

A IMPORTÂNCIA DO PCR *EM TEMPO REAL* (qPCR) NO MONITORAMENTO DE DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

RAFAEL TESSARO COELHO¹
ALINE DE OLIVEIRA GOMES²

RESUMO: A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, que acomete pessoas, geralmente, a partir da quarta década de vida, e predomina em homens. É caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia*, que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. A causa dessa leucemia não é hereditária, e, a radiação é um dos fatores desencadeantes, além da idade e do gênero. Para diagnóstico confirmatório tem-se microscopia, análises citogenéticas, citometria de fluxo e a hibridização fluorescente *insitu* (FISH). O tratamento da doença iniciou com o uso do Arsênio, tendo evoluído para os Inibidores de Tirosina Quinase (ITQs). Esse tratamento deve ser monitorado, uma vez que mesmo após remissão, o portador da LMC pode expressar resíduos do gene BCR-ABL ou proteínas BCR-ABL, denominado Doença Residual Mínima (DRM), que significa risco de recidiva. E, para o monitoramento de DRM utiliza-se a técnica molecular de PCR em tempo real (RT-qPCR) por apresentar alta sensibilidade de detecção e boa reprodutibilidade, ultrapassando as técnicas convencionais. Diante disso, o trabalho em questão teve como base uma revisão bibliográfica, qualitativa e exploratória, com o objetivo de avaliar a importância da técnica de RT-qPCR no monitoramento de DRM em LMC, além da importância do profissional biomédico atuando na biologia molecular. Por fim, foi esclarecido os benefícios da técnica molecular, assim como foi possível validar a importância do biomédico atuando com essa técnica.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia Mieloide Crônica; Doença Residual Mínima; PCR em tempo real.

THE IMPORTANCE OF REAL TIME PCR (qPCR) IN MONITORING MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHRONIC LEUKEMIA

ABSTRACT: Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative disease, which generally affects people from the fourth decade of life onwards, and is predominantly male. It is characterized by the presence of the Philadelphia chromosome, which results from a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22, and is responsible for coding a protein that will trigger an exaggerated proliferation. The cause of this leukemia is not hereditary, and radiation is a triggering factor, in addition to risk factors such as age and gender. For confirmatory diagnosis, microscopy, cytogenetic analysis, flow cytometry, and fluorescence *insitu* hybridization (FISH) are used. The treatment of the disease began with the use of Arsenic, and has evolved to Tyrosine Kinase Inhibitors (TIQs). This treatment must be monitored, since even after remission, the CML carrier may express residues of the BCR-ABL gene or BCR-ABL proteins, called Minimal Residual Disease (MRD), which means risk of relapse. To monitor MRD, the real-time PCR (RT-qPCR) molecular technique is used, as it has high detection sensitivity and good reproducibility, surpassing conventional techniques. Therefore, the present study was based on a qualitative and exploratory bibliographic review, with the objective of evaluating the importance of the RT-qPCR technique in monitoring MRD in CML, besides the importance of the biomedical

¹ Professor Mestre em Genética e Melhoramento, Curso de Biomedicina, Centro Universitário Fasipe-UNIFASIFE. Endereço eletrônico: rhafha1981@hotmail.com

² Acadêmico de Graduação, Curso de Biomedicina, Universidade de Sinop – UNIFASIFE. Endereço eletrônico: alineoliveiragomes12@gmail.com

professional acting in molecular biology. Finally, the benefits of the molecular technique were clarified, as well as it was possible to validate the importance of the biomedical professional acting with this technique.

KEYWORDS: Chronic Myeloid Leukemia; Minimal Residual Disease; Real-Time PCR.

INTRODUÇÃO

Leucemia é um câncer que se inicia nas células-tronco da medula óssea (MO), sendo que as células sanguíneas doentes, após se formarem, atrapalham a produção de novas células saudáveis, levando a diminuição do número de células normais. As leucemias podem ser classificadas em: aguda, quando a produção de células imaturas e incapazes de executar suas funções progride de maneira muito rápida; e crônica, quando essa produção é lenta e o paciente possui um número relevante de células maduras (ABRALE, 2021).

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, que, de acordo com Sossela (2017), representa uma porcentagem significativa das leucemias, entre 15 e 20%, e predomina em pacientes homens entre seus 40 a 60 anos. É uma doença resultante de uma transformação em alguma célula-tronco hematopoética, originando o cromossomo *Philadelphia* (Ph) resultando na formação do gene BCR-ABL, responsável por codificar proteínas que levam a produção exacerbada de células da linhagem mieloide (CARVALHO, 2017).

O curso clínico do paciente apresenta três etapas, sendo a fase crônica, a fase acelerada e fase aguda ou fase blástica. A fase crônica corresponde a uma hiperplasia e maturação exagerada de células da linhagem mieloide, com apresentação ou não de alguns sintomas como: cefaleia, febre, sudorese noturna, perda de peso, fadiga e astenia. Já a fase a acelerada, está associada à instabilidade genômica, e é caracterizada pelo aumento de células imaturas (blastos) no sangue periférico e na medula óssea, com presença de leucocitose, basofilia, anemia e até mesmo, trombocitopenia. E por último, a fase blástica, com elevação dos blastos leucêmicos no sangue periférico ou na medula óssea, podendo levar a morte em três meses (DA ANUNCIACÃO *et al*, 2008; SOSSELA, 2017; ABRALE, 2021).

