



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**TARCÍSIO PAULO DE ALMEIDA FILHO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE  
CITOTOXICIDADE NATURAL DE CÉLULAS NK *NKp46* E DO INIBIDOR DE  
*CHECKPOINT* IMUNOLÓGICO *CTLA-4* EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELOIDE CRÔNICA TRATADOS COM DIFERENTES INIBIDORES DE  
TIROSINA QUINASE**

**FORTALEZA**

**2023**

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE CITOTOXICIDADE  
NATURAL DE CÉLULAS NK *NKp46* E DO INIBIDOR DE *CHECKPOINT*  
IMUNOLÓGICO *CTLA-4* EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE  
CRÔNICA TRATADOS COM DIFERENTES INIBIDORES DE TIROSINA  
QUINASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: doenças onco-hematológicas. Linha de pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Santária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A451a Almeida Filho, Tarcisio Paulo de.  
Avaliação da expressão gênica do receptor de citotoxicidade natural de células NK NKp46 e do inibidor de checkpoint imunológico CTLA-4 em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com diferentes inibidores de tirosina quinase / Tarcisio Paulo de Almeida Filho. – 2023.  
98 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes ..
1. Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL Positiva. 2. Inibidores de Checkpoint Imunológico;. 3. Receptores de Células Matadoras Naturais. I. Título.

CDD 615

---

TARCÍSIO PAULO DE ALMEIDA FILHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE CITOTOXICIDADE  
NATURAL DE CÉLULAS NK *NKp46* E DO INIBIDOR DE *CHECKPOINT*  
IMUNOLÓGICO *CTLA-4* EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE  
CRÔNICA TRATADOS COM DIFERENTES INIBIDORES DE TIROSINA  
QUINASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: doenças onco-hematológicas. Linha de pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Santária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catarina Joelma Magalhães Braga  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Dr<sup>a</sup>. Maria do Patrocínio Ferreira Grangeiro Becco  
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela força nos momentos de dificuldades e de dúvida, concedendo-me discernimento para fazer as melhores escolhas.

À minha família, pelo amor e pelo apoio incondicional, encorajando-me nos momentos mais difíceis e não medindo esforços para que eu chegasse nesse momento.

Aos amigos do Laboratório de hematologia por toda a assistência, conhecimento e brincadeiras compartilhadas.

Aos meus amigos farmacêuticos, que sempre estiveram comigo quando eu mais precisei, agradeço a vocês pelos conselhos, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim. Vocês estarão sempre comigo. Obrigado por tudo!

À minha orientadora, Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, por me receber de braços abertos no seu laboratório e pela ajuda na construção deste trabalho.

## RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) se trata de uma doença mieloproliferativa clonal das células tronco hematopoéticas. O tratamento é realizado com os inibidores de tirosina quinase (ITKs), imatinibe, nilotinibe e dasatinibe. Tem sido reportado a influência dos ITKs sobre a função de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e NK em pacientes com LMC, no entanto pouco se sabe a respeito da influência desses inibidores sobre receptores específicos presentes em células NK e célula T. Dada a importância demonstrada do sistema imunológico, sobretudo a importância de células NK e células T, no controle da LMC nos estudos de descontinuação do tratamento, nos propomos a avaliar a expressão do gene *NKp46*, o receptor de células NK mais importante no reconhecimento e lise tumoral, e a expressão do gene *CTLA-4*, o maior regulador negativo das funções de linfócitos T, em pacientes com diferentes graus de resposta ao tratamento com diferentes ITKs e com dados clínicos e laboratoriais. Trata-se de um estudo transversal com 71 pacientes com LMC e um grupo controle (GC) de 25 indivíduos saudáveis. Os dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais foram obtidos dos prontuários médicos e a expressão dos genes foram realizadas por qPCR. Em nosso estudo, a mediana de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 42 anos e do GC foi de 29, observamos uma maior proporção do sexo masculino, 8,4% dos pacientes apresentaram anormalidades citogenéticas adicionais, o transcrito *b3a2* foi o mais frequente. Quanto a influência dos ITKs, os pacientes em uso de nilotinibe apresentaram maior expressão do gene *NKp46* comparado com o GC e com o grupo que utilizava dasatinibe ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$  respectivamente), mas não apresentou diferença estatística com o grupo em uso de imatinibe ( $p > 0,05$ ). Quanto ao gene *CTLA-4*, não houve diferença estatística. Além disso, não foi encontrada correlação entre os genes estudados e tempo de uso de ITKs. Pacientes com alto risco pelo escore EUTOS apresentaram maior expressão do gene *NKp46* quando comparado com pacientes de baixo risco ( $p = 0,0386$ ). Para o gene *CTLA-4*, a comparação entre pacientes com e sem resposta citogenética completa (RCgC) evidenciamos níveis mais elevados de expressão gênica nos pacientes com RCgC. Ademais, um aumento progressivo na expressão do gene *CTLA-4* foi observado em pacientes sem resposta molecular (RM) maior (RMM), com RMM e RM profunda (RMP), no entanto somente a comparação dos pacientes sem RMM e com RMP foi estatisticamente significativa. As demais variáveis sociodemográficas e clínico-laboratoriais (sexo, idade, etilismo, tabagismo, escores de risco Sokal, Hasford e ELTS, tipo de transcrito, cariótipo e contagens de células sanguíneas) não apresentaram

diferença estatística. Nossos resultados também mostram que a  $\geq$ RMM (pacientes com RMM ou RMP) pode exercer alguma contribuição no aumento da expressão do gene *NKp46*, pelo menos para os pacientes em uso de imatinibe e nilotinibe. Para o grupo em uso de imatinibe, a resposta molecular além da RMM parecer não exercer uma contribuição adicional na expressão do gene *NKp46*. Para o gene *CTLA-4*, não evidenciamos diferença estatística no nível de expressão gênica entre os pacientes com  $\geq$ RMM e GC ( $p=0,930$ ), no entanto pacientes sem RMM tiveram níveis estatisticamente inferiores de expressão quando comparados com o GC ( $p=0,0136$ ). Em suma, nossos dados mostram que nilotinibe é melhor em *up* regular a expressão de *NKp46* em paciente com LMC em fase crônica da doença, o que pode representar um efeito benéfico adicional desse medicamento, uma vez que *NKp46* é um importante receptor de citotoxicidade de células NK. Ademais, evidenciamos uma restauração da expressão gênica de *CTLA-4* em pacientes com melhores RMs ao tratamento com ITKs, no entanto nenhum benefício adicional foi notado em pacientes em uso de diferentes ITKs. Juntos, esses resultados mostram esses marcadores podem ser regulados pela  $\geq$ RMM e/ou pelo uso de nilotinibe, o que pode significar um melhor controle da doença.

**Palavras-chave:** Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL Positiva; Inibidores de Checkpoint Imunológico; Receptores de Células Matadoras Naturais.

## ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disease of hematopoietic stem cells. Treatment is with tyrosine kinase inhibitors (ITKs), imatinib, nilotinib, and dasatinib. The influence of ITKs on the function of T CD4+, T CD8+ and NK cells in patients with CML has been reported, however little is known about the influence of these inhibitors on specific receptors present on NK cells and T cells. Given the demonstrated importance of the immune system, especially the importance of NK cells and T cells, in the control of CML in studies of treatment discontinuation, we propose to evaluate the expression of the *NKp46* gene, the most important NK cell receptor in the recognition and lysis and the expression of the *CTLA-4* gene, the major negative regulator of T lymphocyte functions, in patients with different degrees of response to treatment with different ITKs and with clinical and laboratory data. This is a cross-sectional study with 71 patients with CML and a control group (CG) of 25 healthy individuals. Sociodemographic and clinical-laboratory data were obtained from medical records and gene expression was performed by qPCR. In our study, the median age of patients at diagnosis was 42 years and the CG was 29 years, we observed a higher proportion of males, 8.4% of patients had additional cytogenetic abnormalities, the *b3a2* transcript was the most frequent. Regarding the influence of ITKs, patients using nilotinib showed higher expression of the *NKp46* gene compared to the CG and the group using dasatinib ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$  respectively), but there was no statistical difference with the group using imatinib ( $p > 0.05$ ). As for the *CTLA-4* gene, there was no statistical difference between the groups. In addition, no correlation was found between the studied genes and time of use of ITKs. Patients at high risk according to the EUTOS score showed higher expression of the *NKp46* gene when compared to patients at low risk ( $p = 0.0386$ ). For the *CTLA-4* gene, the comparison between patients with and without complete cytogenetic response (CCR) showed higher levels of gene expression in patients with CCR. Furthermore, a progressive increase in *CTLA-4* gene expression was observed in patients without major molecular response (RMM), with MMR and deep MR (DMR), however, only the comparison of patients without MMR and with RMP was statistically significant. The other sociodemographic and clinical-laboratory variables (gender, age, alcoholism, smoking, Sokal, Hasford and ELTS risk scores, type of transcript, karyotype and blood cell counts) did not show statistical difference. Our results also show that  $\geq$ RMM (patients with RMM and RMP) may contribute to the increase in *NKp46* gene expression, at least

for patients using imatinib and nilotinib. For the group using imatinib, the molecular response beyond the MMR seems not to exert an additional contribution to the expression of the *NKp46* gene. For the *CTLA-4* gene, we did not show statistical difference in the level of gene expression between patients with  $\geq$ RMM and GC ( $p=0.930$ ), however patients without RMM had statistically lower levels of expression when compared to the CG ( $p=0.0136$ ). In short, our data show that Nilotinib is better in UP regular NKP46 expression in a chronic LMC patient, which may represent an additional beneficial effect of this medicine, since NKP46 is an important NK cell cytotoxicity receptor. In addition, we show a restoration of CTLA-4 gene expression in Patients with better RMS to ITK treatment, however no additional benefit has been noticed in patients using different ITKs. Together, these results show these markers can be regulated by  $\geq$ RMM and/or the use of nilotinib, which can mean better disease control.

**Keywords:** Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL Positive. Immune Checkpoint Inhibitors. Receptors, Natural Killer Cel.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Translocação recíproca entre os cromossomos 9, 22 na leucemia mieloide crônica e diferentes transcritos produzidos.....	25
Figura 2 – Principais pontos de quebra dos genes <i>ABL</i> e <i>BCR</i> .....	26
Figura 3 – Domínios funcionais da p190, p210 e p230.....	27
Figura 4 – Regulação da atividade tirosina quinase nas proteínas ABL e do BCR-ABL.....	28
Figura 5 – Via de sinalização mediada pelo receptor NKp46.....	46
Figura 6 – Captura, apresentação e reconhecimento de antígenos e diferenciação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	50
Figura 7 – Principais mecanismos inibitórios desencadeados pelas moléculas CTLA-4....	53
Figura 8 – Esquema do protocolo de extração de RNA.....	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Expressão dos genes <i>NKp46</i> e <i>CTLA-4</i> em pacientes com LMC em uso de ITKs.....	66
Gráfico 2 – Expressão do gene <i>CTLA-4</i> em pacientes sem RMM e com diferentes graus de resposta molecular e grupo controle.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição de resposta hematológica.....	36
Tabela 2 – Definição de resposta citogenética de acordo com a citogenética clássica....	36
Tabela 3 – Definição de resposta molecular.....	37
Tabela 4 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 1ª linha.....	38
Tabela 5 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 2ª linha.....	39
Tabela 6 – Distribuição dos pacientes no serviço quanto ao tipo de ITK utilizado e o percentual obtido correspondente a cada grupo analisados no estudo.....	57
Tabela 7 · Dose dos ITKs utilizada no momento da coleta.....	58
Tabela 8 · Lista dos genes que foram avaliados por qPCR.....	62
Tabela 9 – Perfil de resposta molecular alcançada pelos pacientes com diferentes ITKs no momento da coleta.....	65
Tabela 10 – Classificação de risco em diferentes sistemas de classificação.....	65
Tabela 11 – Comparação do tempo de uso em meses de ITKs com a nível de expressão do gene <i>NKp46</i> e <i>CTLA-4</i> .....	67
Tabela 12 – Comparação do nível de expressão do gene <i>NKp46</i> em pacientes com LMC parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais.....	67
Tabela 13 – Comparação do nível de expressão do gene <i>NKp46</i> entre pacientes com LMC em uso de ITKs, com e sem resposta molecular e grupo controle.....	68
Tabela 14 – Comparação do nível de expressão do gene <i>CTLA-4</i> em pacientes com LMC com os parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais.....	70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais sinais e sintomas da leucemia mieloide crônica ao diagnóstico.....	23
Quadro 2 – Definição da fase acelerada e blástica na leucemia mieloide crônica de acordo com as recomendações da <i>European LeukemiaNet</i> .....	25
Quadro 3 – Distribuição dos pacientes de acordo com ITK utilizado.....	57
Quadro 4 – Parâmetros utilizados para o cálculo dos escores de risco na LMC.....	60
Quadro 5 – Distribuição dos pacientes e controles de acordo com as variáveis.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	Abelson Leukemia Virus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ABC	Análise do bandeamento cromossômico
ACC	Anormalidade citogenética clonal
ACM	Anormalidade citogenética maior
Fas	Antígeno de apoptose 1
HLA	Antígeno leucocitário humano
ARG	Arginase
BMO	Biopsia de medula óssea
BCR	Breakpoint Cluster Region
APC	Células apresentadoras de antígenos
pCD	Células dendríticas plasmocitoides
CLI	Células linfóides inatas
Th1	Células T helper 1
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Ceará
Cq	Ciclo de quantificação
CD141	Cluster of Differentiation 141
CD28	Cluster of Differentiation 28
CD3	Cluster of Differentiation 3
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD40	Cluster of Differentiation 40
CD56	Cluster of Differentiation 56
CD56	Cluster of Differentiation 56
CD57	Cluster of Differentiation 57
CD8	Cluster of Differentiation 8
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
CD94	Cluster of Differentiation 94
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
BMX	Cytoplasmic tyrosine-protein kinase BMX

DASISION	DASatinib versus Imatinib Study In Treatment-Naive CML patient
cDNA	DNA complementar
SH2	Domínio 2 de homologia à Src
SH3	Domínio 3 de homologia à Src
PH	Domínio de homologia à pleckstrina
DH	Domínio de homologia Dbl
DLA	Domínio de ligação à actina
DLD	Domínio de ligação ao DNA
CC	Domínio oligomerização coiled-coil
DK	Domínio quinase
S/T quinase	Domínio serina/treonina quinase
SH1	Domínio tirosina quinase
ENESTnd	Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients
SI	Escala internacional
ELN	European LeukemiaNet
EUTOS	European Treatment and Outcome Study
ELTS	EUTOS long-term survival score
NKG2D	Família NKG2 de receptores semelhantes a lectinas do tipo C
FA	Fase acelerada
FB	Fase blástica
FC	Fase crônica ou Região do fragmento cristalizável
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Vav	Fator trocador de nucleotídeo guanina
PIK3	Fosfatidilinositol-3-OH quinase
PCL $\gamma$	Fosfolipase C $\gamma$
FISH	Hibridação de fluorescência in situ
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITAM	Imunorreceptor de ativação baseados em tirosina
ITK	Inibidores de tirosina quinase

INCA	Instituto Nacional do câncer
INF- $\gamma$	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IP3	Inusitol-1,4,5-trifosfato
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor G1
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LPHGDH	Laboratório de pesquisa em hemoglobinopatias e genética das doenças hematológicas
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
NTAL	Ligante de ativação de células não T
CD40L	Ligante de CD40
LAT	Ligante para ativação de célula T
Treg	Linfócitos regulatórios
BCL-2	Linfoma de células B 2
BCL-XL	Linfoma de células B extragrande
FasL	Ligante de Fas
MO	Medula óssea
MS	Ministério da saúde
DNAM-1	Molécula 1 acessória do DNAX
STIM	Multicentre, non-randomized Stop Imatinib study
NK	Natural killer
NTC	No-template controls
NQO2	N-Ribosildiidronicotinamida: quinona reedutase 2
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
Ph	Philadelphina
GRB2	Proteína 2 de ligação ao receptor de fator de crescimento
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
RAC-GAP	Proteína ativadora de GTPase RAC
ULBP	Proteína de ligação ao UL
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio

RAF	Proteína quinase serina/treonina específica
c-KIT	Proteína tirosina quinase
LCK	Proteína tirosina quinase específica de linfócitos
LCK	Proteína tirosina quinase específicas de linfócitos
SFK	Proteínas da família SRC quinase
FYN	Proto-oncogene proteína tirosina quinase
HCK	Proto-oncogene tirosina quinase da Família Src HCK
YES	Proto-oncogene tirosina-proteína quinase YES
PAK	Quinase ativa por Rac
MEK	Quinase ativadora da MAP quinase
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
qPCR	Real Time Quantitativa PCR
NKG2A	Receptor 2A semelhante a lectina do tipo C
KIR2D	Receptor 2D semelhante a imunoglobulina de células NK
FcR $\gamma$	Receptor da porção Fc gama
NCR	Receptor de citotoxicidade natural
DDR1	Receptor de domínio discoidina tirosina quinase 1
IL-2R	Receptor de interleucina 2
2B4	Receptor de ligação a moléculas não relacionadas ao MHC
NKp46	Receptor desencadeador de citotoxicidade natural 1
NKp44	Receptor desencadeador de citotoxicidade natural 2
NKp30	Receptor desencadeador de citotoxicidade natural 3
PDGF-R	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGFR- $\alpha$	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta alfa
PDGFR- $\beta$	Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta beta
KIR	Receptor semelhante a imunoglobulina de células NK
ILT	Receptor semelhante a imunoglobulina de leucócitos
LIR	Receptor semelhante a imunoglobulina de leucócitos
TCR	Receptores de célula T
M-bcr	Região maior do gene BCR
m-bcr	Região menor do gene BCR

