



USO DA PCR EM TEMPO REAL PARA CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA EM PACIENTES CURADOS DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.

Fernanda Paini Leite¹, Sara Macente Bonf², Mirian Ueda Yamaguchi³, Fernanda Braghini⁴

RESUMO: A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa que equivale a cerca de 20% das leucemias que ocorrem no mundo. Essa doença se apresenta em três fases evolutivas e é caracterizada pela translocação de genes entre os cromossomos 9 e 22, denominado Philadelphia (Ph), que leva a produção do gene híbrido BCR-ABL. Existem diversos medicamentos para o tratamento da doença, porém a cura só pode ser obtida após o transplante de medula óssea. O monitoramento da doença residual mínima se mostra muito importante no tratamento e prognóstico da doença, podendo impedir casos de recaídas. Através do presente estudo objetiva-se uma revisão da utilização de técnicas moleculares como a PCR em tempo real no auxílio do prognóstico de pacientes já considerados curados da LMC, onde a sensibilidade e a exatidão deste exame permitem a detecção de células Ph positivas e seus produtos, assim como um número mínimo de células tumorais ainda existentes após o fim do tratamento. A pesquisa procedeu-se a seleção dos artigos junto à base de dados: LILACS e Scielo no período de 2000 a 2015.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia mielóide crônica; Citogenética; Real-time PCR; Doença residual mínima.

1 INTRODUÇÃO

Leucemia é o câncer das células brancas do sangue, denominadas leucócitos, alteração essa com início na medula óssea e disseminação para outras partes do corpo. As leucemias se dividem nos dois principais grupos de leucócitos, sendo a Leucemia linfóide a que apresenta comprometimento da linhagem linfóide e a Leucemia mielóide, que apresenta comprometimento da linhagem celular mielóide. As leucemias podem ainda ser divididas patologicamente em aguda, caracterizada pelo crescimento rápido de células imaturas do sangue e crônica, vista pelo aumento de células maduras, mas anormais (DORTA et al., 2011).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença clonal mieloproliferativa que representa cerca de 20% das leucemias do mundo, alcançando o número de 1 a cada 2 casos em 100.000 habitantes anualmente, atingindo principalmente a população masculina. A alteração genética que caracteriza a LMC é a translocação dos genes ABL e BCR localizados nos cromossomos 9 e 12 respectivamente, onde sua transposição leva a formação do gene híbrido BCR-ABL. Esta alteração leva a designação de cromossomo Philadelphia (Ph) que resulta na atividade tirosina-quinase exacerbada sendo assim responsável pelo crescimento celular alterado. O Ph é resultante da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, transpondo o segmento 3' do gene ABL para o segmento 5' do gene BCR. O gene presente no cromossomo 22, denominado BCR, não possui função conhecida, enquanto o gene ABL, presente no cromossomo 9, é um protooncogene. O gene resultante, BCR-ABL, é transcrito em um RNA-mensageiro quimérico e traduzido em proteínas de tamanhos variados, podendo ser p190, p210 ou p230, dependendo da localização dos pontos de quebra dos genes envolvidos. Essas proteínas quiméricas apresentam localização citoplasmática e atividade aumentada de tirosina-quinase, correspondente com os diferentes resultados clínicos (BENDIT, 2010).

A LMC apresenta-se em três fases, a primeira delas é chamada de fase crônica, que dura cerca de cinco anos e é caracterizada por ser uma fase mais branda, onde os sintomas mais comuns são cansaço, sudorese, palidez, perda de peso e desconforto abdominal devido a esplenomegalia, porém apresenta poucos blastos na circulação. Ao evoluir para a fase acelerada, que pode durar até 18 meses, a esplenomegalia se torna mais evidenciada e começa a aumentar o número de células imaturas, além de apresentar certa resistência ao tratamento em relação à fase anterior. Já na terceira fase, a blástica ou aguda, ocorre à infiltração blástica extramedular, sendo uma etapa da doença bastante resistente ao tratamento (HAMERSCHLAK, 2008).