A descoberta da doença geralmente ocorre quando o paciente faz exames de rotina, uma vez que apresentam sintomas inespecíficos ou são assintomáticos, e a confirmação diagnóstica ocorre através de métodos citogenéticos, isso associado às alterações hematológicas, como aumento de glóbulos brancos. Os exames citogenéticos determinam o número e, também a alteração cromossômica, caracterizada pela presença do cromossomo Ph em células medulares. Além desses exames, há também análises por citometria de fluxo, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e técnicas moleculares (LEITE, 2015).

LMC pode ser tratada através de terapias com inibidores de tirosina quinase (ITQ), interferon alfa, quimioterapia e transplante de medula óssea, sendo que em alguns casos há presença de células neoplásicas residuais, que após a remissão e na ausência de sinais e sintomas, permanecem em baixos níveis, não permitindo detecção por meio de morfologia ou de análises citogenéticas, sendo nomeada como Doença Residual Mínima (DRM) (DA ANUNCIACÃO *et al*, 2008; MARTINS, 2018; HESS, 2020).

A DRM apresenta uma possibilidade de recaída, por isso, além da ausência de sintomas são importantes outras análises, como: a resposta hematológica, quando há a diminuição das células sanguíneas e ausência de esplenomegalia; a resposta citogenética, que corresponde a quantidade de metáfases Ph positivas; e a resposta molecular, a qual corresponde a detecção de resíduos do gene BCR-ABL, da transcrição gênica (mRNA) ou de proteínas BCR-ABL residuais (GRANDO, 2008).

Considerando que o aumento de transcritos BCR-ABL pode significar perda da resposta ao tratamento ou mutações, técnicas vêm sendo implementadas para acompanhar pacientes com neoplasias, pois detecta transcritos do gene BCR-ABL, oferecendo informações precisas sobre os

níveis residuais da doença, além de determinar com exatidão a resposta do paciente, podendo assim monitorar a resposta ao tratamento e os riscos de recaídas. Portanto, entre as técnicas moleculares que apresentam grande relevância, destaca-se no trabalho a RT-qPCR, um dos métodos com maior sensibilidade para quantificar os níveis mais baixos da doença (CARVALHO, 2017).

A Biologia Molecular é uma das áreas de atuação da Biomedicina, a qual surgiu da junção da genética, da bioquímica e da biologia celular, visando a compreensão de fenômenos biológicos, além de estudar a replicação, transcrição, tradução e regulação do material genético dos organismos (CRBM, 2021). O biomédico habilitado em biologia molecular pode atuar com técnicas como a Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase e outras técnicas que têm grande influência no diagnóstico de doenças, favorecendo diagnóstico prévio e assim uma terapêutica mais eficiente (SOUSA, 2010; SILVA, 2017).

Diante disto, o objetivo do presente trabalho corresponde a avaliar e comprovar com base em outros estudos, quais os benefícios do uso de técnicas moleculares como a RT-qPCR no monitoramento de doença residual mínima em pacientes tratados e em tratamento em casos de LMC, e como esse monitoramento pode ter influência na sobrevida desses pacientes. Além disso, descreve como o biomédico é um profissional capacitado para atuar na área da Biologia Molecular, lidando com as técnicas e participando dos avanços da área.

O presente trabalho corresponde a uma revisão bibliográfica, qualitativa e exploratória. O desenvolvimento teve como bases de dados a Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scielo, Google acadêmico, Ciência News, CAPES e Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), onde foram selecionados artigos publicados entre os anos 2007 e 2022. Sendo que, as palavras chaves utilizadas foram Leucemia Mieloide Crônica, doença residual mínima e PCR em tempo real. Através dos métodos citados foram selecionados 27 materiais, entre dissertações de mestrado e artigos científicos, sendo que desse total, nove abordavam sobre LMC e hematologia de maneira mais específica, sete relatavam sobre o monitoramento de doença residual mínima, onze sobre técnicas moleculares, desde o diagnóstico ao monitoramento, comparando com outras técnicas; ademais, os artigos e dissertações abordavam a atuação do biomédico, os medicamentos usados no tratamento entre outros dados citados. Os materiais utilizados como referências bibliográficas foram analisados, interpretados, e o resultado foi descrito na Revisão de Literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hematopoese

A formação das células sanguíneas se dá por meio da hematopoiese (hemopoese), processo no qual inclui a origem celular, proliferação, diferenciação e maturação dessas células. As células que compõem o sangue são os eritrócitos (glóbulos vermelhos ou hemácias), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas (trombócitos), as quais apesar de serem delinhagens diferentes, mieloide e linfoide, possuem uma mesma origem, as células pluripotentes ou *stem cell* (SANAR, 2019).