$\mu$ -bcr	Região micro do gene BCR
RLT	Remissão livre de tratamento
RCg	Resposta citogenética
RCgA	Resposta citogenética ausente
RCgC	Resposta citogenética completa
RCgm	Resposta citogenética menor
RCgmin	Resposta citogenética mínima
RCgP	Resposta citogenética parcial
RHC	Resposta hematológica completa
RM	Resposta molecular
RMM	Resposta molecular maior
RMP	Resposta molecular profunda
SP	Sangue periférico
FGR	Sarcoma felino viral de Gardner-Rasheed
MICA	Sequência A relacionada ao polipeptídeo MHC de classe I
MICB	Sequência A relacionada ao polipeptídeo MHC de classe I
SIA	Serviço de Informações Ambulatoriais
SEN	Sinal de exportação nuclear
SLN	Sinal de localização nuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
Y177	Sítio de ligação a GRB2
SLLCa	Sítio de ligação lipídica dependente de cálcio
SRP	Sítio rico em prolina para a ligação ao SH3
NKp80	Subfamília F de receptores semelhantes a lectinas de células NK
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
SYK	tirosina quina esplênica
ZAP-70	Tirosina quinase 70 associada a cadeia zeta
BTK	Tirosina quinase de Bruton
BLK	Tirosina quinase de linfócito B
TEC	Tirosina-proteína quinase Tec
Alo-TCTH	Transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas
ATP	Trifosfato de adenosina
TXK	TXK tirosina quinase

UFC

Universidade Federal do Ceará

B2M

B2-microglobulina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1</b>	<b>Leucemia Mieloide Crônica: considerações gerais</b> .....	22
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologia</b> .....	22
<b>1.3</b>	<b>Curso clínico na LMC</b> .....	23
<b>1.4</b>	<b>Aspectos genéticos da LMC</b> .....	25
<b>1.5</b>	<b>Estrutura da proteína BCR-ABL e patogenia</b> .....	27
<b>1.6</b>	<b>Diagnóstico</b> .....	29
<b>1.7</b>	<b>Prognóstico</b> .....	30
<b>1.8</b>	<b>Tratamento da LMC</b> .....	31
<i>1.8.1</i>	<i>Tratamento medicamentoso</i> .....	31
<i>1.8.1.1</i>	<i>Imatinibe</i> .....	31
<i>1.8.1.2</i>	<i>Nilotinibe e Dasatinibe</i> .....	32
<b>1.9</b>	<b>Efeitos adversos aos inibidores de tirosina quinase</b> .....	34
<b>1.10</b>	<b>Monitoramento da doença e critérios de resposta ao tratamento</b> .....	35
<b>1.11</b>	<b>Resistência ao tratamento com inibidores de tirosina quinase</b> .....	39
<b>1.14</b>	<b>Parada do tratamento com inibidores de tirosina quinase</b> .....	41
<b>1.15</b>	<b>Fatores imunológicos associados a RLT</b> .....	42
<b>1.16</b>	<b>Importantes células e moléculas do sistema imunológico</b> .....	44
<i>1.16.1</i>	<i>Células NK</i> .....	44
<i>1.16.2</i>	<i>NKp46</i> .....	45
<i>1.16.3</i>	<i>Interação entre as células T CD4, T CD8, células NK e outras células do sistema imunológico inato</i> .....	47
<i>1.16.4</i>	<i>Importância da molécula CTLA-4</i> .....	51
<b>1.17</b>	<b>Efeitos dos ITKs no sistema imunológicos</b> .....	53
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	56
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	56

2.2	Objetivo Específicos .....	56
3	<b>MATERIAIS E METODOS</b> .....	57
3.1	Casuística .....	57
3.2	Seleção da amostra .....	58
3.3	Local do estudo .....	59
3.4	Coleta de amostras e dados.....	59
3.5	Análises de expressão gênica .....	60
3.5.1	<i>Extração de RNA</i> .....	60
3.5.2	<i>Quantificação do RNA</i> .....	61
3.5.3	<i>Síntese de cDNA</i> .....	61
3.5.4	<i>qPCR (PCR quantitativa em tempo real)</i> .....	62
3.6	Aspectos éticos .....	63
3.7	Análise estatística .....	63
4	<b>RESULTADOS</b> .....	64
4.1	Dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais.....	64
4.2	Expressão dos genes <i>NKp46</i> e <i>CTLA-4</i> em pacientes com LMC em uso de diferentes ITKs e no grupo controle .....	66
4.3	Comparação do nível de expressão dos genes <i>NKp46</i> e <i>CTLA-4</i> em pacientes com LMC com parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais. ....	67
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIA</b> .....	80
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECITO (TCLE)</b> .....	955
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PEDQUISA</b> .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemia Mieloide Crônica: considerações gerais

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) foi descrita pela primeira vez em 1845 quando John Hughes Bennett relatou um "Caso de hipertrofia do baço e do fígado em que a morte decorreu de supuração do sangue" no *Edinburgh Medical Journal* (BENNETT, 1845). Em 1847, Rudolf Virchow relatou um caso semelhante e pela primeira vez utilizou o termo leucemia para descrever esta doença recém-descoberta (VIRCHOW, 1847).

Anos depois, Neumann observou que a doença se originava na medula óssea e a nomeou de leucemia mieloide (NEUMANN, 1878). Em 1960, a descoberta do cromossomo *Philadelphia* (Ph) contribuiu para o melhor entendimento da patogênese da doença (NOWELL, 1960). Treze anos mais tarde, evidenciou-se que o cromossomo Ph era gerado a partir da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973). Na década de 1980, o oncogene fusional *BCR-ABL* foi descrito, sendo este traduzido em uma proteína funcional p210 BCR-ABL cuja atividade tirosina quinase era essencial para a transformação leucêmica (BEN-NERIAH *et al.*, 1986; HEISTERKAMP *et al.*, 1983).

Hoje sabemos que a LMC se trata de uma doença mieloproliferativa clonal das células tronco hematopoiéticas, caracterizada por um curso evolutivo bifásico ou trifásico. Os pacientes são geralmente diagnosticados na fase crônica (FC), mas podem progredir para uma fase mais avançada, denominada de fase blástica (FB) que algumas vezes é precedida por uma fase intermediária conhecida como fase acelerada (FA) (MELO; BARNES, 2007; ROWLEY, 1973). Além disso, sabemos também que com a utilização dos inibidores de tirosina quinase (ITKs), a classe de medicamento atualmente utilizada no tratamento de pacientes com LMC, houve uma mudança significativa no prognóstico da doença, a qual passou de uma doença fatal para uma doença controlável, tornando a expectativa de vida dos pacientes com LMC semelhante à da população em geral (BOWER *et al.*, 2016; HEHLMANN *et al.*, 2017; HOCHHAUS *et al.*, 2017; HOCHHAUS *et al.*, 2020; SAUSSELE *et al.*, 2016; SASAKI *et al.*, 2015; THIELEN *et al.*, 2016; WELCH, KRAMER, BLACK, 2019).

### 1.2 Epidemiologia

A LMC ocorre com uma incidência anual de 1,0 a 2,0 casos para cada 100 mil habitantes/ano, acometendo principalmente adultos, entre 55 a 60 anos. No Brasil, em 2019, foram registrados 127.137 procedimentos de quimioterapia de LMC do adulto, no

Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS - SIA-SUS, apontando para uma prevalência anual de cerca de 15.892 casos desta doença. Além disso, o Instituto Nacional de Câncer – INCA/MS estimou que, por anos, para 2020-2022, 10.810 novos casos de leucemias, os quais baseados em dados históricos anuais no SUS, a LMC deve representar 10%. Dados sobre a população brasileiras indicam que a mediana de idade na apresentação da doença é, no mínimo, dez anos mais baixa que a encontrada na literatura internacional, com mediana de idade ao diagnóstico entre 40 e 46 anos (BORTO-LHEIRO; CHIATTONE, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

### 1.3 Curso clínico na LMC

A FC na LMC depende da ausência de fatores agressivos da doença. Noventa por cento dos pacientes são diagnosticados nesta fase. Na maioria das vezes, se apresenta de forma assintomática. Quando sintomáticos, os pacientes apresentam fadiga, anorexia, perda de peso, sudorese e febrícula e, ao exame clínico, apresentam palidez e hepatoesplenomegalia (QUADRO 1). A esplenomegalia está presente em 80% dos casos e, dependendo do volume, pode causar desconforto abdominal e efeitos compressivos, ocasionando plenitude pós-prandial. A hepatomegalia também pode estar presente. Em alguns casos os pacientes apresentam um aumento expressivo nas contagens de leucócitos, causando manifestações características da hiperviscosidade como dispnéia, sonolência, zumbido, priapismo e alterações visuais. Se não tratada, esta fase tem uma duração média de 3 – 5 anos antes de evoluir para fases mais agressivas da doença (CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; GOLDMAN, 1997; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014; KANTARJIAN *et al.*, 1993; LICHTMAN; ROWE, 1982; SAVAGE; SZYDLO; SPIERS, 1977).

Quadro 1 – Principais sinais e sintomas da leucemia mieloide crônica ao diagnóstico.

<b>Mais frequentes</b>	<b>Menos frequentes</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fadiga;</li> <li>• Sudorese noturna;</li> <li>• Perda de peso e mal-estar;</li> <li>• Saciedade, desconforto e dor no quadrante superior esquerdo;</li> <li>• Esplenomegalia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Priapismo;</li> <li>• Hemorragias da retina;</li> <li>• Trombose e/ou hemorragia;</li> <li>• Hepatomegalia;</li> <li>• Dor óssea*; linfadenopatia*; infiltração da pele;*; massa extramedular (cloroma)*.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Apperley (2015). Legenda | (\*) Deve levantar suspeitas de apresentação com doença em fase avançada.

O sangue periférico (SP) dos pacientes nesta fase é caracterizado por uma leucocitose que comumente encontra-se acima de  $100 \times 10^9/L$ . Na contagem diferencial, encontram-se todos os estágios de maturação dos granulócitos com predomínio de mielócitos, metamielócitos e outras formas maduras. Os mieloblastos e promielócitos também estão presentes, porém a soma desses dois estágios de maturação representa menos de 30% das células do SP, sendo os mieloblastos encontrados em quantidade inferior a 15%. A basofilia é um achado comum e a eosinofilia pode estar presente. A anemia comumente é discreta e a contagem de plaquetas pode estar normal ou aumentada. A medula óssea (MO) desses pacientes apresenta-se com intensa hiperplasia granulocítica. O número de blasto é inferior a 15%, a soma de blastos e promielócitos representam menos de 30% das células da MO. A biopsia da medula óssea (BMO) pode ser útil na detecção de fibrose. A fosfatase alcalina leucocitária é baixa na maioria dos pacientes nesta fase e as concentrações séricas de desidrogenase láctica e ácido úrico estão elevadas (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; DEKMEZIAN *et al.*, 1987; ROSNER; SCHREIBER; PARISE, 1972).

Com a progressão da doença, os pacientes com LMC evoluem para a FB que pode ser precedida da FA que tem duração de alguns meses e é caracterizada por uma resistência à terapia, aumento da esplenomegalia, da basofilia e do número de células blásticas, trombocitose ou trombocitopenia, mielofibrose e evolução clonal citogenética. Nesta fase, os pacientes podem estar assintomáticos ou, mais frequentemente, sintomáticos, apresentando febre e dores ósseas (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; KANTARJIAN *et al.*, 1988; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996).

A FB é caracterizada pela presença de mais de 30% de células blásticas na MO ou SP. Estas células imaturas podem ser mieloblastos em 50% dos casos, linfoblastos em 25% e no restante são células indiferenciadas ou bifenotípicas. Na FB é comum a presença de pacientes sintomáticos apresentando febre, sudorese noturna, anorexia, perda de peso e dores ósseas (QUADRO 2). Há um aumento da esplenomegalia e pode ocorrer infiltração extramedular, principalmente nos linfonodos, pele, ossos e sistema nervoso central (BACCARANI *et al.*, 2013; CORTES; TALPAZ; KANTARJIAN, 1996; DERDERIAN *et al.*, 1993; JACKNOW *et al.*, 1985; TERJANIAN *et al.*, 1987).

Quadro 2 – Definição da fase acelerada e blástica na leucemia mieloide crônica de acordo com as recomendações da *European LeukemiaNet*

### Fase acelerada

Número de blastos no SP ou na MO 15-29%, ou blastos mais promielócitos no SP ou na MO >30%, com blastos <30%;

Basófilos no sangue  $\geq 20\%$ ;

Trombocitopenia persistente ( $<100 \times 10^9/L$ ) não relacionada com a terapia;

Anormalidades cromossômicas clonais em células Ph+ (CCA/Ph+) sob o tratamento.

### Fase blástica

Blastos no SP ou na MO  $\geq 30\%$ ;

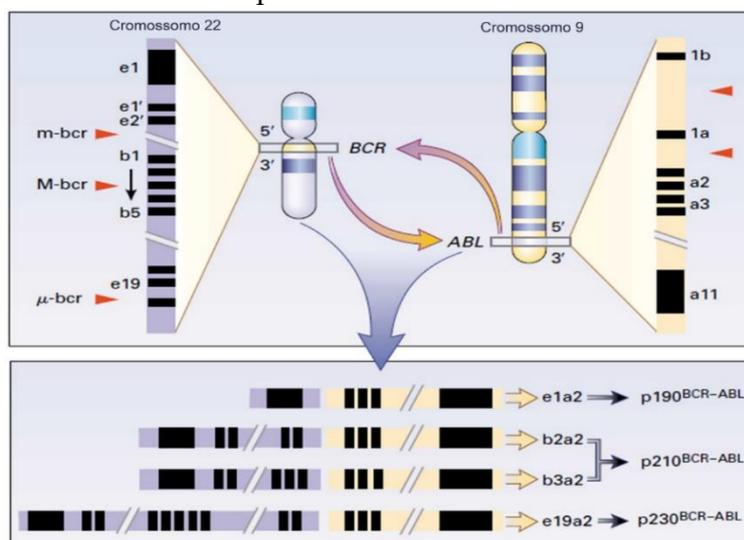
Proliferação extramedular de blastos, exceto no baço.

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013). Legenda | Medula Óssea (MO); Sangue periférico (SP). Nota | A fase crônica é definida pela ausência dos critérios citados a cima.

## 1.4 Aspectos genéticos da LMC

A translocação recíproca e balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 nas células progenitoras hematopoéticas é o evento genético marcante da LMC. Esta translocação resulta na fusão dos genes *ABL* (Abelson Leukemia Virus), presente no cromossomo 9q34, e *BCR* (Breakpoint Cluster Region), presente no cromossomo 22q11, formando, assim, dois novos genes, o *BCR-ABL* no cromossomo 22q-, o denominado cromossomo Ph, e o *ABL-BCR* no cromossomo 9q+ (FIGURA 1).

Figura 1 – Translocação recíproca entre os cromossomos 9, 22 na leucemia mieloide crônica e diferentes transcritos produzidos.

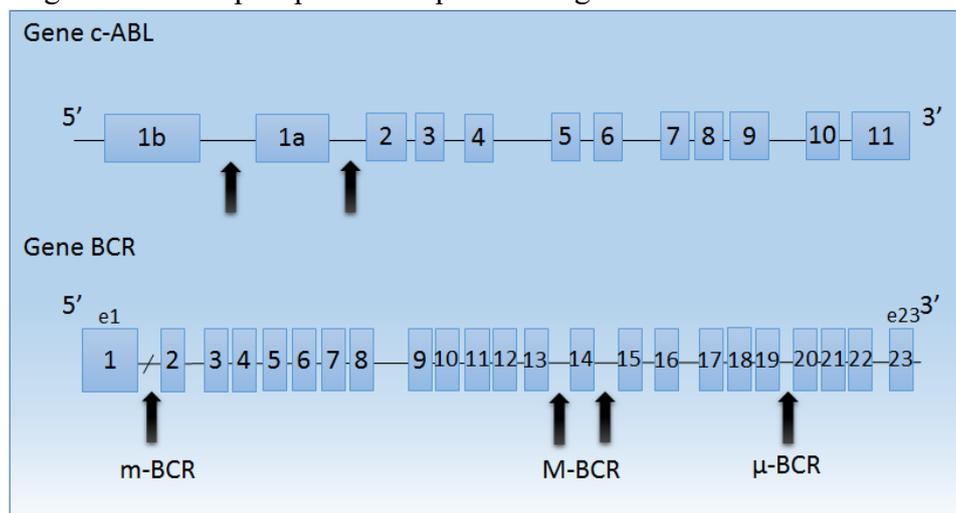


Fonte: Adaptado de Epstein (1999). Legenda: Região menor do gene *BCR* (*m-bcr*); Região maior do gene *BCR* (*M-bcr*); Região micro do gene *BCR* ( $\mu$ -*bcr*); Abelson Leukemia virus (*ABL*); Breakpoint Cluster Region (*BCR*).

Este novo gene híbrido e anormal (*BCR-ABL*) produz uma proteína desregulada e constitutivamente ativada com elevada atividade tirosina quinase que é necessária e suficiente para causar a transformação maligna na célula (CORTES *et al.*, 1996; DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE, 1990; KONOPKA; WATANABE; WITTE, 1984; LUGO *et al.*, 1990; MCLAUGHLIN; CHIANESE; WITTE, 1987; NOWELL, 1960; ROWLEY, 1973).

O gene híbrido predominante na LMC resulta da cisão do gene BCR na localização denominada região maior (M-bcr) com a fusão do gene ABL no nível do éxon 2 (a2). A quebra do gene *BCR* na região maior pode, ainda, ocorrer depois do éxon 13 (e13 ou b2) ou depois do éxon 14 (e14 ou b3) gerando, assim, o gene *BCR-ABL* que quando transcrito pode formar moléculas de mRNA *b2a2* ou *b3a2*, ambos originando uma proteína quimérica de 210 kDa denominada como p210 que está presente na maioria dos pacientes com LMC (FIGURA 2). Cerca de 5-10% dos pacientes podem, ainda, apresentar eventos de *splicing* alternativo o que permite a expressão simultânea dos transcritos *b2a2* e *b3a2* (EPSTEIN *et al.*, 1999; EPSTEIN *et al.*, 1988; HOLYOAKE, 2001; MELO, 1996a).

Figura 2 – Principais pontos de quebra dos genes *ABL* e *BCR*.



Fonte: Adaptado de Holyoake (2001). Legenda: Região menor do gene *BCR* (m-bcr); Região maior do gene *BCR* (M-bcr); Região micro do gene *BCR* ( $\mu$ -bcr); *Abelson Leukemia virus* (*ABL*); *Breakpoint Cluster Region* (*BCR*).