De acordo ainda com Hamerschlak (2008), geralmente a LMC é descoberta durante a realização de exames periódicos devido os sintomas serem inespecíficos ou até mesmo por apresentar-se assintomática. O diagnóstico da doença pode ser confirmado através da citogenética associada às alterações hematológicas como

¹ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. fernanda.leite@unicesumar.edu.br

² Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. sara.macente@unicesumar.edu.br

³ Docente no curso de medicina e do Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. mirianueda@gmail.com

⁴ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. Fernanda.braghini@hotmail.com



altas contagens de glóbulos brancos e outros achados característicos na medula e no sangue. Cabendo ao exame citogenético a determinação do número e a anormalidade cromossômica identificada pela presença do cromossomo Philadelphia nas células da medula, já que este cromossomo está presente em 95% dos pacientes com LMC. Porém os métodos de diagnóstico para esta alteração se mostram bastante amplos, incluindo análise por citometria de fluxo e biologia molecular.

De acordo com a portaria nº 1.219, de 4 de novembro de 2013 do Ministério da Saúde e Secretaria de Atenção a Saúde o diagnóstico de LMC requer a demonstração da presença de pelo menos um dos seguintes itens: cromossomo Philadelphia em exame citogenético; translocação t(9;22)(q34;q11) em leucócitos do sangue periférico ou da medula óssea, através do método convencional ou por método molecular de hibridização in situ - ou produto do rearranjo BCR-ABL no sangue periférico, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). No entanto, nem sempre há associação entre achados da citogenética e expressão molecular do gene fusionado BCRABL1, pelo que a presença de umas das alterações citadas pode ser tomada como evidência de LMC, na presença de quadro clínico laboratorial compatível, que pode incluir as seguintes características, com ou sem sintomas constitucionais.

O tratamento para a LMC compreende entre uso de medicamentos como hidroxiuréia, interferon, mesilato de imatinibe, além da terapia celular através do transplante de células-tronco hematopoiética (TCTH) considerada a única técnica curativa, principalmente quando se trata do grupo de pacientes pediátricos. Nos anos 80, o transplante de medula foi o primeiro tratamento usado em pacientes com LMC na fase crônica e considerado como único tratamento capaz de promover a cura. Muitos pacientes apresentam grande sobrevida após o transplante sem evidência de recaída, sendo então considerados "curados". A taxa de cura chega a 65%, podendo atingir uma sobrevida de 70% em dez anos, podendo variar, dependendo da idade, da compatibilidade com o doador, combinação de sexo, do tempo entre o diagnóstico e o transplante e da fase da doença em que se encontra. Porém apenas cerca de 30% dos pacientes são candidatos a este procedimento, tendo como principal limitante a idade e a indisponibilidade de doador compatível (BENDIT, 2010).

A hidroxiuréia é escolhida quando o paciente se mostra intolerante ao uso de interferon, onde a mesma só age de forma paliativa, pois não promove mudanças citogenéticas como o interferon, mas tem um perfil de alta toxicidade contra as células leucêmicas. O interferon permite remissões citogenéticas parciais ou até mesmo completa, mostrando ausência de células Ph positivas em pacientes com LMC (ALVARENGA, CARVALHO e LUCENAS, 2010).

Segundo ainda os autores Alvarenga, Carvalho e Lucenas (2010), apesar da eficiência, o interferon é um tratamento de grande toxicidade, desta forma ele vem sendo substituído pelo uso de imatinibe. O imatinibe é o medicamento mais atual em uso para o tratamento da doença, onde o mesmo age na inibição seletiva da tirosina-quinase da proteína BCR-ABL. O TCTH é considerado ainda a única cura para a doença, porém existem os riscos do transplante e a dificuldade de compatibilidade com um doador.

O prognóstico da LMC é baseado no possível aparecimento de novos clones das células danificadas, o que determinaria a entrada da doença na fase blástica. Mesmo após tratamento os pacientes devem continuar realizando testes de cariotipagem para avaliar a presença do cromossomo Ph e exames moleculares para a detecção do gene BCR-ABL, podendo assim diagnosticar essas evoluções clonais. Após o término do tratamento existe a possibilidade de um pequeno número de células leucêmicas persistirem, mas sem causarem a evidência clínica da doença, a chamada doença residual mínima (DRM), sendo que estas células podem não ser detectadas pela análise citogenética. Com o uso das técnicas moleculares é possível definir o conceito exato de DRM e evitar equívocos entre pacientes curados e recidivas da doença, podendo também auxiliar no tratamento da LMC. A PCR em tempo real é a técnica mais recente utilizada na biologia molecular, capaz de quantificar DNA e RNA com bastante rapidez, determinando valores durante a fase exponencial da reação, não necessitando da detecção em gel de eletroforese, como na análise da PCR tradicional. A inovação desta técnica vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico clínico, principalmente pela geração de resultados com maior sensibilidade e reprodutibilidade, sendo ainda uma análise bastante rápida e de fácil quantificação, permitindo um melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação (CHUNG, BUXHOFER-AUSCH e RADICH, 2006)

