea: an overview: **J Biol Regul Homeost Agents**, 13(3): 172, 1999.

SWANSBURY, G. J. – Cytogenetic technique for human leukaemias. In: Pollard, J.M.; Walker, J.M. **Methods in Molecular Biology**. Totowa: N.J., Human Press Inc., 1997, 323p.

THOMAS, M. J.; IRVING, J. A. E.; LENNARD, A. L.; PROCTOR, S. J.; TAYLOR, P. R. A. Northern Region Haematology Group. – Validation of the Hasford score in a demographic study in chronic granulocytic leukaemia: **J Clin Pathol**, 54: 491, 2001.

TSAO, A. S.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. – STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. Review: **Br J Haematol**, 119: 15, 2002.

VARDIMAN, J. W.; HARRIS, L. H.; BRUNNING, R. D. – The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms: **Blood**, 100: 2292, 2002.

VERFAILLIE, M. C.; BHATIA, R.; STEINBUCH, M.; DEFOR, T.; HIRSCH, B.; MILLER, J. S.; WEISDORF, D.; McGLAVE, P. B. – Comparative analysis of autografting in chronic myelogenous leukemia: effects of priming regimen and marrow on blood origin of stem cells: **Blood**, 92(5): 1820, 1998.

WALLER, C. F.; HEINZINGER, M.; ROSENSTIEL, A.; LANGE, W. – Mobilization and transplantation of Philadelphia chromosome-negative peripheral blood progenitor cells in patients with CML: **Br J Haematol**, 103: 227, 1998.

WETZLER, M.; KANTARJIAN, H.; KURZROCK, R.; TALPAZ, M. – Interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: **Am J Med**, 9: 402, 1995.



ANEXOS

Critérios para diagnóstico da leucemia mielóide crônica

Fase crônica

Número de leucócitos no sangue periférico $\geq 10,0 \times 10^3/\text{mm}^3$

Porcentagem de mieloblastos no sangue periférico e medula óssea $\leq 10\%$,

Presença do cromossomo Philadelphia à análise por citologia convencional,

Presença do gene *BCR-ABL* por RT-PCR em casos onde o cromossomo Philadelphia não estiver presente.

Fase acelerada

Dificuldade para controlar a leucocitose com o uso de IFN e/ou HU considerando as doses necessárias ou a diminuição do intervalo entre elas,

Porcentagem de blastos $> 10\%$ no sangue periférico ou medula óssea,

Porcentagem de basófilos ou eosinófilos $> 20\%$,

Anemia ou plaquetopenia não relacionada ao uso de IFN alfa ou hidroxiuréia

Aparecimento de mielofibrose ou cloromas.



**Termo de consentimento livre e esclarecido para participação
do projeto de estudo intitulado**

**“IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇA RESIDUAL EM PACIENTES COM LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA APÓS TERAPÊUTICA COM O INTERFERON ALFA OU O
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE MEDULA ÓSSEA”**

O participante deve preencher esta folha por ele mesmo (por favor, coloque um X em cada linha,
se você concordar).

- Eu li a folha de informações do estudo
- Eu tive a oportunidade de perguntar minhas dúvidas sobre o estudo
- Eu recebi satisfatoriamente todas as respostas
- Eu recebi informações suficientes sobre o estudo

O estudo me foi explicado pelo Dr.(a):

- Eu entendo que estou livre para sair do estudo a qualquer momento sem ter que dar explicações e isso não afetará o meu tratamento.
- Eu concordo em tomar parte deste estudo.

Assinatura _____ Data ___/___/___

Nome em letra de forma: _____

Assinatura do investigador: _____ Data: ___/___/___

Nome em letra de forma: _____

Folha de Informações para os Pacientes

Nós gostaríamos de convidá-lo a participar de um estudo clínico que está sendo realizado em muito hospitais na Europa e no Brasil. Este estudo está sendo organizado pelo Grupo Europeu de Transplante de Medula. Sua participação é voluntária e você pode sair do estudo a qualquer momento. Se você não quiser participar ou se abandonar o estudo, seu tratamento futuro e a qualidade dos cuidados médicos os quais você receberá não serão afetadas de modo algum.