De acordo com Zago (2013), a hematopoese possui como pré-requisito um microambiente normal, com capacidade para sintetizar fatores importantes para as células progenitoras. Além dos precursores hematopoéticos, há as células do estroma, os componentes celulares, e substâncias responsáveis pela modulação das atividades celulares, componentes acelulares, sendo as citocinas, os fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, as quais estruturam e organizam a medula óssea (MO). Portanto, a regulação das células hematopoéticas envolve multifatores, além de sinais mecânicos, físicos e químicos.

2.2 Alterações hematológicas

Quando em condição normal, as células produzidas crescem e dividem-se para dar origem

a novas células de acordo com a necessidade do organismo, isso por meio de hiperplasia, metaplasia e displasia. Dessa forma, quando essas células ficam velhas ou são danificadas, elas morrem por meio da chamada morte programada, a apoptose, e então, células saudáveis ocupam seus espaços e funções. Enquanto os meios de proliferação anteriormente citados correspondem à proliferação controlada, neoplasia é justamente o crescimento desordenado das células. A leucemia, por exemplo, é um tipo de câncer que começa na MO, caracterizado pelo aumento de células imaturas que posteriormente irão para a circulação, denominado câncer do sangue (REZENDE, 2017).

Na LMC, as células progenitoras apresentam alteração no balanço entre diferenciação e auto-renovação, favorecendo uma maturação discordante. Outro fator importante é que, as células hematopoéticas que dependem de citocinas e que expressam BCR-ABL, são resistentes ao processo de apoptose e, também sofrem alterações no processo de aderência ao estroma medular, favorecendo o aumento da circulação e proliferação desregulada de células leucêmicas. Além disso, o clone maligno na LMC é geneticamente instável e, durante a transição da fase crônica para a crise blástica, adquire várias anormalidades genéticas (SILVEIRA, 2011).

2.3 Leucemia Mieloide Crônica

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica, denominada como doença proliferativa do sistema hematopoiético, na qual há proliferação clonal de células-tronco pluripotentes com a presença do cromossomo Ph. A LMC representa cerca de 15 a 20% dos casos de leucemia, ocorrendo um a dois casos a cada 100 mil pessoas, sendo predominante em adultos entre 40 e 60 anos, prevalecendo no sexo masculino. No entanto, pode acometer todas as faixas etárias, com uma porção menor que 10% em pacientes com até 20 anos (SOSSELA, 2017; CONITEC, 2019).

A mieloproliferação contínua é resultante de três mecanismos, sendo manutenção de sinais mitogênicos constantes, alteração na capacidade de adesão das células progenitoras a matriz e às células estromais e, também à resistência a apoptose, sendo que essa alta resistência à morte celular é devido a tirosina quinase BCR-ABL. A fosforilação desta proteína a partir da ligação com o trifosfato de adenosina (ATP) é responsável pela ativação do gene BCR-ABL, sendo ela também responsável por uma cascata de ativação, levando a um crescimento descontrolado (MARTINS, 2018).

Essa leucemia resulta da translocação recíproca dos braços longos entre os cromossomos 9 e 22, dando origem ao cromossomo *Philadelphia (ph)*, marcador da doença; translocação essa na qual o material genético do braço longo do cromossomo 9 é acrescentado no cromossomo 22. Essa alteração permite a junção de um segmento do gene BCR do cromossomo 22, com a região que antecede o segundo éxon do gene ABL do cromossomo 9, originando assim, ao gene quimérico BCR-ABL (Figura 1). Esse gene codifica a tirosina quinase BCR-ABL, responsável por desencadear a proliferação exagerada das células na LMC (DA ANUNCIACÃO *et al*, 2008; SOSSELA, 2017).

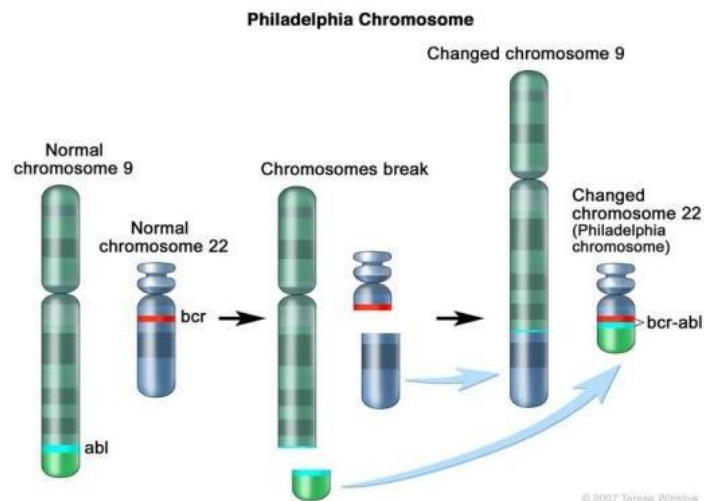


Figura 1. Representação da formação do cromossomo Philadelphia
 Fonte: Rezende (2017)

A doença geralmente é descoberta em exames de rotina, devido a inespecificidade dos sintomas; o diagnóstico confirmatório é realizado por métodos citogenéticos em conjunto com alterações hematológicas. Os exames citogenéticos detectam a translocação clássica t(9;22) e, também anormalidades adicionais que podem ocorrer durante a evolução da LMC (BONAVIGO, 2018). Além desses exames, há também análises por citometria de fluxo, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e técnicas moleculares, como o RT-qPCR, usado no monitoramento de DRM (LEITE, 2015; BONAVIGO, 2018).