Objetiva-se, portanto com esta revisão demonstrar a PCR em tempo real como estratégia na detecção da LMC mesmo em níveis muito baixos, para que o diagnóstico de recidivas seja mais precoce podendo haver o início do tratamento alternativo de forma mais rápida para obtenção de resultados de cura satisfatórios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido sob os preceitos do estudo exploratório, descritivo, por meio de uma pesquisa bibliográfica constituída de artigos científicos acessados nas bases de dados Scielo e LILACS publicados no período de 2000 a 2015, inclusive os artigos de língua estrangeira. As buscas foram realizadas a partir dos descritores: Leucemia mielóide crônica; Citogenética; Real-time PCR; Doença residual mínima.



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Mesmo após o transplante de medula óssea as chances de recaída das neoplasias hematológicas são grandes. Após o sucesso do tratamento e a caracterização do paciente como curado existe a possibilidade da presença de células tumorais no paciente, porém em uma quantidade bastante reduzida não causando mais sintomas. O limite de detecção clínica de neoplasias gira em torno de 10^9 células, significando que o tumor residual com 10^8 células, não seria detectado com tanta eficiência. Desta forma, é importante o emprego de métodos cada vez mais sensíveis para detecção de um número menor possível de células, sendo capaz a identificação de recaídas precoces, mesmo ainda sem manifestação clínica, para que possa ser instituída uma terapêutica adequada e mais eficiente (SUCH et al., 2011).

A doença residual mínima é determinada como um pequeno número de células leucêmicas, que não podem ser detectadas por morfologia ou análise citogenética. Possuindo valor prognóstico considerável em muitas malignidades hematológicas, incluindo a LMC, já que, atingida a remissão hematológica completa, uma grande proporção de células leucêmicas permanece em níveis abaixo do limite de detecção microscópica. A DRM está envolvida na identificação de pacientes com alto risco de recaída para que seja possível explicar como a leucemia pode recidivar em pacientes tidos como curados. Sendo assim, a detecção da DRM vem sendo adotada como rotina em protocolos de tratamento, usada para guiar a terapia ou para a avaliação de novas modalidades de tratamento. A avaliação de rotina para DRM se limita a análise morfológica da medula óssea, onde aceitasse um limite de no máximo 5% de blastos presentes na medula junto a normalização do sangue periférico. Porém, é válido lembrar que a avaliação hematológica não tem capacidade de prever recaídas, sendo capaz apenas de diagnosticá-las quando ocorre. Outras técnicas mais sensíveis têm sido aplicadas para detecção das translocações ou os produtos do cromossomo Ph. Dentre elas destaca-se a hibridização de fluorescência *in situ* (FISH), *Southern blotting*, reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) qualitativa e reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa - *Real Time* quantitativa (RQ-PCR) (JABBOUR et al, 2008).

A citogenética era a técnica mais aplicada para a identificação de recaídas de leucemias, pois, as alterações citogenéticas estão presentes em até 80% dos casos da doença. Porém em muitos estudos foi constatado o desaparecimento da alteração citogenética após o tratamento e o seu aparecimento com a recaída da neoplasia. As vantagens da aplicação desta técnica é que esta se apresenta capaz de detectar alterações clonais, estruturais e numéricas, onde mesmo um número pequeno de células, é suficiente para determinar um clone neoplásico. Já a desvantagem principal do método para a detecção de DRM, é sua baixa sensibilidade e a necessidade de um preparado citogenético adequado (qualidade das metáfases), o que nem sempre é fácil de obter. Sendo necessário ainda que um grande número de metáfases seja analisada para que se possa afirmar a ausência de células tumorais residuais, ressaltando ainda a necessidade de aspiração de células da medula para a realização de exames citogenéticos tornam o procedimento mais invasivo e doloroso ao paciente (OLAVARRIA et al., 2001)

O uso da citogenética para avaliação do monitoramento de pacientes considerados curados da LMC vem sendo substituído por técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dentre os métodos moleculares ela se mostra como a mais sensível na amplificação do material genético, tanto DNA quanto RNA a partir de coleta de medula óssea ou até mesmo de sangue. Outro exemplo de método não mais utilizado para a detecção de DRM é o *Southern Blotting*, que foi abandonado, por ser uma técnica extremamente trabalhosa, que requer marcação radioativa das sondas, além de apresentar baixa sensibilidade (1 a 5%) (SAFFROY et al, 2000).