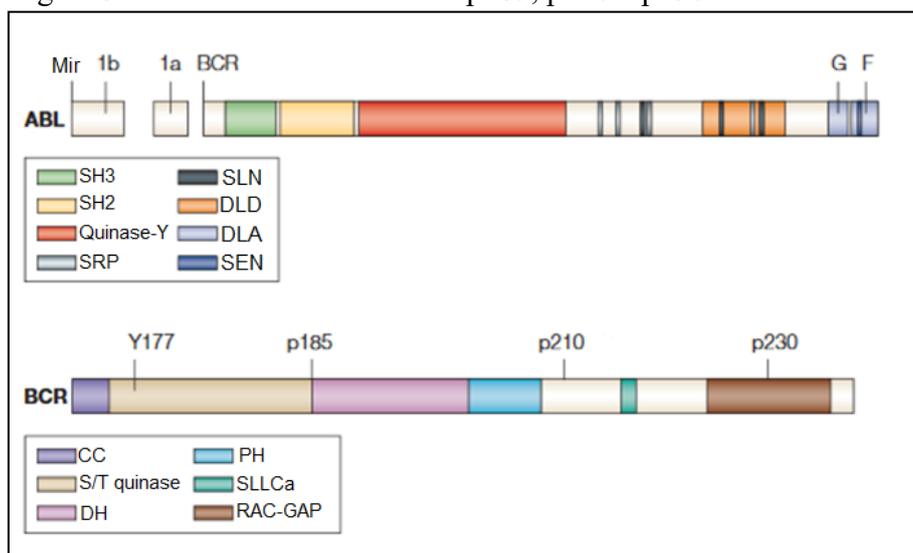
Com menor frequência, a quebra do gene *BCR* pode ocorrer em outras duas posições, conhecidas como região menor (m-bcr) e região micro ( $\mu$ -bcr). Dependendo da região envolvida, o produto do rearranjo genético obtido a partir da fusão do gene *BCR* com gene *ABL* no nível do éxon a2 pode originar uma proteína de fusão de 190 kDa

(p190) ou 230 kDa (p230). A primeira resulta da cisão do gene *BCR* no nível do éxon e1 e fusão com o gene *ABL* no nível do éxon a2, gerando um transcrito *e1a2* que está associado à leucemia linfóide aguda (LLA Ph+) que, também, pode estar presente nos pacientes com LMC de forma predominante ou coexpressa em baixos níveis com a p210. A segunda é originada a partir da cisão do gene *BCR* correspondente ao éxon e19 com a fusão do segmento a2 do gene *ABL* formando o transcrito *e19a2* que está associado a leucemia neutrofílica crônica Ph+ (BENNOUR *et al.*, 2012; ELLIOTT *et al.*, 2005; FADERL; JEHA; KANTARJIAN, 2003; LUGO *et al.*, 1990; MCLAUGHLIN; CHIANESE; WITTE, 1989; PANE *et al.*, 1996). Com frequência ainda menor, outros transcritos variantes na LMC podem ser encontrados, tais como: os transcritos *e14a3* (*b3a3*), *e13a3* (*b2a3*) e o *e8a2*, no entanto são pouco conhecidos (HUET *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2003; XIAOMIN *et al.*, 2015).

### 1.5 Estrutura da proteína BCR-ABL e patogenicidade

Na translocação, partes dos genes *ABL* e *BCR* são ligados para formar um novo gene, que é transcrito em moléculas de mRNA e este traduzido, na maioria dos casos de LMC, em uma proteína p210 cujo ponto de fusão e domínios funcionais são melhor visualizados na Figura 3 (EPSTEIN *et al.*, 1988; REN, 2005).

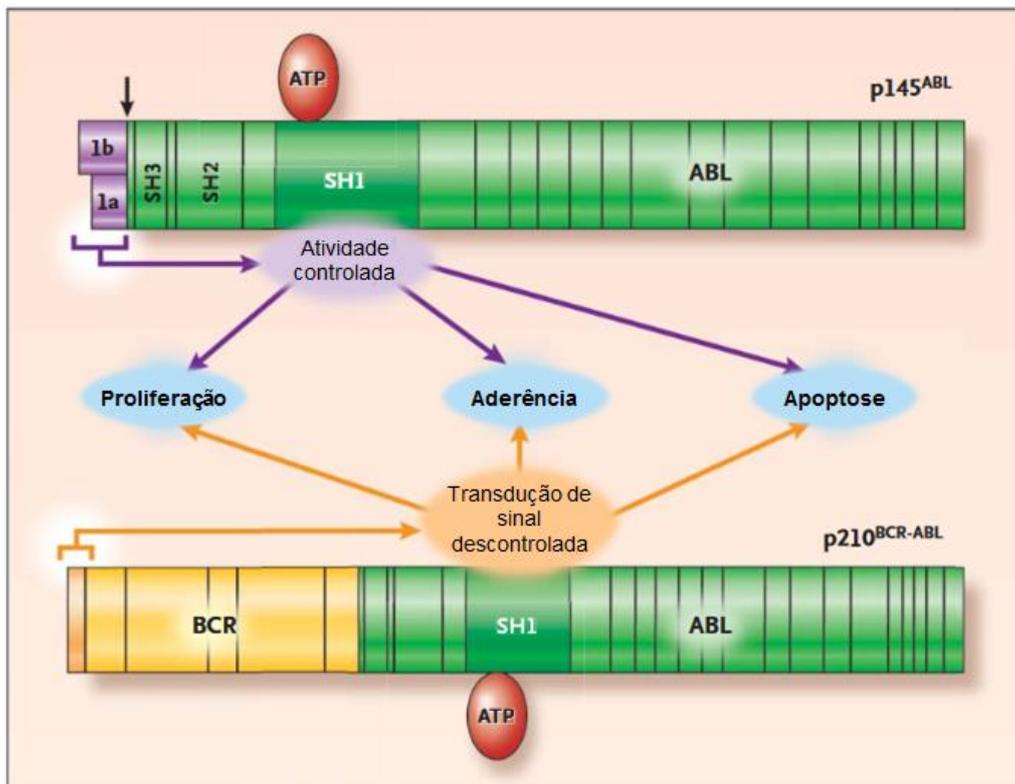
Figura 3 – Domínios funcionais da p185, p210 e p230.



Fonte: Adaptado de Ren (2005). Legenda | Porção ABL: SH3 (Domínio 3 de homologia à Src), SH2 (Domínio 2 de homologia à Src), Quinase-Y (Domínio quinase), SRP (Sítio rico em prolina para a ligação ao SH3), SLN (Sinal de localização nuclear), SEN (Sinal de exportação nuclear), DLD (Domínio de ligação ao DNA), DLA (Domínio de ligação à actina). Porção BCR: CC (Domínio oligomerização coiled-coil), S/T quinase (Domínio serina/treonina quinase), DH (Domínio de homologia Dbl), PH (Domínio de homologia à pleckstrina), SLLCa (Sítio de ligação lipídica dependente de cálcio), RAC-GAP (Proteína ativadora de GTPase RAC), Y177 (Sítio de ligação a GRB2).

Os diversos domínios funcionais do ABL e do BCR na p210 podem contribuir para o fenótipo leucêmico observado na LMC e um dos mais importantes é o domínio tirosina quinase (SH1) na porção ABL, que tem um papel crucial na fosforilação de alvos proteicos. Este domínio é normalmente regulado na proteína ABL provavelmente pela ligação intramolecular com a região cap na extremidade N-terminal que é cercada pelo éxon 1 (1a ou 1b) e éxon a2, no entanto a perda da região cap do ABL e a presença do domínio de oligomerização (CC) do BCR após a translocação é responsável pela ativação constitutiva do domínio SH1. Desta forma, a atividade tirosina quinase descontrolada do BCR-ABL usurpa as funções fisiológicas da proteína ABL normal, interagindo com vários efetores proteicos e resultando na proliferação celular desregulada, redução da adesão das células leucêmicas ao estroma medular e redução da resposta apoptótica a estímulos mutagênicos (FIGURA 4). Assim, a atividade tirosina quinase (SH1) da porção ABL do BCR-ABL é, incontestavelmente, a mais importante para a transformação oncogênica (GOLDMAN; MELO, 2003; HOLYOAKE, 2001; REN, 2005).

Figura 4 – Regulação da atividade tirosina quinase nas proteínas ABL e BCR-ABL.



Fonte: Adaptado de Goldman; Melo (2003). Legenda | Adenosina trifosfato (ATP); Domínio de homologia SRC 1,2 e 3 (SH1, SH2, SH3); *Abelson Leukemia virus* (ABL); *Breakpoint Cluster Region* (BCR).

Além do domínio SH1, o BCR-ABL conta com outros domínios importantes na transformação celular, tais como: o domínio SH2 que pode se ligar à fosfotirosinas e mediar interações com outras proteínas Src-quinases, o domínio de ligação à actina que é importante na interação com outras proteínas, o domínio coiled-coil (CC) que é importante na oligomerização e, portanto, no processo de autofosforilação da oncoproteína, a tirosina 177 (Y177) que é crucial para a ligação com a proteína 2 de ligação ao receptor de fator de crescimento (GRB2) e o domínio serina/treonina quinase (S/T quinase) que é importante para interação com proteínas que contenham domínio SH2, incluindo o próprio c-ABL (DEININGER; DRUKER, 2003; DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; GOLDMAN; MELO, 2003; HANTSCHHEL; SUPERTIFURGA, 2004).

## 1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da LMC pode ser feito através da citogenética convencional, da técnica de hibridação de fluorescência *in situ* (FISH) ou ainda através de uma reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

A análise do bandeamento cromossômico (ABC) pela citogenética convencional é o padrão ouro para a detecção do cromossomo Ph e para a avaliação da resposta citogenética (RCg), no entanto, apresenta como desvantagem uma baixa sensibilidade e a necessidade de aspiração da medula óssea para a obtenção de células em metáfase. Além disso, a citogenética convencional é importante na detecção de anormalidade citogenéticas adicionais especialmente nos casos de evolução clonal dos clones Ph<sup>+</sup> ou Ph<sup>-</sup> durante a terapia, o qual podem, em raros casos, progredirem para síndrome mielodisplásica ou leucemia mielóide aguda. De acordo com as recomendações da European LeukemiaNet (ELN), a ABC deve ser realizada em pelo menos 20 células em metáfases da medula óssea (BACCARANI *et al.*, 2013; BENNOUR; SAAD; SENNANA, 2016).

Como mencionado acima, o FISH também pode ser utilizado no diagnóstico de pacientes com LMC principalmente quando a citogenética convencional não gerar resultados conclusivos ou quando as células em metáfase não podem ser obtidas. De acordo com as recomendações da ELN a análise dos núcleos das células em interfase do sangue periférico pela técnica de FISH pode substituir a ABC no monitoramento da doença quando o paciente alcança uma resposta citogenética completa (RCgC) sendo esta

definida com <1% de núcleos BCR-ABL+ com a análise de pelo menos 200 núcleos (BACCARANI *et al.*, 2013; BENNOUR *et al.*, 2016).

Outra alternativa disponível para o diagnóstico da LMC é o RT-PCR qualitativo, na qual se avalia a presença do transcrito do gene *BCR-ABL*. O RT-PCR também pode ser quantitativo podendo ser utilizado para a identificação de doença residual mínima após transplante de medula óssea e para o monitoramento da doença durante tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013; DE LOCHT; VAN KESSEL; WITTE, 1998; JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

### 1.7 Prognóstico

O prognóstico dos pacientes pode variar de acordo com as fases evolutivas da doença. Um fator de prognóstico conhecido para os pacientes com LMC é a presença de anormalidade citogenética clonal (ACC)/Ph+. Estas anormalidades conferem um prognóstico adverso particularmente nos pacientes com anormalidade citogenética maior (ACM) que incluem a trissomia do cromossomo 8, Ph, 19, o isocromossomo 17 e a *ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11)* (BACCARANI *et al.*, 2013). Estudos recentes também têm mostrado o impacto dos transcritos na resposta ao tratamento com ITKs, evidenciando que o transcrito *b3a2* está associado à melhores alcances de resposta molecular maior (RMM), resposta molecular profunda (RMP) e na remissão livre de tratamento (RLT) (CHEN *et al.*, 2022; MOLICA, ABRUZZESE, BRECCIA, 2020).

Há índices medidos ao diagnóstico que visam individualizar grupos de risco baixo, intermediário e alto. Os índices mais utilizados são o escore proposto por Sokal *et al.* (1984) em pacientes que usavam hidroxiuréia ou bussulfan, e o proposto por Hasford *et al.* (1998) em paciente que usavam interferon. Apesar de serem proposto nos pacientes tratados com a quimioterapia convencional ou com interferon, esses escores podem, também, ser utilizados para estratificar e prever os desfechos dos pacientes tratados com inibidores de tirosina quinase (ITKs) (DE LAVALLADE, 2008; DRUKER *et al.*, 2006). Recentemente, o escore EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*) foi proposto em pacientes que usavam o imatinibe, o primeiro ITK. Esse sistema de escore surgiu a partir dos dados de 2060 pacientes tratados com imatinibe e foi desenvolvido pela ELN. O escore é capaz de prever a probabilidade de o paciente alcançar remissão citogenética completa em 18 meses, a qual é o principal marcador de sobrevida nos pacientes com LMC (BACCARANI *et al.*, 2009; HASFORD *et al.*, 2011). Até o momento, não há

evidência de que qualquer um dos três escores de risco seja superior ou mais conveniente (BACCARANI *et al.*, 2009, 2013; HASFORD *et al.*, 1998; SOKAL *et al.*, 1984).

Um estudo avaliou a sobrevida dos pacientes com LMC em tratamento com imatinibe, tendo como causa da morte a própria doença. A morte devido à LMC foi definida pelo óbito após a progressão da doença. Neste estudo, a idade aumentada, o aumento do baço, o aumento da contagem de blastos e a contagem de plaquetas diminuída foram associados significativamente com aumento da probabilidade de óbito por LMC, sendo estes parâmetros utilizados na elaboração de um novo escore de sobrevida a longo prazo, ELTS (EUTOS *long-term survival score*) (PFIRRMANN *et al.*, 2016).

## **1.8 Tratamento da LMC**

O tratamento dos pacientes diagnosticados com LMC é realizado com os ITKs (imatinibe, nilotinibe e dasatinibe), podendo ser precedido pela hidroxiuréia que é utilizada por um curto período de tempo em pacientes com leucocitose e plaquetose sem confirmação diagnóstica (HOCHHAUS *et al.*, 2020). Como única opção curativa da LMC, o alo-TCTH (transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas) representa uma opção atrativa para pacientes com doença resistente, pacientes intolerantes ao tratamento medicamentoso, pacientes com recuperação medular inadequada e pacientes em FA ou FB (HOCHHAUS *et al.*, 2020; LÜBKING *et al.*, 2019).

### **1.8.1 Tratamento medicamentoso**

#### **1.8.1.1 Imatinibe**

O primeiro ITK, o imatinibe (STI-571 ou Glivec®), usado para o tratamento da LMC foi desenvolvido como um inibidor específico do receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-R), no entanto mostrou-se um poderoso e relativamente específico inibidor de tirosina quinases, incluindo o BCR-ABL p210 e BCR-ABL p190 (SAVAGE; ANTMAN, 2002). O imatinibe atua como um inibidor competitivo do sítio de ligação do ATP (trifosfato de adenosina) da enzima, o qual leva à inibição da fosforilação da tirosina de proteínas envolvidas na transdução de sinal mediada pelo BCR-ABL, os quais são críticos para uma variedade de processos biológicos, tais como: crescimento, diferenciação e morte celular. Desta forma, o imatinibe é capaz de interromper o crescimento celular e induzir a apoptose nas células hematopoéticas que expressam o BCR-ABL (FIGURA 5) (DRUKER; LYDON, 2000; DRUKER *et al.*, 1996; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997).

Atualmente, o imatinibe faz parte da primeira linha de tratamento para pacientes com LMC na FC, no entanto outros ITKs também podem ser utilizados como primeira linha, tais como: nilotinibe e dasatinibe. A dose recomendada para o imatinibe é de 400 mg podendo ser aumentada para 800 mg (400 mg 2 vezes ao dia) quando utilizado como segunda linha de tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013).

O uso desse medicamento está associado com uma variedade de efeitos adversos os quais, na maioria dos pacientes, podem variar de leve a moderada intensidade e geralmente duram poucos meses, não necessitando reduzir ou interromper o tratamento. Um dos efeitos adversos é a neutropenia e trombocitopenia transitória, que pode ocorrer nos primeiros meses de tratamento e decorre de uma variabilidade no ritmo de regeneração da hematopoese normal depois da supressão da hematopoese dos clones Ph positivo pelo imatinibe. Outros efeitos adversos também podem estar presentes nesses pacientes, tais como: náuseas, vômitos, fadiga, disfunção hepática, rash cutâneo, retenção de fluidos, edema periorbital, câimbras, mialgia, artralgia, ginecomastia e anemia macrocítica (SCHIFFER, 2007).

O imatinibe é capaz de induzir uma resposta hematológica completa (RHC) em 97% dos pacientes, RCgC em uma taxa que pode variar de 49% a 77% e remissão molecular maior (RMM) em uma taxa que pode variar de 18% a 58%. Embora tenha revolucionado o tratamento dos pacientes com LMC, uma resposta duradoura ao imatinibe se restringe aos pacientes na FC, no entanto alguns dos pacientes nessa fase da doença e a maioria dos pacientes nas fases mais avançadas podem apresentar recaídas em alguns meses ou anos depois do tratamento devido ao desenvolvimento de resistência (BACCARANI *et al.*, 2013; DRUKER *et al.*, 2001; GOLDMAN; MELO, 2003; O'BRIEN *et al.*, 2003; SAWYERS *et al.*, 2002).

Desta forma, os novos ITKs, os de 2ª geração, foram desenvolvidos para superar a resistência ao imatinibe e melhorar a eficácia do tratamento dos pacientes com LMC (JABBOUR; KANTARJIAN, 2014).

#### 1.8.1.2 Nilotinibe e Dasatinibe

O nilotinibe (Tasigna®) é um análogo estrutural do imatinibe, portanto apresentam um mecanismo de ação semelhante. A sua afinidade pelo domínio quinase da proteína BCR-ABL é cerca de 50 vezes maior do que o imatinibe resultando, assim, em uma maior potência e seletividade à proteína (MANLEY; COWAN-JACOB; MESTAN, 2005; WEISBERG *et al.*, 2005).