Além disso, a LMC não é hereditária, mas ocorre a partir da alteração gênica. E, entre os fatores de risco estão o sexo, a idade, e, com ênfase, a exposição à radiação. Grande parte dos casos da doença, é observada em pacientes que já se submeteram à radioterapia, foram expostos a altas doses de radiação ionizante, tendo como exemplo os sobreviventes de regiões que foram atingidas por bombas atômicas como as lançadas durante a Segunda Guerra Mundial, Hiroshima e Nagasaki (SOSSELA, 2017; ABRALE, 2021).

2.4 RT-PCR e RT-qPCR

Os testes de PCR podem fornecer se há a presença de transcritos de BCR-ABL, quando qualitativo, sendo excelente para diagnóstico; e, também pode avaliar a expressão desse gene, quando quantitativo, sendo nesse caso, ideal para monitorar a Doença Residual Mínima (DRM). Nesse último teste é utilizada a enzima transcriptase reversa para transcrição do DNA complementar por meio de mRNA de BCR-ABL, sendo posteriormente amplificado (CARVALHO, 2017).

Para a realização da técnica utiliza-se o termociclador, responsável pelas alternâncias de temperatura, no qual são inseridos microtubos com reagentes e água ultrapura. Além disso, há elementos essenciais para a amplificação, sendo o DNA; a DNA polimerase (Taq polimerase); os *primers*, que identificam a sequência a ser ampliada; o tampão, responsável por preservar o pH apropriado; o magnésio, o qual dá sustentabilidade para os íons enquanto a Taq polimerase está agindo; e os dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato do DNA), sendo dATP, dCTP, dGTP e dTTP (SILVA, 2017).

O PCR convencional possui três fases, sendo a desnaturação, o anelamento (hibridização) e a extensão (polimerização) (Figura 2). Na desnaturação, há o aquecimento com a temperatura elevada em 94°C – 96°C, ocasionando a separação da dupla hélice do DNA, dando origem a duas cadeias. Em seguida, na fase de anelamento, em temperatura de 50°C a 54°C há a junção do par de *primers* recombinantes às sequências complementares do DNA, os quais indicam os pontos de início e fim da cópia a ser sintetizada. Já na extensão, a Taq DNA-polimerase é acrescentada, com a temperatura elevada de 72°C a 76°C, a enzima faz o reconhecimento dos *primers* que foram

recombinados com o DNA alvo, ligando-se a eles, e a partir de nucleotídeo trifosfatados livres sintetiza a cadeia complementar, isso, no sentido 5' – 3' (OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2017).

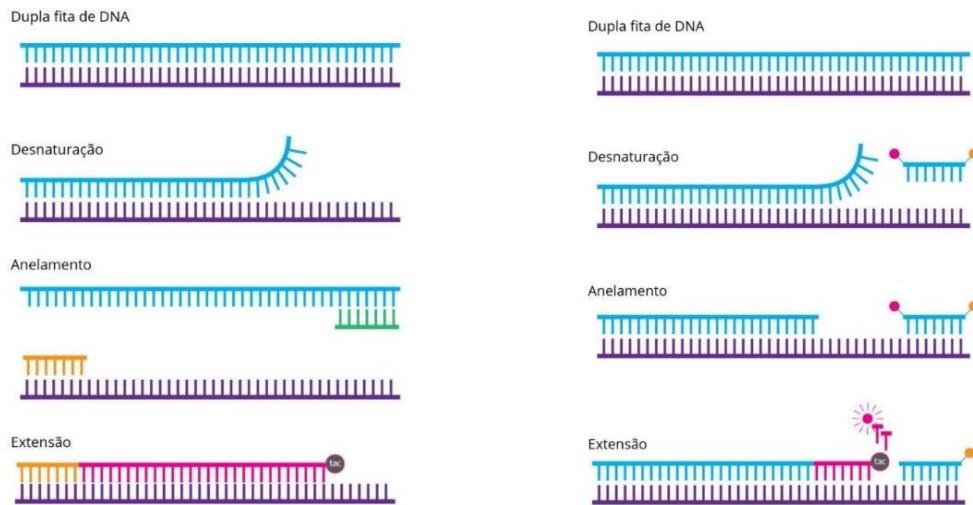


Figura 2. PCR convencional e RT-QPCR, respectivamente
Fonte: Kasvi (2017)

A técnica de RT-qPCR, evoluiu a partir do PCR convencional e suas variantes, possibilitando identificar translocações complexas, as quais não podem ser detectadas pela citogenética convencional. Esse método, permite detectar sinais de amplificação durante e/ou após os ciclos das reações, possibilitando obtenção dos dados quantitativos em um curto período, não necessitando de processos pós-PCR, o que reduz riscos de contaminação dos produtos da PCR e acelera a execução do teste, uma vez que os tubos de reação não precisam ser abertos, devido a detecção e quantificação serem realizadas em tempo real durante os ciclos de amplificação (DA ANUNCIACÃO *et al*, 2008; CARVALHO, 2017; BONAVIDO, 2018).