Segundo Amabile et al. (2001), a técnica de PCR permite a amplificação de uma região específica do genoma, sendo necessário o conhecimento de pelo menos regiões próximas à região de interesse para que se possam construir os iniciadores da reação de amplificação, denominados *primers*. Mas se a quebra na região a ser analisada estiver localizada em uma região pequena do gene, ela pode ser detectada a partir da amplificação do DNA e se os pontos de quebra estiverem dispersos por uma região grande do DNA, é feita a amplificação do gene já transcrito, denominado RNA, para isso a técnica aplicada é a Reverse transcriptase PCR (RT-PCR).

O PCR pode ainda ser qualitativo, indicando apenas a presença ou ausência de determinada alteração molecular, ou quantitativo, permitindo estimar a concentração de DNA ou o número de sequências transcritas. A quantificação das sequências amplificadas pelo PCR pode ser realizada por PCR competitivo e o *real-time PCR*. Este método tem como princípio estimar a quantidade de produtos do PCR na medida em que eles forem sendo sintetizados, diferentemente do PCR competitivo, que estima a concentração do produto final da amplificação. A desvantagem do *real-time PCR* é que necessita de equipamento próprio para a detecção de fluorescência, sendo este de alto custo, apesar de seus excelentes resultados. Além do mais para a avaliação da DRM é recomendado o uso de métodos quantitativos e não qualitativos, pois, é sabido que a detecção apenas qualitativa de sequências anômalas pelo PCR pode ocorrer após o transplante de medula óssea sem ter relação direta com a recaída (SUCH et al., 2011).

Através desta técnica a leucemia mielóide crônica que apresenta de maneira elevada a expressão do transcrito BCR-ABL, gene quimérico, produto da fusão dos genes BCR e ABL, pode ser detectada, confirmando o diagnóstico da doença mieloproliferativa, e ainda ter seu nível de expressão aferido ao longo da intervenção terapêutica, constituindo desta forma um excelente marcador para avaliar precocemente a resposta da LMC ao



tratamento. O método se baseia na utilização de um sistema fluorescente capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, através do uso de sondas marcadas com corantes. Essas sondas, específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, apresentam uma substância denominada fluoróforo na posição 5' da sonda, capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor (BARBOZA et al., 2000).

Para Radich et al.(2001) a técnica de PCR em tempo real se mostra muito útil quando se trata do diagnóstico de DRM, pois, esta é capaz de medir o número de cópias de mRNA produzido pela proteína específica do gene BCR-ABL, a p-210, mesmo que este valor seja mínimo. Sendo assim a PCR em tempo real vem cada vez mais substituindo a técnica convencional de PCR.

O uso desta técnica permite uma análise muito mais segura e confiável, pois a intensidade de sinal produzida pelas sondas fluorescentes (sondas com sequências específicas marcadas com radiação) é correspondente a quantidade do produto que foi amplificado, sendo assim a cada ciclo os amplicons são detectados através da excitação causada nos fluorocromos marcados pelos primers, fazendo a quantificação do material em tempo real. Além disso, como não há necessidade de esperar um período pós-PCR para que ocorra a amplificação, a exposição ao material radioativo assim como os riscos de contaminação das amostras são reduzidos (FADERL, HOCHHAUS e HUGHES, 2004).

Os dois sistemas de PCR em tempo real mais utilizados são SYBR Green e o TaqMan. O SYBR Green é um método fácil de realizar, onde ele funciona se ligando a menor parte da fita dupla de DNA tornando-a fluorescente, sendo assim a cada ciclo o material obtido se torna maior, realçando ainda mais sua fluorescência. Porém este método pode sofrer interferência de ligações inespecíficas. Já a TaqMan é uma enzima de sequência conhecida que se ligará ao seguimento específico a ser estudado. Conforme os ciclos vão ocorrendo a enzima vai digerindo sondas e sintetizando novos primers produzindo a fluorescência (ALMEIDA e SADDI, 2007).

Nos últimos anos vários estudos compararam a eficácia das técnicas moleculares buscando por métodos mais fáceis, baratos e confiáveis. Saffroy et al. (2000) por exemplo, fizeram associações entre resultados obtidos através de RT-PCR e RQ-PCR para a detecção da translocação BCR-ABL e seus transcritos, onde encontrou concordância de resultados em pelo menos 95% das amostras, e ao comparar os resultados da citogenética aos da RQ-PCR obteve concordância entre 90% das amostras, confirmando assim a aplicabilidade da RQ-PCR na detecção de recidivas da doença.