Atualmente, pode ser utilizado como 1ª linha de tratamento na dose de 300 mg duas vezes ao dia podendo, também, ser utilizado como 2ª linha de tratamento e nas linhas subsequentes, na dose de 400 mg duas vezes ao dia, quando há intolerância ou falha de um dos ITK usados como primeira linha (imatinibe, nilotinibe e dasatinibe). Sua utilização está associada a alguns efeitos adversos hematológicos, não hematológicos e bioquímicos, cujos mais frequentes são: neutropenia, trombocitopenia, rash cutâneo, prurido, náuseas, fadiga, cefaleia, diarreia, vômito, constipação, hiperbilirrubinemia, elevação de lipase, hipofosfatemia e hiperglicemia (BACCARANI *et al.*, 2013; QUINTÁS-CARDAMA *et al.*, 2010).

O estudo *Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients* (ENESTnd) comparou a taxa de RMM aos 12 meses entre os pacientes em uso de nilotinibe (300 ou 400 mg duas vezes ao dia) e os pacientes em uso de imatinibe 400 mg uma vez ao dia. Os resultados mostraram uma taxa de RMM significativamente maior nos pacientes em uso de nilotinibe em ambas as dosagens quando comparada com os pacientes em uso de imatinibe (44%-43% versus 22%,  $p < 0,001$ ). Além disso, a taxa de progressão da doença para FA ou FB foi menor nos pacientes em uso de nilotinibe demonstrando, assim, a superioridade desse medicamento em relação ao imatinibe (LARSON *et al.*, 2012).

Outro ITK de 2ª geração aprovado para o tratamento da LMC é o dasatinibe, que é uma pequena molécula não relacionada ao imatinibe. O dasatinibe é um inibidor competitivo do ATP e consegue inibir o BCR-ABL bem como outras quinases, tais como a família das quinases Src, c-KIT (proteína tirosina quinase) e PDGFR- $\alpha$  e  $\beta$ . dasatinibe é cerca de 350 vezes mais potente do que o imatinibe e apresenta atividade contra diversas mutações clinicamente relevantes, contudo, assim como nilotinibe, não demonstra atividade contra a mutação T315I (LOMBARDO *et al.*, 2004; MARTENS, 2014).

Semelhante ao nilotinibe, o dasatinibe pode ser utilizado como 1ª, 2ª ou linhas subsequentes de tratamento, podendo ser administrado em dose única de 100 mg ou na dose de 140 mg quando utilizado como 2ª ou subsequentes linhas de tratamento (BACCARANI *et al.*, 2013). A utilização desse medicamento está associada a efeitos adversos em aproximadamente todos os pacientes. Estes efeitos podem variar de leve a moderada intensidade sendo os mais frequentes a retenção de líquidos, a diarreia, a cefaleia, as náuseas, o rash, a dispneia, a hemorragia, a fadiga, os vômitos, a tosse, a dor abdominal e a febre (MARTENS, 2014)

No estudo *DASatinib versus Imatinib Study In treatment-Naive CML patient* (DASISION), o dasatinibe administrado na dose de 100 mg ao dia foi comparado ao imatinibe administrado na dose de 400 mg diários. Neste estudo foi evidenciado que os paciente em uso de dasatinibe alcançaram RCgC em 12 meses mais frequentemente do que os pacientes em uso de imatinibe (77% versus 66%,  $p=0,007$ ). Além disso, a taxa de RMM foi maior nos pacientes em uso de dasatinibe do que nos pacientes em uso de imatinibe (46% versus 28%,  $p<0,0001$ ) e esta resposta foi mais rápida nos pacientes em uso de dasatinibe ( $p<0,0001$ ). Por último, a taxa de progressão para FA ou para FB foi maior nos pacientes em uso de imatinibe do que nos pacientes em uso de dasatinibe mostrando, assim, a superioridade do dasatinibe em relação ao imatinibe (KANTARJIAN *et al.*, 2010).

### **1.9 Efeitos adversos aos inibidores de tirosina quinase**

A resposta ao tratamento e a taxa de sobrevida dos pacientes com LMC em fase crônica têm melhorado significativamente após a introdução do imatinibe (KANTARJIAN *et al.*, 2012; O'BRIEN *et al.*, 2003) e subsequentemente com os ITKs de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe) (CORTES *et al.*, 2016; LARSON *et al.*, 2014; FALCHI *et al.*, 2013). Apesar do sucesso e de sua segurança, uma parte dos pacientes com LMC sofrem com a presença de efeitos adversos provocados pelo uso dos ITKs (DRUKER *et al.*, 2001; LARSON *et al.*, 2014; FUJISAWA *et al.*, 2014).

O uso do imatinibe está associado a toxicidade leve a moderada que pode ser revertida com redução da dose ou descontinuação do fármaco. A maioria desses efeitos adversos (edema superficial, náusea, câibras, dor musculoesquelética, diarreia, erupção cutânea/problemas de pele, fadiga, dor de cabeça, dor abdominal, dor articular) ocorre nos primeiros 2 anos após o início da terapia; no entanto eventos a longo prazo também podem ocorrer, tais como: toxicidade cardíaca, dermatite, pancreatite, hipofosfatemia, ginecomastia, hipogamaglobulinemia, hepatotoxicidade, toxicidades pulmonares, hiper/hipopigmentação da pele e edema cerebral (MUGHAL; SCHRIEBER, 2010).

Os outros ITKs não são isentos de efeitos adversos, sendo o nilotinibe e, em certa medida, o dasatinibe associados a morte súbita devido ao prolongamento do intervalo QTc (o intervalo QTc é uma medida de intervalos de tempo que ocorrem durante os impulsos elétricos que estimulam a contração do coração) (PAVLOVSKY; KANTARJIAN; CORTES, 2009). Além disso, foi reportado erupções cutâneas, dor de cabeça, náusea, diarreia, espasmos musculares, acidente vascular cerebral, níveis

elevados de glicose e de colesterol total em pacientes em uso de nilotinibe (LARSON *et al.*, 2014).

Outros efeitos adversos associados ao uso desses inibidores, mais precisamente envolvendo o uso do dasatinibe, são a hipertensão arterial pulmonar (MONTANI *et al.*, 2012), efusão pleural (KREUTZMAN *et al.*, 2017), retenção de líquidos, edema superficial, diarreia, náusea, vômito, mialgia, inflamação muscular, dor musculoesquelética, erupção cutânea, dor de cabeça, fadiga, neutropenia, trombocitopenia e anemia (KANTARJIAN *et al.*, 2010).

Além desses eventos adversos hematológicos e não hematológicos já conhecidos, eventos adicionais associados ao potencial genotóxico dessas drogas não podem ser descartados. Dados pré-clínicos do fabricante demonstraram que o imatinibe foi embriotóxico, teratogênico e carcinogênico em ratos. Além disso, foram encontradas, nesses animais, lesões neoplásicas nos rins, bexiga urinária, uretra, glândula prepucial e clitoral, intestino delgado, glândulas paratireoides, glândulas adrenais e estômago não-glandular (Novartis®). Ademais, tem sido relatado a ocorrência de defeitos citogenéticos em subclones Ph negativos durante o uso do imatinibe. Alguns desses pacientes apresentaram doença secundária evidente que se assemelharam a síndrome mielodisplásica ou leucemia mieloide aguda, mesmo com a supressão do subclone Ph-positivo (VALENT, 2008). Além disso, um relato de caso sugeriu que células-tronco normais transplantadas sofreram transformação e adquiram defeitos citogenéticos durante o uso do imatinibe (VALENT, 2008). Um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa tem mostrado, inclusive, um maior índice de dano no DNA em pacientes com LMC em uso de ITK em relação a um grupo controle e um grupo com LMC sem tratamento, além disso foi demonstrado que o dano no DNA foi maior nos pacientes em uso de ITKs de segunda geração do que nos de primeira geração, reforçando ainda mais o potencial genotóxico desses fármacos (MAIA FILHO *et al.*, 2018).

### **1.10 Monitoramento da doença e critérios de resposta ao tratamento**

O monitoramento da doença é feito através do hemograma completo, da citogenética e da biologia molecular, o qual é utilizada para a quantificação dos níveis dos transcritos do gene *BCR-ABL* e detecção de mutações pontuais no domínio quinase da proteína (BACCARANI *et al.*, 2009).

O hemograma deve ser solicitado ao diagnóstico, a cada 15 dias até que seja alcançada e confirmada a RHC (TABELA 1), e então a cada 3 meses ou quando houver necessidade (BACCARANI *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Definição de resposta hematológica

<b>Tipo de resposta</b>	<b>Definição</b>
Hematológica	
RHC	Leucócitos < $10 \times 10^9/L$ Basófilos < 5% Ausência de mieloblastos, promielócitos e mielócito Contagem de plaquetas < $450 \times 10^9/L$ Baço não palpável

Fonte: Adaptado de Baccarani (2009). Legenda | Resposta hematológica completa (RHC).

De acordo com as recomendações da ELN, a citogenética com ABC deve ser realizada em pelo menos 20 células em metáfases da medula óssea e deve ser solicitada ao diagnóstico, a cada 3 meses nos primeiros seis meses de tratamento e posteriormente a cada 6 meses até que seja alcançado e confirmado uma RCgC. Após este período, a ABC pode ser realizada a cada 12 meses quando o monitoramento molecular não estiver disponível. Além disso, a ABC deve sempre ser realizada nos casos de resposta subótima, falha ao tratamento, achados mielodisplásicos, trombocitopenia ou anemia inexplicável. Além da avaliação da resposta ao tratamento, a análise citogenética é importante na detecção de anormalidades citogenéticas adicionais especialmente nos casos de evolução clonal dos clones Ph<sup>+</sup> ou Ph<sup>-</sup> durante a terapia (BACCARANI *et al.*, 2009; BENNOUR *et al.*, 2016). As definições de RCg é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Definição de resposta citogenética de acordo com a citogenética clássica.

<b>Tipo de resposta</b>	<b>Definição</b>
Citogenética	
Completa (RCgC)	Ausência de metáfases Ph <sup>+</sup>
Parcial (RCgP)	1 – 35% de metáfases Ph <sup>+</sup>
Menor (RCgm)	36 – 65% de metáfases Ph <sup>+</sup>
Mínima (RCgmin)	66 – 95% de metáfases Ph <sup>+</sup>
Ausente (RCgA)	> 95% de metáfases Ph <sup>+</sup>

Fonte: Adaptado de Baccarani (2009). Legenda | Cromossomo *Philadelphia* (Ph<sup>+</sup>).

A ABC da medula é preferível ao I-FISH (*interphase fluorescent in situ hybridization*) uma vez que a definição dos diferentes graus de resposta citogenética foi baseada na ABC e porque o I-FISH detecta apenas a ACC/Ph+ ou a ACC/Ph-. No entanto, uma vez alcançado a RCgC, a ABC pode ser substituída pelo I-FISH quando não for possível obter um número adequado de células medulares em metáfase ou quando há problemas de coleta destas células para a ABC. Para o monitoramento da RCgC pela técnica de I-FISH, o qual é definida por <1% de núcleos de células BCR-ABL positivas, a ELN recomenda a análise de pelo menos 200 núcleos em intérfase do sangue periférico (BACCARANI *et al.*, 2009).

O monitoramento molecular é realizado de acordo com uma escala internacional (SI), o qual é calculado pela razão entre o número de transcritos do *BCR-ABL* e o número de transcritos do *ABL* ou outro transcrito reconhecido como controle. Esta razão é expressada como porcentagem de *BCR-ABL* sob escala logarítmica, na qual 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% corresponde, respectivamente, a uma diminuição de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 logs abaixo da linha basal usada no estudo IRIS, o qual é recomendada pela ELN (BACCARANI *et al.*, 2013).

O monitoramento molecular da doença para avaliar a resposta ao tratamento deve ser realizado a cada 3 meses até que uma RMM seja alcançada e confirmada e posteriormente a cada 6 meses. Além disso, o monitoramento molecular da doença para avaliar o surgimento de mutações pontuais do domínio quinase deve ser solicitado na presença de resposta subótima ou falha ao tratamento, sendo este exame necessário para a troca do tratamento por outros ITKs ou por outras terapias (BACCARANI *et al.*, 2009). A definição de RM é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Definição de resposta molecular

Tipo de resposta			
Molecular			
		1 log	10%
		2 logs	1%
	RMM	3 logs	0,1%
RMP	MR <sup>4,0</sup>	4 logs	0,01%
	MR <sup>4,5</sup>	4,5 logs	0,0032%
	MR <sup>5,0</sup>	5 logs	0,001%
Leucemia molecularmente indetectável			

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013). Legenda | Resposta molecular maior (RMM); Resposta molecular (RM); Resposta molecular profunda (RMP).

A resposta aos ITKs é o fator de prognóstico mais importante e pode ser classificada como ótima, alarme e falha. A resposta ótima está associada a melhores desfechos a longo prazo não necessitando de alteração no tratamento, a falha está associada a piores desfechos havendo necessidade de troca terapêutica para limitar a progressão da doença ou morte. Entre a resposta ótima e a falha terapêutica existe uma zona intermediária conhecida como alarme o qual requer um monitoramento mais frequente para permitir uma rápida intervenção terapêutica caso ocorra uma falha (BACCARANI *et al.*, 2013). Os critérios de resposta aos ITKs utilizados como primeira linha de tratamento são mostrados na Tabela 4.

Estas definições de respostas são as mesmas para os pacientes em FC, FA ou FB e aplicam-se, também, ao tratamento de segunda linha quando o tratamento de primeira linha for alterado por intolerância. A resposta pode ser avaliada com um teste molecular ou citogenético, mas ambos são recomendados sempre que possível (BACCARANI *et al.*, 2013).

Tabela 4 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 1ª linha

	<b>Ótima</b>	<b>Alarme</b>	<b>Falha</b>
<b>Basal</b>	NSA	Alto risco Ou ACC/Ph+, ACM	NSA
<b>3 meses</b>	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL > 10% Ph+ 36 – 95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95%
<b>6 meses</b>	BCR-ABL < 1% e/ou Ph+ 0	BCR-ABL 1 – 10% e/ou Ph+ 1 – 35%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 35%
<b>12 meses</b>	BCR-ABL ≤ 0,1%	BCR-ABL 0,1 – 1%	BCR-ABL > 1%
<b>&gt;12 meses</b>	BCR-ABL ≤ 0,1%	ACC/Ph- (-7 ou 7q-)	Perda de RHC Perda de RCgC Perda de RMM* Mutações ACC/Ph+

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013). Legenda | NSA – Não se aplica, ACC – Anormalidade citogenética clonal adicional, ACM – Anormalidade citogenética maior, RHC – Resposta hematológica completa, RCgC – Resposta citogenética completa, RMM – Resposta molecular maior. (\*) Deve ser realizado 2 testes para a conformação da perda de RMM, no qual um dos testes deve apresentar um nível de transcrito do *BCR-ABL* ≥ 1%.

As definições de resposta ao tratamento com ITKs utilizados como segunda linha de tratamento são mostradas na Tabela 5. Estas definições estão limitadas ao dasatinibe e ao nilotinibe, no entanto podem ser utilizadas provisoriamente para a avaliação da resposta aos outros TKIs, tais como: bosutinibe e ponatinibe. Essas definições têm implicações terapêuticas profundas uma vez que impõem limites críticos que determinam a utilização dos TKIs ou Alo-TCTH (BACCARANI *et al.*, 2013).

Tabela 5 – Definições de resposta ao tratamento com ITKs usados como 2ª linha

	Ótima	Alarme	Falha
<b>Basal</b>	NSA	Ausência ou perda da RHC ao imatinibe ou falta de RyC ao ITK usado como primeira linha ou alto risco	NSA
<b>3 meses</b>	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 65%	BCR-ABL > 10% Ph+ 65 – 95%	Ausência de RHC e/ou Ph+ > 95% ou nova mutação
<b>6 meses</b>	BCR-ABL ≤ 10% e/ou Ph+ < 35	Ph+ 35 – 65%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 65% ou nova mutação
<b>12 meses</b>	BCR-ABL < 1% e/ou Ph+ 0	BCR-ABL 1 – 10% e/ou Ph+ 1 – 35%	BCR-ABL > 10% e/ou Ph+ > 35% e/ou Novas mutações
<b>&gt;12 meses</b>	BCR-ABL ≤ 0,1%	ACC/Ph- (-7 ou 7q-) Ou BCR-ABL > 0,1%	Perda de RHC Perda de RCgC ou RCgP Novas mutações Perda de RMM* ACC/Ph+

Fonte: Adaptado de Baccarani (2013). Legenda | NSA – Não se aplica, ACC – Anormalidade citogenética clonal adicional, ACM – Anormalidade citogenética maior, RHC – Resposta hematológica completa, RCgC – Resposta citogenética completa, RMM – Resposta molecular maior. (\*) Deve ser realizado 2 testes para a conformação da perda de RMM, no qual um dos testes deve apresentar um nível de transcrito do *BCR-ABL* ≥ 1%.

### 1.11 Resistência ao tratamento com inibidores de tirosina quinase

Embora a utilização dos ITKs promova altos índices de respostas, casos de resistência a esses fármacos têm sido observados em todas as fases da doença, sendo mais frequentes nas FA e FB (VALENT, 2008; MELO; CHUAH, 2007, PINILLA-IBARZ; CORTES; MAURO, 2011). Para o imatinibe a resistência ao tratamento acomete de 10 – 15% dos indivíduos e, para ITKs de 2ª geração, a resistência é <10% (HOCHHAUS *et*

*al.*, 2020). A resistência aos ITKs pode ser dividida em duas categorias, são elas: resistência primária ou refratariedade a qual é definida como ausência de resposta no início da terapia e resistência secundária ou adquirida definida como perda de resposta hematológica, citogenética ou molecular (VAIDYA; GHOSH; VUNDINTI, 2011).

Existem vários mecanismos de resistência os quais podem ser classificados em dois grupos, os mecanismos dependentes do BCR-ABL e mecanismos independentes do BCR-ABL. Dentre os mecanismos independentes do BCR-ABL podemos citar a quiescência das células tronco malignas, alteração na biodisponibilidade oral (variabilidade individual na concentração de CYP2A4), ligação a proteínas plasmáticas (glicoproteína ácida 1 $\alpha$ ), alterações na disponibilidade intracelular do fármaco (por efluxo ou influxo) dentre outros. Já os mecanismos dependentes do BCR-ABL são representados pela amplificação do gene BCR-ABL, mutações pontuais no domínio quinase e mutações fora do domínio quinase (VAIDYA *et al.*, 2011).