Estudo Prospectivo Randomizado comparando Transplante Autólogo- CPP com Interferon-alpha com ou sem Ara-C em pacientes com diagnóstico de LMC “de novo” em primeira fase crônica

A proposta do estudo é tentar responder a pergunta se a combinação do auto-transplante e o Interferon (com ou sem Ara-C) é melhor do que o Interferon (com ou sem o Ara-C) sozinho. Você será tratado inicialmente com Hidroxiurea, se necessário, para controlar a leucemia.

Na hora de entrar no estudo, você será sorteado para receber Interferon (com ou sem Ara-C) ou o transplante autólogo seguido pelo Interferon (com ou sem Ara-C). A escolha de associar o Ara-C no tratamento com o Interferon será feita pelo seu médico.

O Interferon é dado através de uma injeção de 5 a 7 dias por semana. Alguns pacientes sofrem efeitos colaterais variados. É comum sentir um mal estar com este remédio, frequentemente semelhante a um resfriado: dores musculares, perda de apetite. Esses sintomas são mais freqüentes no início do tratamento e podem ser controlados usando o interferon antes de ir para a cama com uma dose de tylenol um hora antes.

O Ara-C é também ministrado através de uma injeção, normalmente 10 dias consecutivos todo mês. Embora possa agravar os efeitos colaterais do interferon, ele é normalmente bem tolerado. Ambos os remédios precisam ser monitorados com exames de sangue para monitorar a resposta.

O auto-transplante envolve duas fases. Primeiro, a coleta das células precursoras do seu sangue o qual pode ser feita de dois jeitos diferentes. As suas células precursoras deverão ser coletadas ao diagnóstico. Embora esta coleta contenha algumas células normais, a maioria das células será leucêmicas. Alguns estudos mostram que é possível uma coleta mais limpa através de curso prévio de quimioterapia (mobilização) no paciente. O real benefício dessa abordagem ainda precisa ser definido. Seu médico também decidirá como será a realização do transplante e a coleta ao diagnóstico com ou sem mobilização. Eles serão orientados pela experiência do centro em que trabalham.

A segunda fase envolve receber altas doses de quimioterapia seguida pela re-infusão das células precursoras coletadas anteriormente, isso é o chamado auto-transplante. O tratamento com interferon associado ou não com Ara-C pode ser iniciado uma vez que o paciente recuperou-se do auto-transplante.

Por favor, sinta-se a vontade para discutir qualquer um dos pontos com o seu médico. Para mais informações, você pode telefonar para um dos médicos da equipe.

Assinatura:

Data: ___/___/___

Distribuição dos dez controles e dos onze pacientes com Leucemia mielóide crônica de acordo com as porcentagens de núcleos interfásicos com o gene BCR-ABL, normais e não informativos

Nº	Núcleos FISH positivos (%)	Núcleos FISH negativos (%)	Núcleos FISH indeterminados (%)
Controles			
1	0,5	93,6	5,9
2	0,0	97,5	2,5
3	0,5	95,6	3,9
4	0,0	99,0	1,0
5	0,5	97,5	2,0
6	0,0	93,0	7,0
7	0,0	95,0	5,0
8	0,0	94,0	6,0
9	0,0	90,5	9,5
10	1,5	96,0	2,5
Média	0,3	95,1	4,5
DP	0,4	2,5	2,6
+ 3 DP	1,4	7,5	7,9
Pacientes			
1	Não realizado	Não realizado	Não realizado
2	Não realizado	Não realizado	Não realizado
3	80,09	12,91	7,00
4	45,00	52,50	2,50
5	82,50	6,50	11,00
6	89,00	5,50	5,50
7	86,50	7,00	6,50
8	79,60	6,46	13,94
9	86,50	6,25	7,25
10	84,50	3,50	12,00
11	78,00	9,50	12,50
Média	79,10	12,20	8,70
DP	13,30	15,30	3,80
Mediana	82,50	6,50	7,30
(Variação)	(45,00-89,00)	(3,50-52,50)	(2,50-13,90)

Distribuições dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com os números de células nucleadas e CD34 positivas e porcentagens de cromossomo Philadelphia e núcleos interfásicos com o gene *BCR-ABL*, identificados por meio do método FISH e os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL*, por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, em amostras obtidas com o procedimento de mobilização da célula precursora periférica