Um ano depois Schoch et al. (2002) testaram as técnicas de FISH, RT-PCR e RQ-PCR em 350 pacientes em vários estágios de tratamento e obtiveram também a resposta de que a RQ-PCR se mostrava como a técnica mais sensível e que apenas o uso do FISH não permitiria uma avaliação conclusiva de DRM,

Em 2005 um novo estudo com 33 pacientes em remissão da doença avaliou as duas técnicas de PCR onde se obteve que a sensibilidade do método quantitativo em relação ao qualitativo se mostrou bem maior, mais uma vez colocando a RQ-PCR a frente da técnica convencional (GALIMBERTI et al., 2005).

Kaeda et al.(2006) avaliaram 216 amostras confirmadas como negativas pela técnica de RT-PCR, mas que ao serem testadas pela RQ-PCR pelo menos 108 delas foram positivas, portanto a PCR em tempo real ainda se manteve como a técnica de resultado mais confiável.

Neste mesmo ano Hughes et al. (2006) deixaram claro a importância da RQ-PCR no tratamento e acompanhamento da LMC, pois relataram que esta técnica permite avaliar a quantidade dos produtos transcritos pelo gene BCR/ABL e o número preciso de células leucêmicas restantes, desta forma pode-se avaliar a eficácia da terapia.

O uso de técnicas moleculares mais rápidas e menos invasivas estão substituindo aos poucos o método convencional de avaliação do monitoramento de pacientes curados de LMC, a citogenética, e Barbany et al. (2000) em seu estudo com 13 pacientes provaram que é completamente confiável apenas uma análise utilizando a RQ-PCR, pois seus resultados se correlacionaram muito bem com a análise citogenética e com os dados clínicos, mostrando que não há necessidade de expor o paciente a uma coleta tão agressiva.

Em outra análise citogenética realizada em 128 pacientes, em ambas as fases da doença, 3% deles não tiveram a presença do cromossomo Ph detectada apesar de todos os casos da doença serem comprovados através do exame clínico e citológico. Porém com o uso de técnicas moleculares como FISH e PCR foi possível a detecção do gene BCR-ABL em todos eles, mostrando, portanto que as técnicas moleculares podem auxiliar no diagnóstico e tratamento da doença diminuindo casos de falso-negativos e de recaídas de pacientes antes considerados curados da doença (SUCH et al, 2011).

Desde 2000, recomenda-se a realização da RQ-PCR uma vez por mês, durante três meses após o transplante de medula óssea, pois nesta fase os produtos formados pela proteína BCR-ABL ainda serão detectáveis. Cerca de quatro meses depois esses níveis serão quase indetectáveis, sendo assim a avaliação só é necessária a cada 6 meses. Mas se estes níveis mostrarem um aumento significativo o intervalo entre os exames de PCR devem ser menos espaçados. O monitoramento através da PCR em tempo real durante 3 meses pode fornecer dados prognósticos necessários para a tomada de decisão nos pacientes com LMC, reduzindo o número de pacientes submetidos a aspiração de medula óssea (ROSS et al, 2006).

Dois motivos concluídos por Press et al. (2007) pelo qual o monitoramento com PCR é suficiente são de que em 12 meses avaliados nenhum paciente apresenta progressão na doença sem que haja indicação de risco



obtida na técnica de PCR em tempo real e nenhum paciente apresenta progressão citogenética na vigência de resposta molecular.

Um dos problemas encontrados atualmente para a utilização da técnica de PCR em tempo real para controle de DRM é o fato de não haver uma padronização e principalmente uma uniformização dos protocolos. Não havendo, portanto um limiar para determinar se o paciente com leucemia mielóide crônica deve ser submetido a uma terapêutica alternativa. Mesmo ainda não existindo um número aceito de células residuais acima do qual se recomenda o tratamento do paciente pode-se dizer que quando o método quantitativo de PCR é realizado e o paciente que era bcr/abl negativos passa a ser bcr/abl positivos deve receber tratamento, e que pacientes cujo nível de transcrição seja alto são fortes candidatos à recaída da doença (OLAVARRIA et al. 2011).