As mutações pontuais no domínio quinase (DK) são reconhecidas como o mecanismo mais comum de falha ao imatinibe e mais de 90 mutações já foram relatadas. A prevalência de mutações é 50-90% em pacientes com resistência ao imatinibe, sendo as principais a T315I, Y253H/F, M351T, G250E, E255K/V, F359V e H396R. Estas mutações apresentam variações quanto a sensibilidade ao imatinibe e algumas apresentam resistência tanto para os ITK de 1<sup>a</sup> geração quanto para os ITKs de 2<sup>a</sup> geração, tais como o nilotinibe e dasatinibe (APPERLEY, 2007; GORRE *et al.*, 2001; HOCHHAUS *et al.*, 2002; JABBOUR *et al.*, 2011; MELO; CHUAH, 2007; O'HARE; EIDE; DEININGER, 2007).

De modo geral, as mutações pontuais no domínio quinase são distribuídas no *loop P* (*loop* de ligação ao nucleotídeo), *loop A* (sítio de ativação), domínio catalítico e no resíduo *gatekeeper*, esta última é uma das mutações mais frequentes do DK e corresponde a um resíduo de treonina na posição 315 (Thr315) do BCR-ABL o qual mantém ligações de hidrogênios importantes com o imatinibe e controla estericamente a ligação do imatinibe a porções hidrofóbicas adjacentes ao sítio de ligação do ATP, mutações como a T315I na qual há substituição de uma treonina por uma isoleucina, perdem as ligações de hidrogênio que, em adição ao impedimento estérico imposto pela extensa cadeia lateral da isoleucina, prejudica a ligação com o imatinibe e causa insensibilidade completa a este composto bem como a outros ITKs, tais como: nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe (APPERLEY, 2007; DAUB; SPECHT; ULLRICH, 2004; QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009).

Uma outra região do DK comumente mutada é o *loop P*, uma estrutura rica em glicina, extremamente flexível que serve como um sítio de acoplamento para os grupos fosfatos do ATP. Quando ligado ao DK, o imatinibe induz o deslocamento do *loop P* para baixo, o qual forma uma espécie de capa hidrofóbica ao redor do imatinibe. Esta interação é importante para a ligação do imatinibe ao DK, portanto mutações nesse sítio (Y253H/F e E255D/K/R/F) podem prejudicar a ligação do imatinibe ao DK (APPERLEY, 2007; DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005).

As mutações mais frequentes do DK são as T315I, Y253F e E255K, sendo a primeira mutação correspondente a alteração no sítio de ligação do imatinibe e as duas últimas ao *loop P*. Estas mutações demonstram um grande potencial oncogênico, o que é consistente com o pior desfecho encontrado nos pacientes que albergam esse tipo de mutação o que, portanto, confere um pior prognóstico nesses pacientes (APPERLEY, 2007; SHAH *et al.*, 2002; VALENT, 2008).

#### **1.14 Parada do tratamento com inibidores de tirosina quinase**

O conceito de RLT é relativamente novo e um dos seus primeiros indícios surgiu com um estudo piloto envolvendo a descontinuação do imatinibe e, subsequentemente, com os ensaios clínico de descontinuação STIM (*multicentre, non-randomized Stop Imatinib study*) e TWISTER (MAHON *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 2013; ROUSSELOT *et al.*, 2007). Estes ensaios clínicos têm mostrado que alguns pacientes com LMC em fase crônica que obtiveram resposta molecular profunda (RMP) sustentada sob tratamento com TKIs puderam suspender, com segurança, a terapia e tentar a RLT (MAHON *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 2013). Muitos estudos de RLT até o momento envolveram pacientes tratados com imatinibe; no entanto, a viabilidade da RLT após nilotinibe ou dasatinibe também tem sido demonstrada (IMAGAWA *et al.*, 2015; MAHON, 2018 OKADA *et al.*, 2018).

A RLT tem mostrado ser uma meta atraente para muitos pacientes por alguns motivos: 1) embora os pacientes que respondem bem ao tratamento com ITKs tenham taxas de sobrevida semelhantes àsquelas observadas na população geral, o impacto da terapia com ITKs a longo prazo na vida dos pacientes deve ser considerado. Os eventos adversos associados aos ITKs que afetam a vida diária são observados em aproximadamente 30% dos pacientes e esses eventos têm mostrado um impacto na qualidade de vida durante o tratamento com ITKs em longo prazo, principalmente nos pacientes mais jovens (18 a 39 anos). Se a suspensão da terapia com ITKs levar à

resolução dos eventos adversos associados ao uso dos ITKs, a obtenção de uma RLT bem-sucedida pode resultar em melhorias substanciais na qualidade de vida desses pacientes. 2) Além disso, há evidências de comprometimento do crescimento em pacientes pediátricos com LMC tratados com imatinibe; embora os estudos de RLT até o momento tenham se concentrado em pacientes adultos, também pode haver benefícios significativos a longo prazo da RLT em pacientes pediátricos. 3) Atualmente, recomenda-se que os pacientes não engravidem enquanto estiverem recebendo qualquer ITK devido ao potencial de embriotoxicidade. Em pacientes com LMC que desejam engravidar, a RLT pode representar um ambiente mais seguro. 4) A RLT também pode ter benefícios econômicos (DULUCQ; MAHON, 2016).

Embora traga muitas vantagens, a RLT não é alcançada em todos os pacientes que interrompem o tratamento com ITKs e muitos pacientes apresentam recaída molecular. Embora a maioria dos pacientes recuperem a RMP com a reintrodução dos ITKs (MAHON *et al.*, 2010; IMAGAWA *et al.*, 2015; OKADA *et al.*, 2018; ROSS *et al.*, 2013), um entendimento mais completo de quais pacientes têm maior probabilidade de atingir a RLT e quais os fatores podem ser utilizados com preditores dessa resposta precisa ser definida.

Uma revisão de literatura com vários estudos prévios têm sugerido que algumas características dos pacientes, tais como: idade, score Sokal, duração do tratamento com ITKs, tempo para alcançar a doença residual mínima indetectável e razões (escolha do paciente, intolerância e resistência) que levaram a troca por um ITK de segunda geração podem estar associadas ao sucesso da descontinuação do tratamento, no entanto não há uma consistência desses dados entre os estudos (DULUCQ; MAHON, 2016). Além desses fatores, características imunológicas têm sido associadas ao sucesso para o tratamento com ITKs (OHYASHIKI *et al.*, 2012; MIZOGUCHI *et al.*, 2013; ILANDER *et al.*, 2017).

### **1.15 Fatores imunológicos associados a RLT**

O trabalho publicado por Ilander *et al.* (2017) têm mostrado alguns desses fatores. Em seu trabalho, Ilander *et al.* (2017) têm mostrado que a proporção de células NK estar associada com a sobrevivência livre de recidiva molecular, uma vez que os pacientes com percentual aumentado de células NK no momento da interrupção do medicamento tiveram maior probabilidade de permanecer em remissão. Além disso, em pacientes sem recidivas, o fenótipo maduro das células NK foi observado, enquanto os pacientes com

células NK virgens com CD56<sup>bright</sup> tiveram uma sobrevida livre de recidiva diminuída. Ilander *et al.* (2017) encontraram, ainda, que o fenótipo maduro de células NK associado com a secreção de citocinas TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  (perfil Th1) pelas células T CD4<sup>+</sup> correlacionou-se negativamente em pacientes que tiveram recaída da doença, sugerindo que as células NK desses pacientes podem não ser suficientes para ativar células T CD4<sup>+</sup>. Dessa forma, Ilander *et al.* (2017) demonstraram o papel das células NK na manutenção da remissão e fortaleceram o status da LMC como uma neoplasia imunogênica.

Similarmente, Ohyashiki *et al.* (2012) e Mizoguchi *et al.* (2013) mostraram um maior nível de células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) ao compararem pacientes com RMP, pacientes com RLT e pacientes controles. Adicionalmente, Mizoguchi *et al.* (2013) demonstraram que essas células apresentavam uma maior marcação intracelular de moléculas efetoras, tais como INF- $\gamma$ , granzimas e perforinas em pacientes em RLT ( $\geq 6$  meses) e pacientes com RMP estável quando comparados com pacientes RMP flutuante e indivíduos saudáveis. Além disso, Mizoguchi *et al.* (2013) encontraram um aumento progressivo no número de células T CD8<sup>+</sup> efetoras (INF- $\gamma$ <sup>+</sup> TCD8<sup>+</sup>) nos grupos com RMP flutuante, RMP estável e no grupo que descontinuou o tratamento com imatinibe (STOP-IM) respectivamente. Embora a comparação entre os pacientes com RMP estável e STOP-IM tenha revelado apenas uma tendência aumentada no número dessas células, esses achados sugerem que a RLT, representada no estudo de Mizoguchi *et al.* (2013) como STOP-IM, pode ser sustentada pelas células NK com o auxílio de células T CD8<sup>+</sup> efetoras e que, nos grupos em tratamento, a resposta de células T CD8<sup>+</sup> parecem, pelo menos em parte, ser “down” regulada por efeitos “off-target” do imatinibe.

Rea *et al.* (2017) confirmam os achados de Ilander *et al.* (2017) demonstrando um aumento de células NK CD56<sup>dim</sup> (maduras) em pacientes com LMC que não apresentaram recaída molecular depois da descontinuação do imatinibe no período do estudo. Além disso, Rea *et al.* (2017) mostraram que a contagem de células NK CD56<sup>dim</sup> foi um fator prognóstico independente da sobrevida livre de recidiva molecular. Rea *et al.* (2017) também avaliou o perfil de expressão de um painel de receptores (CD56, CD16, CD3, DNAM-1, KIR2D, NKp46, NKp30, NKG2A, CD94 e CD57) associados a função de células NK CD56<sup>dim</sup> e, embora não tenham encontrado diferença na expressão desses receptores entre pacientes que tiveram recaída e os que não tiveram, diferenças foram encontradas quando comparados com um grupo formado por indivíduos saudáveis, indicando que esses receptores (NKp46, DNAM-1) são provavelmente desregulados por mecanismos relacionados LMC.

O sucesso da RLT também tem sido associado a uma menor proporção de células dendríticas plasmocitoides (pCDs) CD86<sup>+</sup> (um ligante conhecido para CTLA-4, B.7) (SCHÜTZ *et al.*, 2017). Além disso, em seu trabalho Schütz *et al.* (2017) têm mostrado que pacientes com maior proporção de pCDs CD86<sup>+</sup> se correlacionou com a exaustão de células T CD8<sup>+</sup> específicas da leucemia, mostrando que pacientes com recaída da doença podem não contar com o auxílio de células T CD8<sup>+</sup>, corroborando, assim, com os achados de Mizoguchi *et al.* (2013). Apesar de não demonstrado por Schütz *et al.* (2017), dois mecanismos, envolvendo a ligação com CTLA-4, são cogitados participar dos mecanismos imunológicos ligados as funções supressoras de pCDs; (1) estimulação de células Tregs e (2) inibição de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> através da ligação CD86-CTLA-4, ambos resultando em supressão das funções de células T. De forma complementar, tem sido relatado no estudo de Irani *et al.* (2023) um aumento de células Treg em pacientes com recaída molecular após a descontinuação do ITK, o qual pode ter alguma relação com as pCD, uma vez que tem sido relado o potencial dessas células de induzir a formação de células Treg (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2023).

Tomados juntos, esses resultados ressaltam a importância dessas células do sistema imunológico (células NK, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, Treg, pCD) e abrem perspectivas para uma contribuição conjunta dessas células no controle da doença.

## **1.16 Importantes células e moléculas do sistema imunológico.**

### **1.16.1 Células NK**

As células NK representam 5-15% dos linfócitos do sangue periférico, fazem parte da imunidade inata e são capazes de matar células infectadas por vírus ou células tumorais, não precisam de sensibilização prévia e sua atividade é regulada por receptores de ativação e receptores inibitórios (BLOOM, 1982; CHEENT; KHAKOO, 2009). Essas células são inibidas através da ligação de receptores inibitórios com as moléculas de HLA de classe I expressas nas células normais. A perda ou diminuição na expressão do HLA de classe I que ocorre nas células infectadas por vírus ou células tumorais e a ligação dos receptores de ativação, presentes nas células NK, com seus respectivos ligantes na célula infectada ou tumoral, permite que as células NK se tornem ativadas, podendo, assim, matar as células alteradas através da liberação de perforinas e granzimas, ou ainda, indiretamente, através da liberação de citocinas do perfil Th1 (CHEENT; KHAKOO, 2009). Um terceiro mecanismo de morte mediada por células NK está associada ao

reconhecimento da porção FC de IgGs na superfície da célula-alvo, podendo, assim, levar a citotoxicidade medida por anticorpo (ADCC) (ROMEE *et al.*, 2013).

As células NK expressam receptores inibitórios que reconhecem as moléculas de HLA, alguns “*killer immunoglobulin-like receptors*” (KIR) que reconhecem as moléculas de HLA-A, B e C (moléculas clássicas do MHC), alguns receptores pertencente à família de lectina do tipo C, como o heterodímero CD94/NKG2A, que reconhece HLA-E (molécula não clássica do MHC), o “*leukocyte immunoglobulin-like receptors*”, conhecidos como LIR (MORETTA; MORETTA, 2004; PEGRAM *et al.*, 2011). Outro receptor inibitório de células NK é o “*Killer cell lectin-like receptor G1*” (KLRG1) que reconhecem moléculas de caderina E/N/R e está relacionado com a prevenção de lise dos tecidos saudáveis (PEGRAM *et al.*, 2011).

Por outro lado, células NK também apresentam alguns receptores de ativação, tais como os receptores de citotoxicidade natural (NCRs) que incluem os receptores NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, os receptores heterodiméricos CD94/NKG2C/E que também se ligam à molécula de HLA-E, o receptor o NKG2D, pertencente à família NKG2, que se ligam a moléculas codificadas por genes relacionados com o MHC de classe I induzida por estresse (MICA, MICB, ULBP1/2/3/4), as quais são “*up*” reguladas em resposta ao estresse, tais como infecções virais ou células neoplásicas e o receptor 2B4 (MORETTA; MORETTA, 2004; PEGRAM *et al.*, 2011). Além desses receptores, existem os receptores co-estimulatórios, tais como o DNAM-1 e PIL, que transmitem sinais ativadores para células NK (PEGRAM *et al.*, 2011).

Dentre os diversos receptores de células NK, os NCRs são considerados os mais importantes receptores envolvidos na morte de células tumorais (PENDE *et al.*, 1999; BYRD *et al.*, 2007). Podem ser expressos em alguns subtipos de células T e células linfoides inatas (CLI), interagem com uma ampla quantidade de ligantes, variando desde ligantes de origem celular, viral, parasita e bacteriana (KRUSE *et al.*, 2014). Entre os NCRs, o NKp46 é considerado o maior receptor ativador envolvido no reconhecimento e lise de células tumorais (PENDE *et al.*, 1999; BYRD *et al.*, 2007).

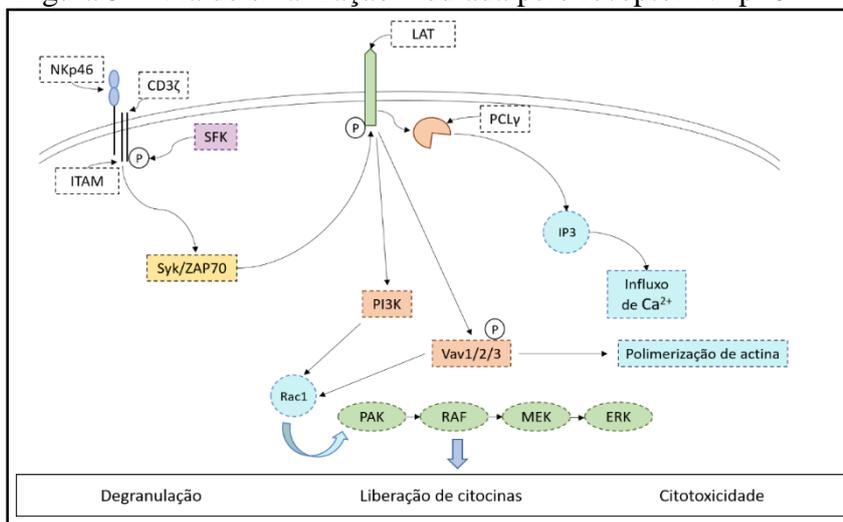
### **1.16.2 NKp46**

NKp46 foi o primeiro NCR identificado, estando presente em células NK ativas ou não. Estão presentes, também, em um conjunto particular de linfócitos ( $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ ) humanos e CLI1 (incluem células NK) e CLI3 (VERRIER, T. *et al.*, 2016; KRUSE *et al.*, 2014). É codificado pelo gene *NKp46* que está localizado no cromossomo 19 (19q13.42).

Sua estrutura é composta 2 domínios de Ig do tipo C2 N-terminal, 1 domínio transmembrana e uma região citoplasmática altamente carregada com 25 aminoácidos. Sua calda citoplasmática não apresenta motivos de sinalização, mas os motivos ITAM (imunorreceptor de ativação baseados em tirosina) presentes nas proteínas adaptadoras CD3 $\zeta$  e FcR $\gamma$  ligados ao receptor NKp46 através de um resíduo de arginina em seu domínio transmembrana, podem ativar células NK (KRUSE *et al.*, 2014).

A sinalização mediada pela ativação do receptor NKp46 é proveniente das proteínas adaptadora CD3 $\zeta$  e FcR $\gamma$  que apresentam motivos ITAM (CHEN *et al.*, 2020). Após a ligação com o ligante, essas proteínas se associam com o receptor NKp46 e são fosforiladas por proteínas da família SRC quinase (SFK), tais como Lck (proteína tirosina quinase específicas de linfócitos) e Fyn (proto-oncogene proteína tirosina quinase) (CHEN *et al.*, 2020). Através dos seus domínios SH2, os ITAMs fosforilados recruta e ativam tirosina quinases como Syk (tirosina quina esplênica) e/ou ZAP70 (tirosina quinase 70 associada a cadeia zeta). Essas tirosinas quinases ativam proteínas adaptadores transmembrana LAT (ligante para ativação de célula T) e NTAL (ligante de ativação de células não T), levando a ativação de fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K), Vav1, 2 e 3. PLC $\gamma$  aumenta o influxo de Ca<sup>2+</sup> e PI3K e Vav1 recruta a proteína G Rac1 e induz a cascata de fosforilação de PAK1-MEK-Erk e ativa a via de sinalização MAPK. O resultado final dessa cascata promove o rearranjo do citoesqueleto de actina, degranulação, citotoxicidade e a expressão de gene que codificam citocinas e quimiocinas (CHEN *et al.*, 2020). O esquema demonstrando a cascata de sinalização envolvida na ativação de NKp46 é mostrada na figura 5.