Número Caso	Data (N coleta)	Células		Metáfases		<i>BCR-ABL</i> (RT-PCR)
		nucleadas (x10 ⁸ /kg)	Células CD34+ (x10 ⁶ /kg)	analizadas / Ph+ (%)	FISH + (%)	
1	24/dez/98 (1)	0,46	0,97	Não realizado	Não realizado	Positivo
	25/dez/98 (2)	0,98	2,76	Não realizado	Não realizado	Positivo
	26/dez/98 (3)	0,84	2,44	Não realizado	Não realizado	Positivo
2	21/jul/98 (1)	1,43	2,16	Não realizado	Não realizado	Positivo
	22/jul/98 (2)	4,38	2,92	Não realizado	Não realizado	Positivo
3	29/jun/00 (1)	2,22	1,80	40/100	80,00	Positivo
	30/jun/00 (2)	3,63	5,22	40/100	46,00	Positivo
4	01/ago/00 (1)	1,86	1,61	20/70	74,50	Positivo
	02/ago/00 (2)	2,02	2,73	20/65	83,90	Positivo
	03/ago/00 (3)	1,15	1,13	20/85	6,50	Positivo
5	15/set/00 (1)	1,71	0,21	17/100	72,50	Positivo
	16/set/00 (2)	2,99	0,42	12/100	76,60	Positivo
	18/set/00 (3)	1,47	0,11	15/100	58,00	Positivo
	19/set/00 (4)	1,74	0,23	20/100	29,00	Positivo
	21/set/00 (5)	3,01	0,35	20/100	14,00	Positivo
6	09/nov/00 (1)	1,05	0,01	16/100	78,50	Positivo
	10/nov/00 (2)	1,67	0,01	30/10	43,40	Positivo
7	05/mar/01 (1)	0,52	2,32	15/73	78,15	Positivo
	06/mar/01 (2)	1,1	6,08	20/95	72,10	Positivo
8	01/jun/01 (1)	3,66	0,34	9/100	Mat. Inadequado	Positivo
	02/jun/01 (2)	4,05	1,01	18/100	7,35	Positivo
	04/jun/01 (3)	5,34	3,43	20/100	67,50	Positivo
9	03/set/01 (1)	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
	04/set/01 (2)	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
	05/set/01 (3)	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
	06/set/01 (4)	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado

07/set/01 (5)	Não realizado				
10/set/01 (6)	Não realizado				
11/set/01 (7)	Não realizado				
12/set/01 (8)	Não realizado				
14/set/01 (9)	Não realizado				
16/out/01 (1)	4,22	15,21	20/20 (100)	75,0	Positivo

10	09/nov/01 (1)	1,01	0,06	Mat. Inadequado	70,90	Positivo
	10/nov/01 (2)	0,89	0,07	Mat. Inadequado	60,00	Positivo
	13/nov/01 (3)	1,36	0,28	Mat. Inadequado	46,00	Positivo
	14/nov/01 (4)	1,36	0,43	Mat. Inadequado	14,50	Positivo
	15/nov/01 (5)	1,35	0,72	Mat. Inadequado	8,50	Positivo
	16/nov/01 (6)	1,93	1,1	Mat. Inadequado	6,50	Positivo
	17/nov/01 (7)	1,61	1,32	Mat. Inadequado	6,00	Positivo
	18/nov/01 (8)	1,55	2,33	Mat. Inadequado	5,50	Positivo
11	13/nov/01 (1)	Não realizado	NR	Mat. Inadequado	8,50	Não realizado
	14/nov/01 (2)	Não realizado	NR	Mat. Inadequado	63,60	Não realizado
	15/nov/01 (3)	Não realizado	NR	Mat. Inadequado	51,50	Não realizado

Distribuições dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com os números de células nucleadas e CD34 positivas e as porcentagens de metáfases com o cromossomo Philadelphia e de núcleos interfásicos com o gene BCR-ABL, identificados por meio da análise citogenética convencional e método FISH, e os resultados da pesquisa do gene BCR-ABL por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, em amostras de célula precursora periférica utilizadas para o transplante autólogo de medula óssea