A análise da técnica baseada no uso de sondas de hidrólise, examina a atividade da exonuclease 5'-3' da *Thermus aquaticus* (Taq), objetivando detectar e quantificar os produtos da PCR conforme o processo da reação. Uma sonda de oligonucleotídeos de corante duplo é associada com um fluorocromo *reporter* na extremidade 5', sendo capaz de emitir fluorescência, e outro fluorocromo *quencher*. Enquanto a sonda estiver intacta, mantendo os dois fluorocromos próximos, a fluorescência do fluorocromo *reporter* vai ser absorvida pelo fluorocromo *quencher*, fazendo com que não haja emissão de fluorescência (Figura 3) (CARVALHO, 2017).

Na fase da hibridização as sondas irão ligar-se à sequência alvo correspondente a elas, sendo que, após a amplificação, a sonda será hidrolisada pela atividade exonuclease 5' – 3' da Taq polimerase, alongando a fita complementar. Isso favorece, durante a extensão, para que haja a separação dos fluorocromos *reporter* e *quencher*, possibilitando a detecção da fluorescência do fluorocromo *reporter* pelo equipamento em tempo real. Essa fluorescência aumenta a cada ciclo consecutivo da PCR, isso devido ao acúmulo progressivo e exponencial de fluorocromos *reporter* livres. Então, a quantidade de ciclos de PCR é proporcional à quantidade de cópias de DNA na reação (CARVALHO, 2017; BONAVIDO, 2018).

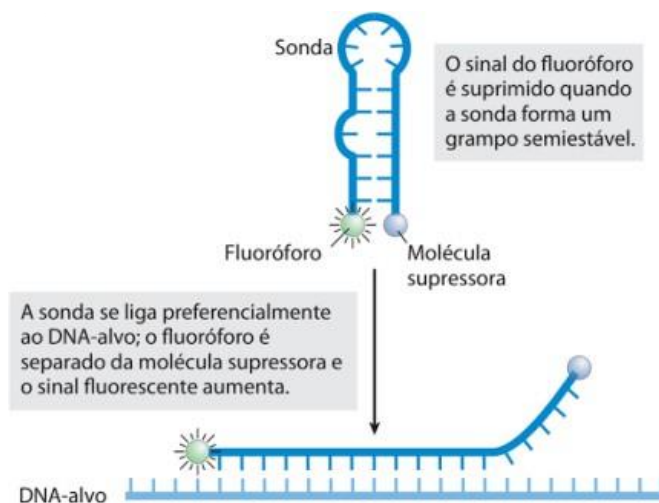


Figura 3. Emissão de Fluorescência
Fonte: Silva (2017)

Para a técnica, o termociclador depende de oscilações de temperatura para concretizar os ciclos da PCR, as quais são obtidas por meio da movimentação de ar aquecido por uma bombade calor, que é controlada em uma câmara técnica. As reações ocorrem nos capilares de vidro de borossilicato, os quais possuem uma superfície elevada, favorecendo o equilíbrio entre os componentes da reação e a temperatura do ar, além de possuir propriedades que são potencializadas para quantificar a fluorescência. Assim, a conclusão de um ciclo de amplificação pode ocorrer em menos de 30 segundos. A luz emitida em comprimentos de ondas diferentes é medida por canais de detecção que compõe a unidade óptica do aparelho, sendo que a fluorescência medida pode ser monitorada através do computador que estiver conectado ao sistema (OLIVEIRA, 2010).

A sensibilidade da técnica, em tempo real, é dependente da integridade do mRNA utilizado, sendo determinada através de experimentos de diluição na amostra do paciente ou algum padrão de referência, que contenha linhagem celular ou plasmídeos com a sequência gênica de interesse. Atrasos na extração ou no transporte (48h) são interferentes, uma vez que pode ocasionar a perda do RNA intacto, além de diminuir significativamente a sensibilidade do método (ALMEIDA, 2007).

2.5 Tratamento

Os primeiros registros de tratamento da LMC são datados por volta de 1865, quando Heinrich Lissauer utilizou o Arsênio, já tendo sido usado por povos antigos, aproximadamente 2000 anos atrás para tratar doenças, seguido pela radioterapia esplênica, sendo que, ambos eram procedimentos paliativos. No entanto, o controle definitivo das células sanguíneas só ocorreu a partir de 1959, quando foi introduzido o bussulfano no tratamento, e então, 10 anos depois, a hidroxiuréia, medicamento bem tolerado, que favoreceu o aumento da sobrevida, ainda que não levasse à resposta citogenética ou impedisse a crise blástica. Até 1986 a doença era considerada fatal, quando foi introduzido o TMO, seguido pelo interferon alfa, e então o imatinibe (1990/2000), com maior vantagem sobre outras drogas (REZENDE, 2017).