Figura 5 – Via de sinalização mediada pelo receptor NKp46



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.* (2020). Legenda | Imunorreceptor de ativação baseados em tirosina (ITAM); Família SRC quinase (SFK); tirosina quina esplênica (Syk); tirosina quinase 70 associada a cadeia

zeta (ZAP-70); ligante para ativação de célula T (LAT); fosfolipase C $\gamma$  (PCL $\gamma$ ); inositol-1,4,5-trifosfato (IP3); fosfatidilinositol-3-OH-quinase (PI3K); Fator trocador de nucleotídeo guanina (Vav); quinase ativa por Rac (PAK); proteína quinase serina/treonina específica (RAF); quinase ativadora da MAP quinase (MEK); quinase regulada por sinal extracelular (ERK).

### ***1.16.3 Interação entre as células T CD4, T CD8, células NK e outras células do sistema imunológico inato.***

Como representante do sistema imune inato e como mencionado acima, a ativação de células NK através da perda de sinais inibitórios e a ligação dos receptores de ativação com seus respectivos ligantes nas células alvo, promovem a morte da célula alvo por apoptose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000). No contexto inflamatório, as células NK repodem a IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas ativadas, secretando INF- $\gamma$ , a qual é responsável por ativar ainda mais as células dendríticas e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000).

Os antígenos teciduais são capturados pelas células dendríticas e transportados via sistema linfático; enquanto que antígenos que alcançam o sangue são capturados pelas células dendríticas no baço; independente da via de transporte, os antígenos são levados aos órgãos linfoides para que possam ser apresentados aos linfócitos T virgem (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000). As células dendríticas são as mais importantes na iniciação da resposta imune mediada por células T (DELVES; ROITT, 2000). Essa célula apresentadora de antígeno (APC) é responsável por capturar os antígenos e apresenta-los aos linfócitos T nos órgãos linfoides, onde estão concentrados; essas células também apresentam alta expressão de coestimuladores, os quais podem ser potencializados por estímulos proveniente do sistema imunológico inato e são de grande importância para ativação de células T virgens, uma vez que a apresentação de antígenos sem coestimulação torna as células T não responsiva ou são induzidas a morte por apoptose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000; DELVES; ROITT, 2000). Dentre os estímulos do sistema imunológico inato que estimulam a expressão de coestimuladores nas APCs (célula dendrítica, macrófagos e linfócitos B) podemos citar a produção de INF- $\gamma$  por exemplo por células NK e o reconhecimento PAMPs (padrão molecular associado ao patógeno) por receptores *Toll like* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000). As células B e macrófagos também são APCs, no entanto são mais importantes na apresentação de antígenos para células efetoras, uma vez que dependem do estímulo do

sistema imunológico inato para expressar coestimuladores, enquanto que células dendríticas expressam constitutivamente e tem sua expressão potencializada com o estímulo do sistema imunológico inato (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Nos órgãos linfoides, a depender do tipo de antígeno, o complexo peptídeo-MHC de classe II ou de classe I (primeiro sinal), expresso nas células dendríticas ativadas, é reconhecido pelos TCRs dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e/ou T CD8<sup>+</sup> respectivamente (LIPSCOMB; MASTEN, 2002; BANCHEREAU *et al.*, 2000; DELVES; ROITT, 2000). As APCs expressam MHC de classe II quando fagocitam antígenos extracelulares, enquanto que a apresentação via MHC de classe I é mediada por antígenos citossólicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; CHAPLIN, 2010; LIPSCOMB; MASTEN, 2002). Importammentemente, qualquer célula nucleada pode apresentar antígenos via MHC de classe I e, conseqüentemente, ativar células T CD8<sup>+</sup>, no entanto essas células são mais efetivamente ativadas por alguns subtipos de células dendríticas (células dendrítica BDCA-3<sup>+</sup> (CD141) e as pCD) que são células exclusivas capazes de promover a apresentação cruzada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BASTA; ALATERY, 2007; BANCHEREAU *et al.*, 2000; DELVES; ROITT, 2000). Nesse processo, essas células podem, além de ativar células T CD4<sup>+</sup> via MHC de classe II, apresentar antígenos via MHC de classe I para linfócitos T CD8<sup>+</sup> (BASTA; ALATERY, 2007). Esses subtipos específicos de células dendríticas podem endocitar células tumorais, por exemplo, e liberar os antígenos para o citosol, permitindo, assim, a apresentação cruzada que pode, através do MHC de classe I, ativar também as células T CD8<sup>+</sup> (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Dessa forma, essas células podem apresentar esses antígenos tumorais de diversos tecidos aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes nos órgãos linfoides (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BASTA; ALATERY, 2007).

Além da expressão do complexo peptídeo-MHC, essas mesmas células dendríticas ativadas expressam moléculas que são importantes para a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; CHAPLIN, 2010; LIPSCOMB; MASTEN, 2002). Essas moléculas são conhecidas como coestimuladores (segundo sinal) B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) que são reconhecidos pelas moléculas CD28 presentes nesses linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000; CHAPLIN, 2010; LIPSCOMB; MASTEN, 2002). O resultado dessa interação promove a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>, estimulando, assim, a diferenciação desses linfócitos em células efetora e de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LIPSCOMB; MASTEN, 2002; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Uma vez ativados, os

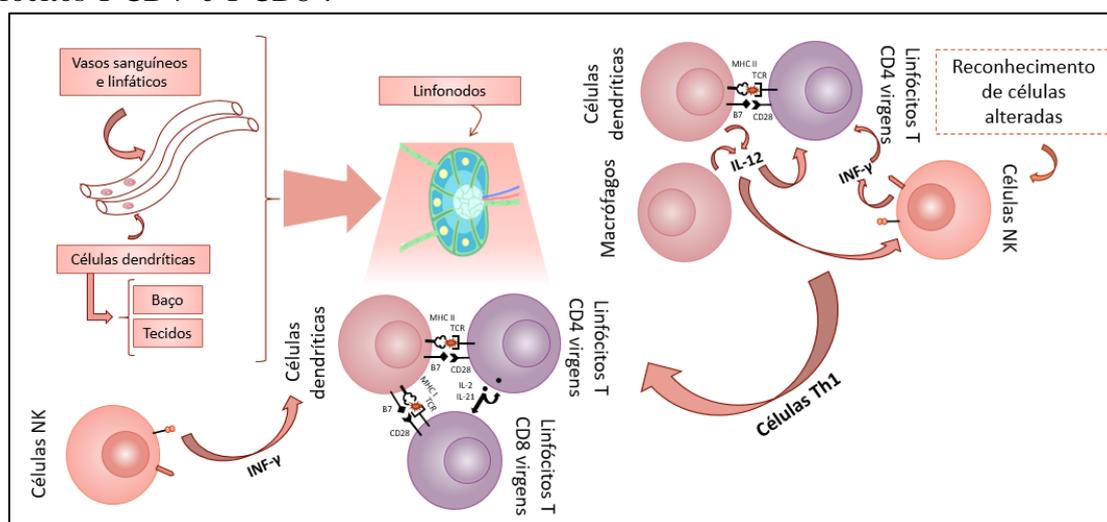
linfócitos aumentam sua expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL), que aumentam a sobrevivência dos linfócitos; aumentam a atividade metabólica; aumentam sua capacidade proliferativa através da diminuição de inibidores do ciclo celular e da produção de IL-2, IL-2R e ciclinas (expansão clonal) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Além disso, as células T efetoras e de memória se tornam menos dependentes da interação com coestimuladores via B7-CD28, permitindo que essas células respondam a uma segunda apresentação de antígenos por APCs com baixa expressão de coestimuladores, as quais podem ser encontradas nos tecidos não linfóides (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Depois ativadas, uma parte das células T CD4<sup>+</sup> efetoras trafegam pela periferia e respondem ao antígeno que tiveram contato nos órgãos linfóides e que foi responsável por sua ativação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Nesse contexto, na segunda interação com o antígeno, a ligação das moléculas CD40L, expressa em linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados, com as moléculas CD40 presentes nas células dendríticas ou macrófagos, tornam essas APCs mais aptas a capturar, processar e apresentar antígenos, aumentar a expressão dos coestimuladores B7 e a secretar citocinas, tais como IL-12 que vão auxiliar a diferenciação de outras células T virgens em efetoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Para os macrófagos, além desses estímulos, essa interação promove um aumento da sua capacidade fagocítica e, para linfócitos B, essa interação é importante para a resposta imunológica humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Nesse ponto da resposta imunológica existem vias de cooperação mútua entre a resposta imunológica inata e adquirida, enquanto que células NK, principais células envolvidas na resposta imunológica contra tumores, e as células T CD4<sup>+</sup> ativadas agem em conjunto na secreção de INF- $\gamma$  para aumentar a capacidade fagocítica e de apresentação de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos, essas APCs secretam IL-12, tanto pela sua ativação durante a fagocitose como pela estímulos via INF- $\gamma$  provenientes de células NK e células T CD4<sup>+</sup> ativadas, promovendo, assim, um estímulo adicional para células NK, as quais respondem aumentando sua toxicidade, secreção de mais INF- $\gamma$  o qual, juntamente com IL-12, estimula a diferenciação de células T virgens em células Th1 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BANCHEREAU *et al.*, 2000; LIPSCOMB; MASTEN, 2002).

A resposta à antígenos tumorais, as quais tendem a evocar respostas imunológicas relativamente fracas, podem requerer a ativação de células T CD4<sup>+</sup>

auxiliares para aumentar a resposta (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Nesse processo, as células T  $CD4^+$  produzem citocinas que estimulam diretamente a diferenciação de células T  $CD8^+$  e, via CD40-CD40L, aumentam a capacidade das células dendríticas de induzir a diferenciação dessas células (DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). Dentre as citocinas produzidas pelas células T  $CD4^+$  ativadas temos a IL-2 (proliferação e diferenciação) e a IL-21 (indução de células de memória e prevenção de exaustão) e as produzidas por células dendríticas temos a IL-12 (diferenciação), o INF do tipo I (diferenciação) e a IL-15 (sobrevivência de células T  $CD8^+$  de memória) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). Quando ativadas nos órgãos linfoides, as células T  $CD8^+$  migram para os tecidos e, ao encontrarem o antígeno que os ativaram, evocam uma resposta efetora que ou consiste na exocitose de grânulos contendo perforinas e granzimas ou ligação de FasL, presente nas células T  $CD8^+$  ativadas, com o Fas expresso na superfície das células alvo, ambos mecanismos medeiam a ativação de caspases e, conseqüentemente, a morte da célula alvo por apoptose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Além disso, assim como células T  $CD4^+$  do perfil Th1 e células NK, as células T  $CD8^+$  também secretam  $INF-\gamma$  estimulando as células fagocíticas a eliminar células tumorais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As células T auxiliares, além de secretarem  $INF-\gamma$ , secretam TNF que, juntos, podem aumentar a expressão de MHC de classe I pelas células tumorais e aumentar a sua susceptibilidade pelas células T  $CD8^+$  (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 6 – Captura, apresentação e reconhecimento de antígenos e diferenciação de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$ .



Nota | Os antígenos teciduais são capturados pelas células dendríticas e transportados via sistema linfático; enquanto que antígenos que alcançam o sangue são capturados pelas células dendríticas no baço; independente da via de transporte, os antígenos são levados aos órgãos linfoides para que possam ser

apresentados aos linfócitos T virgem. Nos órgãos linfoides, a depender do tipo de antígeno, o complexo peptídeo-MHC de classe II ou de classe I (primeiro sinal), expresso nas células dendríticas ativadas, é reconhecido pelos TCRs dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e/ou T CD8<sup>+</sup> respectivamente. As células dendríticas ativadas expressam moléculas coestimulatória (segundo sinal) B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) que são reconhecidos pelas moléculas CD28 presentes nesses linfócitos T. A liberação de IL-12, pelas células dendrítica e/ou macrófagos, juntamente com INF- $\gamma$ , por células NK proporcionam a diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em células do perfil Th1.

Outra parte dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados permanecem no órgão linfoide e são chamadas de célula T auxiliar folicular; essas células são importantes na ativação de linfócitos B, as quais apresentam antígenos proteicos (antígenos T-dependentes) para a célula T auxiliar folicular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). Dessa forma, as células B se tornam ativadas e se diferenciam em plasmócitos de vida longa secretores de imunoglobulina, as quais saem dos órgãos linfoides e migram para a medula óssea e conferem proteção imediata em um segundo contato com o antígeno que o ativou (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). Alguns linfócitos B se diferenciam em células de memória não secretoras de anticorpos, mas que, ao entrarem em contato com o mesmo antígeno que o estimulou, são capazes de montar uma resposta rápida frente a esse antígeno. Esse tipo de ativação ocorre a partir das interações peptídeo-MHC de classe II, CD28-B7 e CD40L-CD40, as quais são importantes para gerar anticorpos da classe IgG, IgA e IgE (troca de isotipo ou mudança classe) e gerar anticorpos de maior afinidade (maturação de afinidade) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014; CHAPLIN, 2010). Além dessa via de ativação, os linfócitos B podem ser ativados pela ligação de antígenos multivalentes (carboidratos e lipídios com epítomos idênticos) denominados antígenos T-independentes, os quais geram plasmócitos de vida curta secretores de IgM (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014; CHAPLIN, 2010). Os anticorpos contra antígenos tumorais produzidos por essas células B podem se ligar aos tumores, os quais se tornam alvo de macrófagos e células NK que apresentam receptores Fc e, portanto, são capazes de media citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

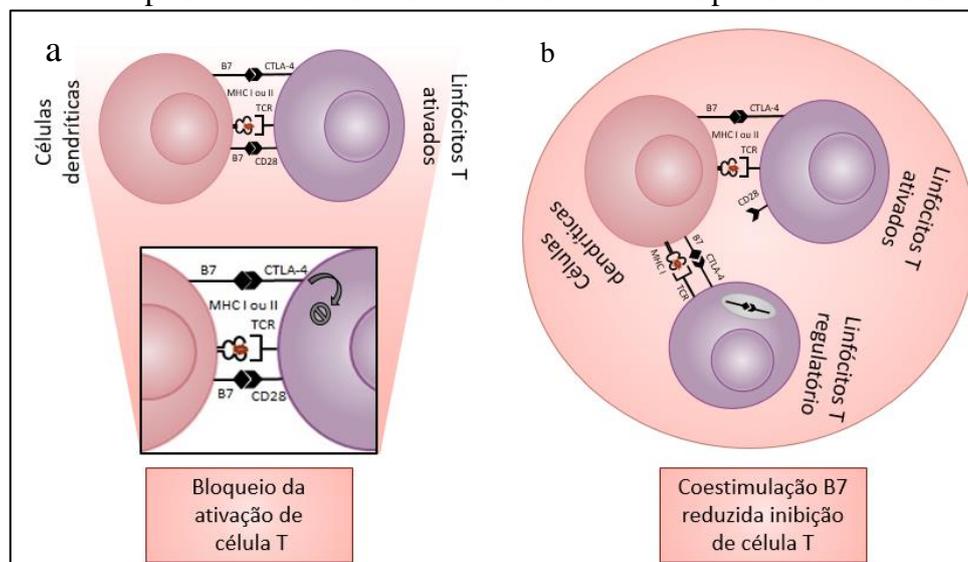
#### ***1.16.4 Importância da molécula CTLA-4***

A molécula de CTLA-4 é uma glicoproteína expressa tanto em células T CD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e Treg, sendo considerada o maior inibidor negativo da resposta de célula T (WALKER; SANSOM, 2011; GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006; BRUNNER-WEINZIERL; HOFF; BURMESTER,

2004). A molécula CD28 também é uma glicoproteína, no entanto, diferente de CTLA-4, exerce efeito coestimulatório sobre as funções de células T. Ambas as moléculas se ligam as proteínas B7-1 e B7-2, sendo CD28 constitutivamente expresso na superfície de células T, enquanto que CTLA-4 é rapidamente *up* regulado após a ativação, não sendo expressa em células T virgens. Após a ativação de células T, há um aumento contínuo na concentração intracelular de CTLA-4, sendo, em seguida, estocada em vesículas (WALKER; SANSOM, 2011; GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). Interessantemente, a expressão de CTLA-4 na superfície celular ocorre em baixos níveis (menos de 10% do total de CTLA-4) (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). As proteínas B7-1 e B7-2, nas APCs, também diferem quanto a cinética de expressão, B7-2 é constitutivamente expresso em baixos níveis e *up* regulado rapidamente e B7-1 é induzido um pouco depois de B7-2 (WALKER; SANSOM, 2011; GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). Outra diferença entre CD28 e CTLA-4 consiste na afinidade da ligação com seus ligantes, sendo a ligação de CTLA-4 com as moléculas B7 mais forte do que a ligação com CD28 (WALKER; SANSOM, 2011). A molécula de CTLA-4 parece funcionar através de alguns mecanismos, por exemplo, tem sido proposto que (1) a ligação de CTLA-4 com seu ligante B7 resultaria em uma sinalização inibitória direta; (2) a molécula de CTLA-4 poderia prevenir a ligação de CD28 com B7, resultando em menor ativação células T; nesse mecanismo as moléculas de CTLA-4 solúveis também seriam capazes de prevenir a ligação de CD28 com B7; (3) a ligação de CTLA-4 com B7 sobre as APCs resultaria em um sinal reverso sobre as APCs, induzindo a atividade de indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) que cataboliza o aminoácido triptofano localmente resultando em inibição da proliferação de células T; (4) a ligação de CTLA-4 com B7 nas APCs provocaria uma inibição da função da APCs mediada por citocinas produzidas pelas células CTLA-4<sup>+</sup>; (5) as células CTLA-4<sup>+</sup> promoveria a trans-endocitose do complexo CTLA-4-B7 (WALKER; SANSOM, 2011). Embora vários mecanismos tenham sido propostos, acredita-se que os sinais inibitórios de CTLA-4, que ocorrem quando as células T ativadas encontram com as moléculas B7 presentes na APCs, e a remoção das moléculas coestimulatória B7 pelas células Treg e células T ativadas sejam os principais mecanismos envolvidos com o bloqueio da resposta imunológicas de células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Dessa forma, as células T ativadas podem ser inibidas quando expressam moléculas de CTLA-4 na superfície celular, o que ocorre após 24-48 horas de sua ativação. Ademais, células Tregs e células T CTLA-4<sup>+</sup> podem, através da

captura de B7, impedir a ativação de células T virgens, limitando, assim, a resposta imunológica dessas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 7 – Principais mecanismos inibitórios desencadeados pelas moléculas CTLA-4.