Número Caso	Células nucleadas (x 10⁸/kg)	Células CD34+ (x 10⁶/kg)	Metáfases analisadas/ Ph + (%)	Núcleos FISH+ (%)	BCR-ABL (RT-PCR)
1	0,46	0,97	Não realizado	Não realizado	Positivo
1	0,98	2,76	Não realizado	Não realizado	Positivo
2	1,43	2,16	Não realizado	Não realizado	Positivo
2	4,38	2,92	Não realizado	Não realizado	Positivo
3	3,63	5,22	40/100	46,00	Positivo
4	1,86	1,61	20/70	74,50	Positivo
4	2,02	2,73	20/65	83,90	Positivo
4	1,15	1,13	20/85	6,50	Positivo
5	1,71	0,21	17/100	72,50	Positivo
5	2,99	0,42	12/100	76,60	Positivo
5	1,47	0,11	15/100	58,00	Positivo
5	1,74	0,23	20/100	29,00	Positivo
5	3,01	0,35	20/100	14,00	Positivo
5	18,87	17,92	17/100	82,50	Positivo
6	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
7	0,52	2,32	15/73	78,15	Positivo
7	1,1	6,08	20/95	72,10	Positivo
8	3,66	0,34	9/100	Mat. Inadequado	Positivo
8	4,05	1,01	18/100	7,35	Positivo
8	5,34	3,43	20/100	67,50	Positivo
9	4,22	15,21	20/20 (100)	75,0	Positivo
10	1,01	0,06	Mat. Inadequado	70,90	Positivo
10	0,89	0,07	Mat. Inadequado	60,00	Positivo
10	1,36	0,28	Mat. Inadequado	46,00	Positivo
10	1,36	0,43	Mat. Inadequado	14,50	Positivo
10	1,35	0,72	Mat. Inadequado	8,50	Positivo
10	1,93	1,1	Mat. Inadequado	6,50	Positivo
10	1,61	1,32	Mat. Inadequado	6,00	Positivo
10	1,55	2,33	Mat. Inadequado	5,50	Positivo
11	11,08	6,69	5/20 (25)	86,5	Positivo

Distribuição dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com os números de cromossomos em metáfases analisados e as porcentagens do cromossomo Philadelphia obtidas por meio da análise citogenética convencional em células da medula óssea avaliadas ao diagnóstico e após o transplante autólogo de medula óssea

Número		Número de meses									
Caso	Diagnóstico	3	6	9	12	15	18	24	30	36	42
1	16/62	30/20	NR	24/58	30/40	20/50	22/0	29/48	22/95	23/95	MI
2	20/100	MI	28/28	21/19	30/0	32/0	30/0	MI	20/0	21/0	MI
3	20/100	30/36	35/54	20/30	MI	NR	16/12	NA	NA	NA	NA
4	25/100	22/63	20/60	MI	22/60	37/57	80/25	NA	NA	NA	NA
5	24/100	30/23	20/70	21/100	23/100	MI	26/12	NA	NA	NA	NA
6	16/100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	20/100	20/95	11/100	19/100	19/100	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	20/100	MI	27/100	MI	30/100	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	15/100	MI	15/86	MI	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	20/100	MI	22/100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	20/30	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Sendo: os números apresentados representam os números de metáfases examinadas / as porcentagens de metáfases com o cromossomo Philadelphia; MI, material inadequado para a análise; NA, tempo de avaliação não atingido

Distribuição dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com as porcentagens do gene *BCR-ABL*, analisado com o método FISH, em células da medula óssea ao diagnóstico e após o transplante autólogo de medula óssea

Número Caso	Diagnóstico	Número de meses					
		3	6	9	12	15	18
1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	80,09	8,90	10,50	0,50	6,70	NR	10,00
4	45,00	1,50	0,50	14,00	7,70	11,00	13,00
5	82,50	1,00	25,00	18,10	9,30	7,00	7,50
6	89,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	86,50	7,30	4,95	8,50	13,00	NA	NA
8	79,60	4,00	3,50	18,10	11,00	NA	NA
9	86,50	2,00	7,30	15,50	NA	NA	NA
10	84,50	5,5	89,00	NA	NA	NA	NA
11	78,00	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Sendo: NR, não realizado; NA, tempo de avaliação não atingido

Distribuição dos onze pacientes com leucemia mielóide crônica de acordo com os resultados da pesquisa do gene *BCR-ABL* em células da medula óssea avaliadas ao diagnóstico e após o transplante autólogo de medula óssea

Número	Caso	Diagnóstico	Número de meses									
			3	6	9	12	15	18	24	30	36	42
1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2		+	+	I	+	NR	-	+	I	+	I	+
3		I	+	+	I	+	+	+	NA	NA	NA	NA
4		+	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	NA
5		+	+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	NA
6		+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7		+	I	+	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
8		+	+	I	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9		+	+	+	+	NA						
10		+	+	+	NA							
11		+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Sendo: +, positivo; -, negativo; I, inconclusivo; NR, não realizado; NA, tempo de avaliação não atingido