2.6 Resposta e Monitoramento

Monitorar a resposta ao tratamento e acompanhar fatores prognósticos são pontos importantes para avaliar o desenvolvimento da terapia de escolha, além de possibilitar identificar possíveis resistências, intolerâncias ou até mesmo progressão para a fase avançada da doença. Independente do ITQ ou método terapêutico utilizado, a resposta deve representar uma taxa

adequada, podendo ser classificada em: ótima, alerta e falha (CARVALHO, 2017).

Nessa classificação, a resposta ótima, corresponde a melhor sobrevida a longo prazo, com uma duração de vida semelhante à da população saudável, não necessitando de mudanças no tratamento. Já a alerta, ou sub-ótima, é quando a condição da doença e a resposta ao tratamento precisa ser acompanhada frequentemente, isso para que seja possível mudanças em casos de falhas. E a classificação falha é quando há necessidade de um tratamento diferente, consequentemente não controle da doença, o que pode ocasionar progressão ou morte (REZENDE, 2017).

A quantificação de transcritos BCR-ABL possibilita acompanhar a evolução do tratamento, sendo que a sensibilidade do monitoramento de DRM é relativa, dependendo da quantidade e qualidade do RNA disponível do paciente, sondas e iniciadores específicos, amplificação e transcrição reversa eficientes, genes controle adequados para padronizar, além da sensibilidade e qualidade do ensaio garantida, com controle internacional e materiais de referência (ALMEIDA, 2007; DA ANUNCIACÃO *et al*, 2008; CARVALHO, 2017).

2.7 Doença Residual Mínima

A ausência de evidência clínica ou hematológica mesmo com presença de células leucêmicas residuais caracteriza doença residual mínima, uma vez que os pacientes depois de tratados podem expressar os transcritos de *BCR-ABL* e ainda permanecer em remissão. Nesses casos, os níveis desses transcritos ficam abaixo na capacidade de detecção dos meios convencionais, como análise citogenética (YAMANAKA, 2014).

Detectar e monitorar DRM tornou-se um tópico prevalente durante o tratamento da LMC, sendo portanto, um meio de analisar a resposta a esse tratamento e diagnosticar precocemente possíveis recidivas, portanto, se faz necessário o monitoramento periódico da resposta do paciente à terapia, podendo modificar dosagens dos medicamentos em uso, adesão de outros agentes quimioterápicos ou mudança na modalidade do tratamento, como por exemplo, para o transplante de medula óssea (TMO) (ALMEIDA, 2007; GRANDO, 2008).

2.8 Avaliação da sobrevida

Conforme citado por Mion (2014), em um estudo, realizado entre outubro de 2002 a outubro de 2010, com 3.169 amostras, portadores de LMC-FC em tratamento com o MI, no intervalo de 3 a 5 meses, cerca de 80,8% dos pacientes tiveram redução de 1 log na quantificação de transcritos BCR-ABL, sendo uma resposta ótima ao tratamento. A análise molecular entre 6 e 11 meses mostrou 89% de pacientes com redução de 1 log na quantificação de BCR-ABL, sendo que esse nível pode ser associado à uma sobrevida livre de eventos ou de progressão da doença. Além disso, o monitoramento entre 12 e 17 meses apresentou 92,3% de casos com redução de 1 log, e 77,7% com redução de 2 logs, valores esses que foram comparados com o estudo IRIS, com resultados muito semelhantes.

De acordo com um estudo de Villa *et al* (2019) com 117 pacientes tratados com ITQ para LMC, com 17 anos de monitoramento, sendo que 5 destes foram tratados com TMO, 11 pacientes vieram ao óbito, representando uma taxa de 9,40%, sendo que dos 11 óbitos, 8 tiveram relação direta com a LMC, representados por sexo, idade e óbito (Quadro 1). Nesse estudo, em 2 anos, a probabilidade de sobrevida global representou 97,2%; já em 5 anos, esse valor correspondeu à 96,2%; e, em 10 anos, foi de 88,9%. Além destes, foram obtidos resultados livres de eventos, sendo que em 24 meses, a sobrevida livre foi de 82,7%; já em 60 meses, representou 65,0% e, em 120 meses, foram 46,2%.

Gênero	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Feminino	49	41,88%
Masculino	68	58,11%
Idade do diagnóstico	Média (anos)	Varição (anos)
Feminino	50,8	10,6 – 82,4
Masculino	46,1	16,8 – 83

Média geral	48,1	10,6 – 83,0
Óbito	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Sim	11	9,40
Não	106	90,6

Quadro 1. Representação quanto ao sexo, a idade do diagnóstico e óbito dos 117 pacientes
Fonte: adaptado de Villa *et al.*, (2019)

Em outro estudo, realizado em Belém - Pará, no hospital Ophir Loyola, com 153 pacientes portadores de LMC, todos foram tratados com Hidroxiuréia e IFN, tendo a medicação alterada para MI após apresentarem transcritos de BCR-ABL durante o monitoramento por meio da RT-qPCR. As definições da resposta ao tratamento foram avaliadas de acordo com as recomendações propostas pela *ELN*. Do total, 58 obtiveram resposta sub-ótima ao MI, enquanto 4 apresentaram intolerância ao tratamento de primeira escolha. Quanto à resposta molecular, 11 pacientes que estavam na fase crônica e 1 na fase acelerada tiveram a redução de 1 log associado à remissão hematológica; já 77% dos pacientes em fase crônica e 90% dos que estavam em fase acelerada não tiveram nenhuma redução logarítmica (PINTO, 2020).