Nota | (a) Acredita-se que os sinais inibitórios de CTLA-4 ocorrem quando as células T ativadas encontram com as moléculas B7 presentes na APCs; (b) A remoção das moléculas coestimulatórias B7 pelas células Treg e células T ativadas previne a ativação da resposta imunológica de células T.

### 1.17 Efeitos dos ITKs no sistema imunológico

Os ITKs (imatinibe, nilotinibe e dasatinibe) são utilizados para o tratamento da LMC e agem através da inibição da oncoproteína BCR-ABL (MELO; BARNES, 2007). Esses inibidores, no entanto, são capazes de inibir outras quinases que não o BCR-ABL e o perfil de inibição é diferente entre os diferentes ITKs (HANTSCHHEL, RIX, SUPERTI-FURGA, 2008). O imatinibe e o nilotinibe apresentam um perfil de inibição semelhante, sendo capazes de inibir ABL, ARG, BCR-ABL1, c-KIT, PDGFR- $\alpha$ , DDR1 e NQO2, já o dasatinibe apresenta uma faixa de inibição mais ampla, sendo capaz de inibir diversas proteínas da família SRC (FGR, FYN, SRC, YES, BLK, HCK, LCK, LYN), TEC (BMX, BTK, ITK, TEC, TXK) e SYK (SYK e ZAP-70) (HANTSCHHEL, RIX, SUPERTI-FURGA, 2008). Muitas dessas proteínas são importantes no contexto do sistema imunológico. Por exemplo, LCK, FYN, ITK e ZAP-70 são essenciais na sinalização de células T, enquanto LYN, SYK e BTK estão envolvidos na sinalização de células B (BRADSHAW, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Relatos prévios têm mostrado o potencial dos ITKs de modular o sistema imune. Dietz *et al.* (2004) têm mostrado, *in vitro*, que na faixa de dose utilizada

terapeuticamente o imatinibe foi capaz de inibir a proliferação de células T estimuladas com células dendríticas e com fitohemaglutinina. Além disso, tem sido mostrado, também, o potencial do imatinibe em inibir, de forma reversível, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de forma independente de APCs, sendo essa inibição associada a redução da produção de INF- $\gamma$  (CWYNARSKI *et al.*, 2004). De forma complementar, Leder *et al.* (2007) têm mostrado, em camundongos, uma redução da produção de INF- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na presença do imatinibe. Essas alterações não são restritas ao imatinibe e relatos também têm sido documentados com o dasatinibe e nilotinibe. Estudos prévios têm mostrado que o dasatinibe é capaz de inibir a proliferação, ativação e a produção de citocinas de células T (SCHADE *et al.*, 2008; WEICHSEL *et al.*, 2008). Já o nilotinibe foi relatado desempenhar um papel inibidor sobre a proliferação e produção de IFN- $\gamma$  em células T CD8<sup>+</sup> (CHEN *et al.*, 2008).

Outras alterações em células do sistema imune também têm sido relatadas com o uso dos ITKs, tais como: disfunções em células dendríticas, linfócitos B, linfócitos Treg e células NK (CARULLI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012; FEI *et al.*, 2009, 2010; LARMONIER *et al.*, 2008; SALIH *et al.*, 2010; SANTACHIARA *et al.*, 2008; SATO *et al.*, 2003). Como mostrado acima, as células NK, conhecidas pelo suas propriedades anticâncer (VIVIER *et al.*, 2012), parecem exercer um papel importante no sucesso da parada do tratamento com ITKs (ILANDER *et al.*, 2017; REA *et al.*, 2017). Até o momento, um número relativamente pequeno de estudos existe sobre a o papel dos ITKs sobre essas células NK, um deles publicado por Chen *et al.* (2012) tem mostrado defeitos quantitativos (expansão limitada) e funcionais (redução da degranulação em resposta as células K562) nas células NK em pacientes com LMC tratados com imatinibe. Além disso, um estudo anterior de Cebo *et al.* (2006) mostraram que o tratamento com imatinibe inibiu a via de ativação da NKG2D, um imunorreceptor de ativação, e que a modulação da NKG2D pelo imatinibe interferiu no reconhecimento e citólise das células NK. Em contraste com esses resultados, Salih *et al.* (2010) mostram que o imatinibe não exerceu influência direta na reatividade das células NK in vitro.

Assim como para o imatinibe, relatos prévios sobre a influência do dasatinibe sobre as células NK têm mostrado resultados controversos, enquanto que Salih *et al.* (2010) encontraram uma redução da citotoxicidade e produção de citocinas em células humanas e Fraser *et al.* (2009) uma redução da citotoxicidade de células NK em modelo animal in vivo, Hayashi *et al.* (2012) têm mostrado que as células NK de pacientes tratados com dasatinibe apresentam uma maior capacidade de matar células K562.

Salih *et al.* (2010) também avaliaram a influência do nilotinibe sobre células NK e encontram que, em altas concentrações, esse inibidor prejudicou a produção de citocinas de células NK. Além disso, Hayashi *et al.* (2012) reportaram que o nilotinibe diminuiu a citotoxicidade de células NK.

A despeito desses estudos avaliando a influência dos ITKs sobre a função de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e NK em pacientes com LMC, pouco se sabe a respeito da influência desses inibidores sobre receptores específicos presentes em células NK e célula T. Dada a importância demonstrada do sistema imunológico, sobretudo a importância de células NK e células T, no controle da LMC nos estudos de descontinuação do tratamento, nos propomos a avaliar a expressão do gene *NKp46*, o “*Natural Cytotoxicity Receptors*” (NCR) de células NK mais importante no reconhecimento e lise tumoral, e a expressão do gene *CTLA-4*, o maior regulador negativo das funções de linfócitos T, em pacientes com diferentes graus de resposta ao tratamento com diferentes ITKs, para, assim, verificarmos seu potencial como marcador de melhor resposta ao tratamento e a influência de cada inibidor na expressão desses genes. Ademais, afim de investigar o comportamento desses marcadores em pacientes com LMC, associamos a expressão gênica desses marcadores do sistema imunológico com diversos dados clínicos e laboratoriais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão gênica do receptor de citotoxicidade natural de células NK *NKp46* e do inibidor de *checkpoint* imunológico *CTLA-4* em pacientes com leucemia mieloide crônica tratados com diferentes inibidores de tirosina quinase.

### 2.2 Objetivo Específicos

- Determinar o perfil sociodemográfico (sexo e idade) dos pacientes com LMC e grupo controle;
- Determinar o perfil clínico-laboratorial (cariótipo, transcritos, escores de risco) dos pacientes com LMC;
- Investigar se há associação entre a expressão dos genes *NKp46* e *CTLA-4* de pacientes com LMC em tratamento com diferentes inibidores de tirosina quinase e com o grupo controle;
- Avaliar a possível correlação entre o nível de expressão dos genes *NKp46* e *CTLA-4* com o tempo de uso dos inibidores de tirosina quinase;
- Investigar a possível associação entre a expressão dos genes *NKp46* e *CTLA-4* de pacientes com LMC com os dados sociodemográficos e clínicos-laboratoriais;
- Comparar a expressão dos genes *NKp46* e *CTLA-4* entre pacientes com LMC em uso de diferentes inibidores de tirosina quinase, com diferentes níveis de resposta molecular e com o grupo controle.

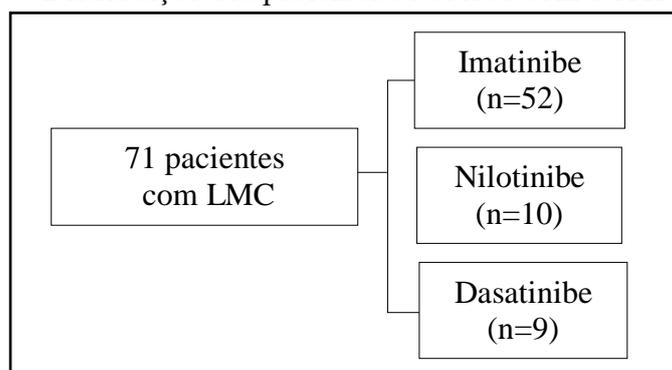
### 3 MATERIAIS E METODOS

#### 3.1 Casuística

Trata-se de um estudo de transversal com 71 pacientes adultos com diagnóstico clínico e molecular de LMC, sendo 52 pacientes em tratamento com imatinibe, 10 tratados com nilotinibe e 9 tratados com dasatinibe (QUADRO 3).

Além desses pacientes, 25 voluntários declaradamente saudáveis composto por alunos e funcionários provenientes da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram incluídos no estudo com grupo controle.

Quadro 3 – Distribuição dos pacientes de acordo com o ITK utilizado.



Legenda | Leucemia mieloide crônica (LMC); Inibidor de tirosina quinase (ITK).

Os pacientes foram provenientes do ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), estruturado no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Ceará (HEMOCE). Atualmente, o serviço atende em média 130 pacientes com LMC, estando a maior parte desses pacientes em uso de imatinibe (90 pacientes). Para os pacientes em uso de ITKs de 2ª geração, há uma distribuição muito semelhante com média de 20 pacientes para cada ITK (nilotinibe e dasatinibe). A Tabela 6 mostra a distribuição dos pacientes no serviço quanto ao tipo de ITK utilizado e o percentual obtido correspondente em cada grupo analisados no estudo.

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes no serviço quanto ao tipo de ITK utilizado e o percentual obtido correspondente a cada grupo analisados no estudo.

ITK	Serviço	Amostragem	Percentual (%)
Imatinibe	90	52	57,8
Nilotinibe	20	10	50
Dasatinibe	20	9	45
Total	130	71	54,6

Legenda | Inibidor de tirosina quinase (ITK).

As doses dos ITKs utilizadas pelos pacientes do estudo no momento da coleta é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 – Dose dos ITKs utilizada no momento da coleta.

ITK	N	N e percentual de pacientes em uso (%)		
		Dose habitual	Dose reduzida ou aumentada	Dose alternada
Imatinibe	52	49 (94,2)	2 (3,8) <sup>a</sup>	1 (2) <sup>b</sup>
Nilotinibe	10	7 (70%)	3 (30%) <sup>c</sup>	-
Dasatinibe	9	8 (88,9)	1 (11,1) <sup>d</sup>	-
Total	71	64 (90,1)	6 (8,4)	1 (1,5)

Nota | Dose habitual para o imatinibe 400 mg/dia; Dose habitual para o nilotinibe 800 mg/dia; Dose habitual para o dasatinibe 200 mg/dia. Legenda | <sup>(a)</sup> Dois pacientes utilizavam a dose de 300 mg/dia; <sup>(b)</sup> Um paciente utilizava dose alternada de 200/400 mg/dia; <sup>(c)</sup> Dois pacientes utilizavam dose de 400 mg/dia e um utilizava dose 200 mg/dia; <sup>(d)</sup> Um paciente utilizava a dose de 20 mg/dia.

### 3.2 Seleção da amostra

#### ➤ Pacientes:

Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos ( $\geq 18$  anos), voluntários, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e molecular de LMC em uso de ITKs, atendidos no ambulatório do serviço de hematologia do HUWC.

Critérios de Exclusão:

- Pacientes que foram submetidos a transfusão sanguínea nos últimos 6 meses;
- Pacientes com prontuários indisponíveis;
- Pacientes com diagnóstico de outra doença hematológica concomitante;
- Pacientes com doenças imunes (artrite reumatoide, diabetes tipo 1, doença celíaca, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico entre outros).

#### ➤ Grupo controle:

Critérios de Inclusão:

- Indivíduos saudáveis, voluntários, adultos, de ambos os sexos.

### 3.3 Local do estudo

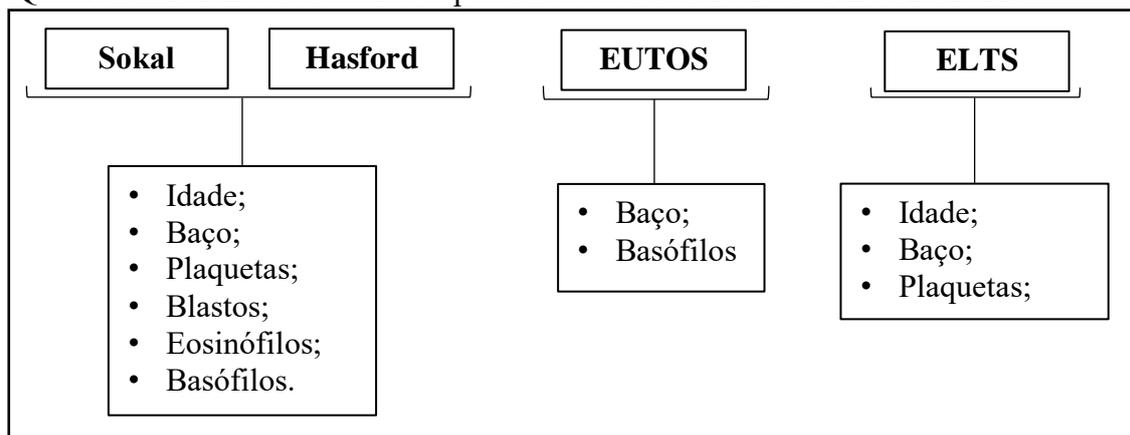
O estudo foi realizado no HEMOCE, onde foram coletadas amostras sanguíneas, no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) e no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde foram realizados o processamento das amostras e análises moleculares. Os outros dados laboratoriais e alguns dados clínicos foram obtidos a partir de prontuários médicos.

### 3.4 Coleta de amostras e dados

Foram selecionados aleatoriamente os pacientes atendidos pelo ambulatório do serviço de hematologia do HUWC no período de março de 2018 a agosto de 2019. Os pacientes foram abordados de forma aleatória no setor de coleta localizado no HEMOCE, onde os pacientes do serviço de hematologia do HUWC eram atendidos.

Para os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, foram colhidos 2 tubos de 4 mL de sangue periférico contendo EDTA como anticoagulante para quantificação da expressão dos genes *NKp46* (*NCRI*) e *CTLA-4*. Os dados clínicos e os demais dados laboratoriais, bem como as informações sobre a utilização dos ITKs foram obtidos dos prontuários médicos. As variáveis analisadas foram divididas em duas categorias, variáveis sociodemográficas (sexo, idade e dados sobre tabagismo e etilismo) e variáveis clínico-laboratoriais (expressão dos genes *NKp46*, *CTLA-4*, escores de risco Sokal, Hasford, EUTOS e ELTS, tempo de uso dos ITKs, transcritos do gene *BCR-ABL* no dia da coleta, cariótipo ao diagnóstico, resposta citogenética no dia da coleta, resposta molecular no dia da coleta, níveis de células sanguíneas no dia da coleta). As análises de expressão dos genes *NKp46*, *CTLA-4*, que fazem parte das variáveis clínico-laboratoriais, foram realizadas no LPHGDH, as demais variáveis clínico-laboratoriais foram provenientes dos prontuários médicos. Os respectivos parâmetros utilizados para o cálculo de cada score de risco são mostrados no Quadro 4.

Quadro 4 – Parâmetros utilizados para o cálculo dos escores de risco na LMC.



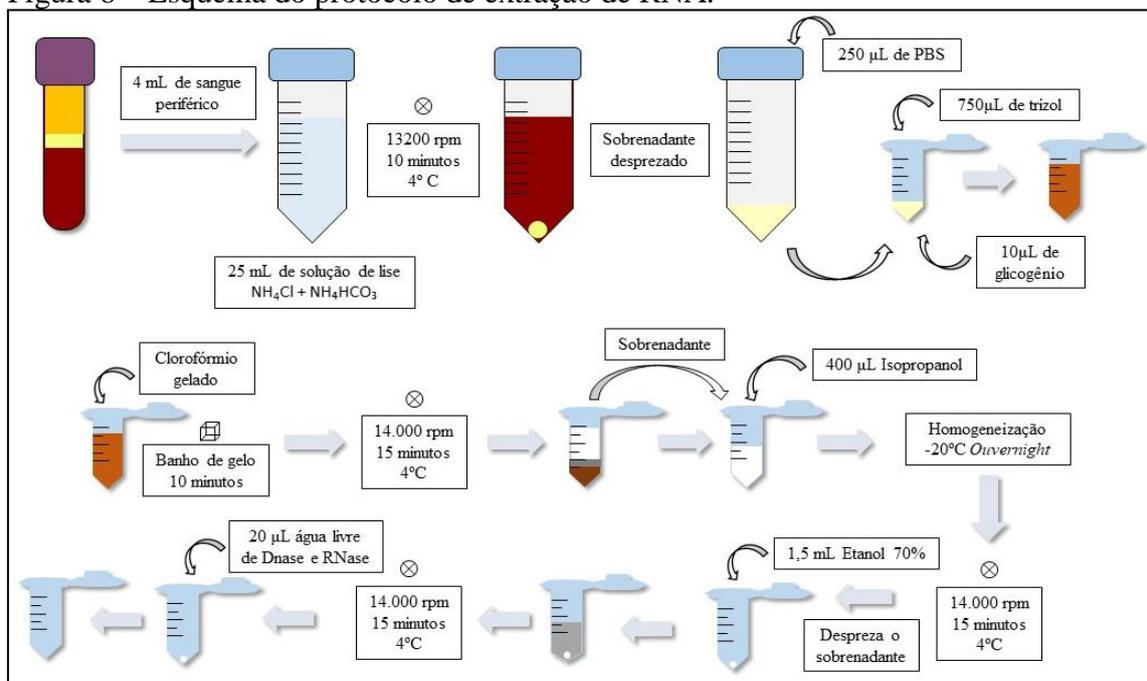
Legenda | Leucemia mieloide crônica (LMC); *European Treatment and Outcome Study* (EUTOS); EUTOS *long-term survival score* (ELTS). Nota | Para o cálculo dos escores de risco, os parâmetros devem ser coletados ao diagnóstico e antes de tratamento, o baço deve ser medido em centímetros abaixo do rebordo costal esquerdo. Fonte | Hasford *et al.* (1998; 2011); Pffirmann *et al.* (2016); Sokal *et al.* (1984).