Desde 2012, o projeto de Diretrizes do Conselho Federal de Medicina elaborado junto a Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, sugere a realização da técnica de PCR como exame de escolha para monitoramento de pacientes com LMC, em fase crônica, em tratamento com Imatinibe. Deixando ainda a análise citogenética como opção fundamental de monitoramento, podendo ser utilizada em associação com o PCR, ou podendo estar reservada aos casos onde não há resposta molecular, ou se esta foi perdida.

4 CONCLUSÃO

Através da quantificação dos transcritos do gene BCR/ABL e seus produtos o acompanhamento da evolução da doença e a avaliação da eficácia do tratamento se tornaram mais acessíveis. Quanto mais prévio for feito o diagnóstico da DRM, ou seja, forem encontrados números mínimos de células tumorais, mais rápido será a busca por um tratamento alternativo, não permitindo, portanto uma recidiva da doença. Além disso, com a vinda de técnicas mais confiáveis a definição de paciente curado se torna mais exato e as chances de liberação de resultados falso-negativos diminuirão.

A RQ-PCR se mostra, dentre as técnicas moleculares, o método de escolha para esta finalidade, pois, esta fornece resultados quantitativos de maneira fidedigna, é sensível e de alta reprodutibilidade, além de ser executado com amostras mínimas e de coleta não invasiva, favorecendo, portanto o bem estar do paciente.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. S. R.; SADDI, V. A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. **Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia**, Goiás, v. 4, n. 29, p.382-386, 2007.
- ALVARENGA, T. F.; CARVALHO, L. O.; LUCENAS, S. B.. Efeitos adversos e resposta citogenética em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com imatinibe. **Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 32, p.116-122, 2010.
- AMABILE, M. et al. Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, Italy, n. 86, p.252-259, 2001.
- BARBANY, G. et al. Manifold-assisted Reverse Transcription-PCR with Real-Time Detection for Measurement of the BCR-ABL Fusion Transcript in Chronic Myeloid Leukemia Patients. **Clinical Chemistry**, Uppsala, n. , p.913-920, 2000.
- BARBOZA, L. P. et al. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 22, p.89-98, 2000.
- BENDIT, I. Efeitos adversos e resposta citogenética em pacientes com leucemia mielóide crônica tratados com imatinibe. **Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia**, São Paulo, v. 2, n. 32, p.98, 2010.
- CHUNG, N.; BUXHOFER-AUSCH, V.; RADICH, J. P.. The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. **Journal Compilation**, Seattle, v. 68, p.371-385, 2006.
- DORTA, M. Q. et al. Resultados citogenéticos en pacientes con leucemia mielóide crónica. **Revista Cubana de Medicina**, La Habana, v. 50, n. 4, p.341-347, 2011.
- FADERL, S ; HOCHHAUS, A. ; HUGHES, T. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematology Oncology Clinic Of North America**, Usa, v. 3, n. 18, p.657-670, 2004.
- GALIMBERTI, S. et al. Quantitative molecular monitoring of BCR-ABL and MDR1 transcripts in patients with chronic myeloid leukemia during Imatinib treatment. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 162, n. 1, p. 57-62, 2005



HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p.52-57, 2008.

HUGHES, T. et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. **Blood Journal**, Washington Dc, n. , p.28-37, 2006.

JABBOUR, E. et al. Targeted therapy in chronic myeloid leukemia. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 8, n. 1, p. 99-110, 2008

KAEDA, J. et al. Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: an attempt to define patients who may not require further therapy. **Blood Journal**, Washington Dc, v. 107, n. 10, p.4171-4176, 2006.

OLAVARRIA, E. et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Blood 97**: 1560-1565, 2001

PRESS, RD, Galderisi C, Yang R, Rempfer C, Willis SG, Mauro MJ, et al. A half-log increase in BCR-ABL RNA predicts a higher risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. **Clin Cancer Res**. 13:6136-43, 2007

RADICH, J. P. et al. The significance of bcr-abl molecular detection in chronic myeloid leukemia patients "late," 18 months or more after transplantation. **Blood Journal**, Seattle, v. 6, n. 98, p.1701-1707, 2001.

ROSS, DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. Limited clinical value of regular boné marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. **Leukemia** ;20:664-70, 2006

SAFFROY, R. et al. Real-time quantitation of bcr-abl transcripts in haematological malignancies. **Eur J Haematol**, França, v. 4, n. 65, p.258-266, 2000.

SCHOCH, C et al. 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. **Nature**, Germany, n. , p.53-59, 2002.

SUCH, E. et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. **Haematologica**, Valencia, n. , p.375-383, 2011.