Em um estudo francês, o CBF 2006, com amostras de medula óssea e sangue periférico, usando RT-qPCR para monitorar DRM em Leucemia Mielóide Aguda (LMA) em 94 pacientes, concluiu-se que após o final da consolidação, a avaliação deve ocorrer em sangue periférico a cada 3 meses por dois anos. Sendo que, em caso de DRM positiva e persistente após o tratamento, deve haver monitoramento de perto, isso através de amostra de sangue periférico, com uma segunda amostra, para além da DRM detectada, prever uma possível recidiva hematológica (WILLEKENS *et al.*, 2016).

Conforme resultados apresentados no *Anual Meeting, 2016* pela *American Society of Hematology (ASH)*, a descontinuação de ITQ em um estudo denominado *European Stop ITK Study (EURO-SKI)*, com 755 pacientes que foram acompanhados por 27 meses de estudo, mostrou permanência da ausência de recidiva depois de dois anos. A sobrevida livre de recorrência molecular foi de 61% dos pacientes em 6 meses; e em 18 meses 53%. A interrupção representou, além da sobrevida melhor, em economia, sendo cerca de 22 milhões de euros. Além disso, segundo observações dos dados, é sugestiva resposta molecular profunda com até 12 meses, para só então suspender os ITQs (VILLA *et al.*, 2019).

2.9 O Biomédico e a Biologia Molecular

O profissional biomédico com essa habilitação pode atuar em diversos segmentos da área da saúde, como no diagnóstico de doenças, sendo elas as parasitárias, virais e bacterianas, e, também, na identificação de doenças genéticas e desenvolvimento de fármacos. Isso por meio de investigação das interações bioquímicas das células, como as relacionadas com DNA, RNA e síntese de proteínas. O uso de técnicas moleculares apresenta diversos benefícios a partir do diagnóstico, principalmente quando prévio, minimizando chances de contágio e melhoria na condição de vida de portadores de doenças genéticas (SOUSA, 2010; SILVA, 2017).

Além disso, a Biologia Molecular, no século XX, representou a introdução de uma nova teoria do conhecimento para a pesquisa biomédica e em saúde. Com a sugestão do dogma central da biologia molecular, surgiu então uma nova maneira de compreender a vida biológica, com uma lógica diferente de compreensão da reprodução e crescimento celular. E, o desenvolvimento científico e tecnológico dessa área, além de possibilitar uma compreensão mais específica, teve como resultado publicações de diversos trabalhos acadêmicos na área, sendo que, atualmente, a pesquisa biomédica ainda é responsável pela maioria das publicações científicas em países industrializados, tendo recebido grandes investimentos por parte do setor público e privado (COSTA; SILVA, 2019).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa maneira, a LMC denominada como uma doença mieloproliferativa que, de modo geral, acomete homens acima de 40 anos, apresenta progressão lenta e, quando tratada necessita acompanhamento para obter informações sobre como tem sido a resposta. No entanto, as técnicas com capacidade de detecção mais inferiores, como microscopia, citometria de fluxo, citogenética e hibridização fluorescente *in situ* (FISH), não são capazes de detectar níveis inferiores de transcritos que caracterizam a DRM.

Portanto, com base na revisão bibliográfica realizada, pode-se concluir que a técnica de RT-qPCR tem grande relevância no monitoramento de DRM em pacientes portadores de LMC, por apresentar alta sensibilidade de detecção. Além disso, sua principal vantagem é não necessitar de técnicas pós-PCR para detectar a amplificação do material genético estudado, dando certeza da presença do gene ou do *cluster* alterado de maneira mais rápida e mais econômica para o laboratório, o que viabiliza seu emprego em relação ao seu custo.

Quanto ao profissional biomédico atuando na utilização de técnicas moleculares, sabe-se, que quando habilitado e com especialização na área está apto para a atuação. Não só na parte prática em análises clínicas, como também na pesquisa, uma característica importante deste profissional, que contribui de um modo geral, com a ciência e favorece o aperfeiçoamento de todas as técnicas já existentes.

REFERÊNCIAS

ABRALE. Manual - LMC. **Tudo sobre a Leucemia Mieloide Crônica**. Conteúdo traduzido do manual da Leukemia and Lymphoma Society. Revisado pelo Dr. Nelson Hamerschlag, onco-hematologista do Hospital Israelita Albert Einstein. Abril, 2021.

ALMEIDA, P. SR; SADDI, V. A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 382-386, 2007.

BONAVIGO, A. G. Comparação entre o diagnóstico citogenético e por biologia molecular das leucemias mielóides crônicas (LMC): uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 50, n. 2 supl 2, p. 47, 2018.

CARVALHO, F. R. **Avaliação de ensaios comerciais de RT-qPCR para monitoramento de doença residual mínima em pacientes com leucemia mielóide crônica**. Porto Alegre, 2017.

CONITEC. Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa (RT-PCR) qualitativa e quantitativa (RT-qPCR) e Hibridização *in situ* (ISH) para o diagnóstico e monitoramento da Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e da Leucemia Linfoblástica Aguda cromossoma Philadelphia positivo (LLA Ph+) - **Relatório de recomendação**. Nº 475, nov. 2019.

COSTA, M. C. da; SILVA, R. G. L. da. A dinâmica do conhecimento biomédico e em saúde: uma interpretação sociológica. **Sociologias**, v. 21, p. 18-47, 2019.

DA ANUNCIACÃO, S. F. et al. Aspectos diagnósticos da leucemia mielóide crônica e detecção de doença residual mínima. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 35, n. 6, p. 1069-1083, 2008.

GRANDO, A. C.; WAGNER, S. C. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na

leucemia mielóide crônica por Real-Time PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 433-440, 2008.

GOMES, S. E. **Leucemia Mielóide Crônica: aspecto clínico e diagnóstico laboratorial**. Academia de Ciência e Tecnologia De São José do Rio Preto-SP 11^a Hematologia e Banco de Sangue. 2020.

HESS, V. C. et al. **Padronização do método RT-PCR em tempo real para investigação da fusão PML-RARα da t (15; 17) em pacientes com leucemia promielocítica aguda em tratamento**. 2020.

KASVI. PCR em Tempo Real (qPCR): Aplicação no diagnóstico de doenças. set, 2017. **Disponível em:** <https://kasvi.com.br/pcr-em-tempo-real-qpcr-diagnostico-doencas/>

LEITE, F. P. et al. **Uso da pcr em tempo real para confirmação da doença residual mínima em pacientes curados da leucemia mieloide crônica**. n. 9, p. 4-8, nov. 2015.

MARTINS, P.; DE ANDRADE, R. J. Tratamento da leucemia mieloide crônica com inibidores da tirosino quinase. **Revista Thêma et Scientia**, v. 8, n. 1E, p. 161-171, 2018.

MION, A. L. V. **Tratamento da Leucemia Mieloide Crônica com Mesilato de Imatinibe – Perfil da Resposta Molecular em pacientes brasileiros**. Orientador: Dr. Ricardo Pasquini. Tese (Doutorado em Medicina Interna) – Departamento de Clínica Médica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2014.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 111 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2010.

OLIVEIRA, H. S.; SPENGLER, R. L. Inovações na área de biotecnologia em saúde humana em países em desenvolvimento e sua importância econômica e social: uma reflexão sobre o cenário atual e perspectivas futuras. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, n. 1, 2014.

PINTO, L. C. et al. Análise de mutações do domínio BCR-ABL quinase em pacientes com leucemia mielóide crônica refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe. **Revista Ciências em Saúde**, v. 10, n. 4, p. 77-84, 2020.

REZENDE, V. M. **Monitoramento terapêutico de mesilato de imatinibe: relação entre níveis séricos e alcance de resposta molecular maior na leucemia mielóide crônica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2017.

SANAR. Hematopoiese: saiba tudo sobre hemopoese. 2019. **Disponível em:** <https://www.sanarmed.com/hematopoiese> Acesso em: 03 nov. 2021.

SILVA, M. C. da. Análise de técnicas moleculares e sua importância na biomedicina. 2017.

SILVEIRA, C. A. P. da. **Resposta ao tratamento com mesilato de Imatinibe nos portadores de Leucemia Mielóide Crônica do Hospital de Base do Distrito Federal**. Orientadora: Dra. Íris Ferrari. Tese (Graduação em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, 2011.

SOSSELA, F. R.; ZOPPAS, B. C. A.; WEBER, L. P. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. **RBAC**, v. 49, n. 2, p.

127-30, 2017.

SOUSA, J. A.; PRADO, J. T. C.; FRANCISCHINI, C. W. Funções do biomédico inserido na Biotecnologia. **J Health Sci Inst**, v. 28, n. 3, p. 229-34, 2010.

WILLEKENS, C *et al.* Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leucemia: results of the French CBF-2006 trial. **European Hematology Association**. Vol. 10. nº 3. p. 328-335. Nov. 2016. **Disponível em:** <https://haematologica.org/article/view/7651> Acesso em: 18.05.2022.

YAMANAKA, I. B. **Identificação de ligantes para a proteína correspondente dotranscrito b2z2 do cromossomo philadelphia: perspectivas para diagnóstico e monitoramento de doença residual mínima em leucemias.** Curitiba, 2014.

VILLA, B. *et al.* **Monitoramento da resposta molecular aos inibidores de tirosino-quinase em pacientes com leucemia mieloide crônica.** Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2019.

ZAGO, M. A.; FALÇÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2013. 925p.