### 3.5 Análises de expressão gênica

#### 3.5.1 Extração de RNA

Para a separação do *pool* celular do sangue periférico, foi realizada a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50 mL no qual foi adicionado solução de lise (25 mL de solução de cloreto de amônio 0,144 M e bicarbonato de amônio 0,01 M) para lisar as hemácias. O conteúdo foi homogeneizado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida, foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250 µL de PBS. Para a extração de RNA total, foi misturado 250 µL desse material com 750 µL guanidina isotiocianato (*Trizol LS Reagent®*) e 10 µL (20 ng/ml) de glicogênio em microtubos. Essa mistura foi mantida em banho de gelo por 10 minutos e, em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio gelado. O conteúdo foi homogeneizado em vórtex por ~30 segundos e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi retirado cuidadosamente o sobrenadante contendo RNA e transferido para novos microtubos. Nesses microtubos, foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado e, sem seguida, o material foi homogeneizado por inversão e mantido a -20°C *overnight* para a precipitação do RNA. Após a precipitação, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o pellet ressuspensão em 20µl de água livre de RNase. Os RNAs foram quantificados e congelados em freezer a -80°C. A figura 6 mostra o esquema com todas as etapas de extração de RNA.

Figura 8 – Esquema do protocolo de extração de RNA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.5.2 Quantificação do RNA

Para a quantificação do RNA, foi seguido o protocolo contido no manual do fabricante do reagente *Trizol LS Reagent*®. O RNA total obtido das amostras foi quantificado através de leitura em nanoespectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 µg/mL para 1 unidade de absorvância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão entre as absorvâncias ( $A_{260}/A_{280}$ ) obtidas com os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Amostras com razão entre 1,6 e 2,0 foram consideradas puras.

### 3.5.3 Síntese de cDNA

Foi utilizado cerca de 2000 ng do RNA extraído de cada amostra para a síntese de 20 µL cDNA. A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems*® (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems*®). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Após esse processo, as amostras de cDNA foram diluídas 5 vezes e armazenadas em freezer a -20° C até o momento das análises moleculares.

### 3.5.4 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

A quantificação da expressão dos 2 genes estudados e do gene de referência (TABELA 7) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no aparelho *CFX96 Real-time System* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) disponível no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT).

Tabela 8 – Lista dos genes que foram avaliados por qPCR.

Nome	Gene	Sonda TaqMan
$\beta$ 2-microglobulina	<i>B2M</i>	Hs99999907_m1
Receptor 1 desencadeador de citotoxicidade natural	<i>NKp46</i>	Hs00183118_m1
Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico	<i>CTLA-4</i>	Hs00175480_m1

As reações foram realizadas em placas transparentes de 96 poços utilizando-se o *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay®* com marcação FAM-MGB e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, dNTPs e tampão otimizado. O volume final de cada reação foi de 10  $\mu$ L, sendo 2  $\mu$ L de água, 5  $\mu$ L de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 0,5  $\mu$ L de sonda (*TaqMan Assay®*) e 2,5  $\mu$ L de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos (desnaturação) e 60° C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Todas as amostras (teste, controles normais e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas. Como controle de contaminantes da PCR foram incluídos na placa os NTCs (*no-templante controls*), no qual água foi adicionada no lugar do RNA. Para normalizar os dados de expressão dos genes que foram avaliados neste estudo o gene  *$\beta$ 2-microglobulina (B2M)* foi utilizado como gene de referência (YU *et al.*, 2017).

Na análise de PCR em tempo real, a quantificação é baseada no ciclo de quantificação (Cq), que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). O Cq é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis. Os resultados foram avaliados através da obtenção dos valores de Cq (ciclo

de quantificação). Ao final de cada corrida, os dados foram exportados para planilhas do software Excel® para o cálculo dos valores de  $\Delta Cq$ . A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no imatinibeQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009). Posteriormente, os resultados dos Cq para cada gene de estudo foram normalizados para cada amostra, subtraindo o valor da média do Cq do gene de referência, obtendo o valor de  $\Delta Cq$ , utilizado para o cálculo de valores de expressão ( $2^{\Delta Cq}$ ) (PFAFFL, 2001), segundo a formula abaixo:

$$2^{\Delta Cq} = \text{média do Cq do gene alvo} - \text{média do Cq do gene de referência.}$$

### 3.6 Aspectos éticos

Todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos a respeito do projeto e tiveram a liberdade para participar ou desistir a qualquer momento da pesquisa. Àqueles que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Os dados dos participantes da pesquisa foram mantidos em sigilo, bem como todas as informações contidas nos formulários utilizados pelos pesquisadores responsáveis. O projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC com número de parecer 6.066.725 (ANEXO A).

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Programa *GraphPad Prism 6.0*. Os testes realizados foram determinados de acordo com a normalidade dos dados usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Para as análises de dois grupos foi utilizado o teste de *Mann Whitney*, para as análises de 3 ou mais grupos foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de Correlação de *Spearman* e de *Pearson*. Quando presentes, os *outliers* foram excluídos das análises afim obter um grupo mais homogêneo. O nível de significância utilizado foi de 5% ( $\alpha \leq 0,05$ ) e foram considerados resultados estatisticamente significantes àqueles com valores de  $p < 0,05$ .

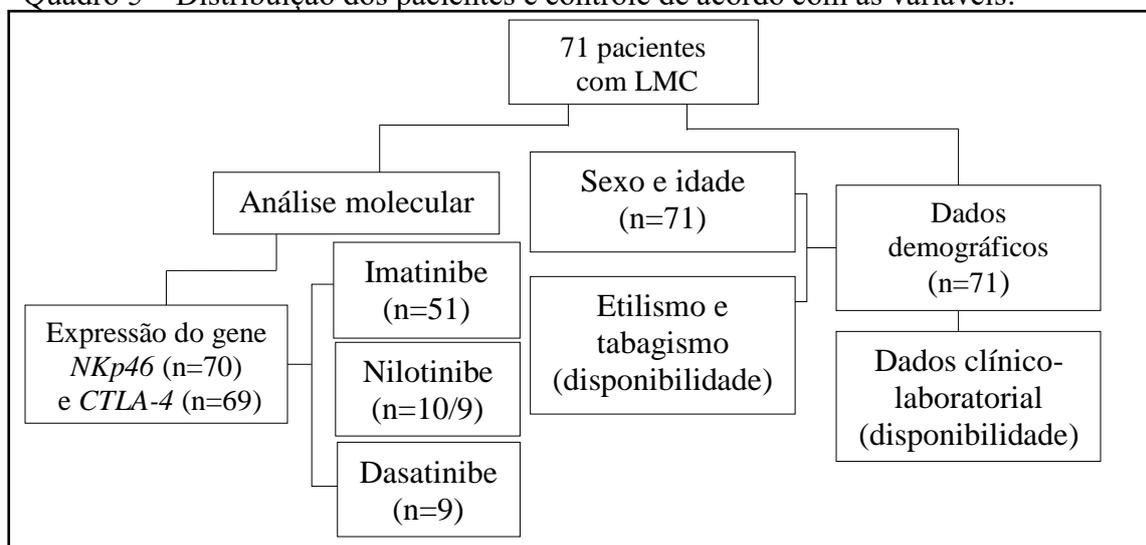
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais

A distribuição dos pacientes para as análises dos dados sociodemográficos, clínico-laboratoriais, bem como as análises moleculares foram realizadas de acordo com a disponibilidade dos dados em prontuários médicos e/ou critérios de elegibilidade (QUADRO 5).

A mediana e a amplitude de idade ao diagnóstico dos pacientes com LMC foi de 42 (12 – 92) anos. A mediana e a amplitude de idade no momento da coleta dos pacientes com LMC foi de 49 (19 – 94) anos e para os pacientes controles foi de 29 (21 – 67) anos. Setenta e um pacientes com diagnóstico clínico, hematológico e molecular de LMC foram avaliados. Destes 71 pacientes, 37 (52,1%) eram do sexo masculino, 34 (47,9%) eram do sexo feminino, 71 (100%) estavam em fase crônica da doença. Dos 25 controles, 6 (24%) do sexo masculino e 19 (76%) do sexo feminino.

Quadro 5 – Distribuição dos pacientes e controle de acordo com as variáveis.



Legenda | Leucemia mieloide crônica (LMC); fase crônica (FC). Nota | Para os dados clínico-laboratoriais, o número total limitou-se à disponibilidade dos dados nos prontuários médicos. A diferença observada entre o n total e o n para cada grupo dentro da análise de expressão gênica ocorreu devido a indisponibilidade de alguns dados. Para o grupo em uso de imatinibe, cujo n total é de 52, não houve disponibilidade de um dado para cada gene estudado. Para o grupo em uso de nilotinibe, não houve, também, disponibilidade de um dado de expressão gênica de *CTLA-4*.

Ao diagnóstico, 44 (62%) pacientes apresentaram citogenética típica apenas com a t(9;22), 6 (8,4%) pacientes apresentaram outra(s) alteração(ões) citogenética(s) além da translocação (9;22) e em 21 (29,6%) pacientes não foi possível essa avaliação por falta do referido exame nos prontuários. Para os pacientes sem esse dado no prontuário, o diagnóstico foi estabelecido por qPCR.

Quanto ao uso dos ITKs, 52 (73,2%) utilizavam imatinibe, 10 (14,1%) pacientes utilizavam nilotinibe e 9 (12,7%) dasatinibe. A distribuição dos pacientes quanto ao nível de resposta molecular alcançada no momento da coleta com os diferentes ITKs é mostrada na Tabela 8.

Tabela 9 – Perfil de resposta molecular alcançada pelos pacientes com diferentes ITKs no momento da coleta (n=71).

ITKs	Sem RMM	Com RMM	Com RMP	Sem classificação
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Imatinibe	14 (27)	15 (28,8)	15 (28,8)	8 (15,4)
Nilotinibe	1 (10)	2 (20)	7 (70)	0 (0)
Dasatinibe	0 (0)	4 (44,5)	2 (22,2)	3 (33,3)

Legenda | Inibidor de tirosina quinase (ITK), resposta molecular maior (RMM), resposta molecular profunda (RMP). Nota | A classificação de resposta alcançada considerada foi a do dia da coleta ou a data mais próxima da coleta. Pacientes sem classificação são aqueles cujo os dados não estavam disponíveis nos prontuários médicos.

Quanto ao tipo de transcrito do gene *BCR-ABL*, 17 pacientes (23,9%) expressavam o transcrito *b2a2*, 23 (32,4%) expressavam o transcrito *b3a2*, 13 (18,3%) expressavam ambos os transcritos *b2a2/b3a2*. Entre os pacientes que expressavam ambos os transcritos, um expressava, também, o transcrito *e1a2*. Dezoito pacientes (25,4%) não apresentaram esse dado nos prontuários médicos.

Os escores de risco Sokal, Hasford, ELTS e EUTOS foram calculados a partir dos dados disponíveis nos prontuários, sendo os pacientes classificados como risco alto, risco baixo e, adicionalmente, para os três primeiros sistemas de classificações, como risco intermediário. A Tabela 9 mostra a quantidade de pacientes com diferentes classificações de risco em diferentes escores de prognóstico.

Tabela 10 – Classificação de risco em diferentes escores de prognóstico (n=71).

Classificação	Sokal	Hasford	EUTOS	ELTS
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Baixo	23 (32,4)	32 (45,1)	53 (74,8)	22 (31)
Intermediário	19 (26,8)	21 (29,7)	-	23 (32,4)
Alto	20 (28,2)	9 (12,6)	9 (12,6)	17 (24)
Sem classificação	9 (12,6)	9 (12,6)	9 (12,6)	9 (12,6)

Legenda | *European Treatment and Outcome Study* (EUTOS); *The EUTOS long-term survival* (ELTS). Nota | Pacientes sem classificação são aqueles cujo os dados não estavam disponíveis nos prontuários médicos.



Tabela 11 – Comparação do tempo de uso em meses dos ITKs com a nível de expressão do gene *NKp46* e *CTLA-4*.

Parâmetros	Média	Média	<i>r</i>	<i>p</i> Valor
	(mínimo – máximo) Tempo médio (meses)	(mínimo – máximo) Expressão do gene		
<b>Tempo de uso em meses de ITK (<i>NKp46</i>)</b>				
Imatinibe	41,6 (1 – 141)	2017 (441 – 8561)	0,12	0,3892 <sup>a</sup>
Nilotinibe	83,5 (18 – 147)	3611 (268 – 8726)	-0,09	0,7986 <sup>b</sup>
Dasatinibe	84,3 (12 – 122)	1107 (348 – 2088)	-0,35	0,3494 <sup>b</sup>
ITKs	61,3 (1 – 201)	2128 (268 – 8726)	-0,02	0,8924 <sup>a</sup>
<b>Tempo de uso em meses de ITK (<i>CTLA-4</i>)</b>				
Imatinibe	43,9 (1 – 141)	2113 (360 – 9228)	0,27	0,0562 <sup>a</sup>
Nilotinibe	81,2 (18 – 147)	1346 (238 – 2469)	0,16	0,6893 <sup>b</sup>
Dasatinibe	84,3 (12 – 122)	1590 (445 – 2825)	0,02	0,9575 <sup>b</sup>
ITKs	61,3 (1 – 201)	1945 (238 – 9228)	0,12	0,3291 <sup>a</sup>

Legenda | Correlação de *Spearman* (a); Correlação de *Pearson* (b).

#### 4.3 Comparação do nível de expressão dos genes *NKp46* e *CTLA-4* em pacientes com LMC com parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais.

A Tabela 11 mostra a comparação das variáveis sociodemográficas e clínico-laboratoriais com o nível de expressão do gene *NKp46*. As análises mostram uma possível influência do escore de risco EUTOS na expressão do gene *NKp46*, mostrando que pacientes com risco alto apresentaram uma expressão estatisticamente maior do gene *NKp46* quando comparado com os pacientes de baixo risco ( $p=0,0386$ ). As demais variáveis não apresentaram diferença estatísticas com o nível de expressão do gene *NKp46*.

Tabela 12 – Comparação do nível de expressão do gene *NKp46* em pacientes com LMC com os parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais.

Variáveis	Média ou r	<i>p</i> Valor	Variáveis	Média ou r	<i>p</i> Valor
	Expressão de <i>NKp46</i>			Expressão de <i>NKp46</i>	
<b>Sexo</b>			<b>EUTOS</b>		
Masculino	1431	0,2871 <sup>a</sup>	Baixo	1489	<b>0,0386<sup>a</sup></b>
Feminino	1626		Alto	3288	
			PRCgC (18 meses)	0,04	0,7312 <sup>b</sup>
<b>Idade (Diagnóstico)</b>			<b>ELTS</b>		
Masculino	-0,16	0,3401 <sup>b</sup>	Baixo	1490	0,9753 <sup>c</sup>

Feminino	0,25	0,1156 <sup>b</sup>	Intermediário	1613	
Ambos	0,01	0,9271 <sup>b</sup>	Alto	1674	
<b>Idade (Coleta)</b>			<b>Transcritos</b>		
Masculino	-0,27	0,1137 <sup>b</sup>	<i>b2a2</i>	1423	0,7192 <sup>c</sup>
Feminino	0,15	0,3822 <sup>b</sup>	<i>b3a2</i>	1754	
Ambos	-0,04	0,6957 <sup>b</sup>	Ambos	1833	
<b>Tabagismo</b>			<b>Cariótipo</b>		
Fumantes	1341	0,1700 <sup>a</sup>	Sem ACA	1531	0,7624 <sup>a</sup>
Não fumantes	1737		ACA	1583	
<b>Etilismo</b>			<b>Resposta citogenética</b>		
Etilista	1539	0,8425 <sup>a</sup>	RCgC	1475	0,4192 <sup>a</sup>
Não etilista	1539		Sem RCgC	1790	
<b>Sokal</b>			<b>Resposta molecular</b>		
Baixo	1490	0,4977 <sup>c</sup>	Sem RM	1444	0,4487 <sup>c</sup>
Intermediário	1350		RMM	2206	
Alto	1884		RMP	1780	
<b>Hasford</b>			<b>Células sanguíneas</b>		
Baixo	1485	0,8351 <sup>c</sup>	Linfócitos	-0,15	0,2272 <sup>b</sup>
Intermediário	1918		Leucócitos	0,12	0,3419 <sup>b</sup>
Alto	2371				

Legenda | Teste de *Mann Whitney* (a); Correlação de *Spearman* (b); Teste de *Kruskal-Wallis* (c); Probabilidade de resposta citogenética em 18 meses (PRCgC); Anormalidade citogenética adicional (ACA); Resposta citogenética completa (RCgC); Resposta molecular (RM); Resposta molecular maior (RMM); Resposta molecular profunda (RMP). Nota | Para a realização dos testes estatísticos, os *outliers* foram excluídos das análises afim de obter um grupo mais homogêneo e minimizar possível influência de outras variáveis na expressão do gene *NKp46*.

Para avaliar a possível influência do tipo de tratamento no nível de expressão do gene *NKp46* e a possível influência da resposta molecular, analisamos uma série de comparações entre os diferentes grupos (TABELA 12).

Tabela 13 – Comparação do nível de expressão do gene *NKp46* entre pacientes com LMC em uso de diferentes ITKs, com e sem resposta molecular e com grupo controle.

Resposta molecular	n	Média (Mínimo – Máximo)	p Valor
		Expressão de <i>NKp46</i>	
<b>Controle x ≥RMM (ITKs)</b>			
Controle	23	1164 (618 – 1968)	<b>0,0072<sup>a</sup></b>
≥RMM	39	1790 (268 – 4928)	
<b>Controle x ≥RMM (GI)</b>			
Controle	23	1164 (618 – 1968)	<b>0,0028<sup>a</sup></b>
≥RMM (GI)	25	1793 (628 – 4392)	

<b>Controle x ≥RMM (GN)</b>			
Controle	23	1164 (618 – 1968)	<b>0,0022<sup>a</sup></b>
≥RMM (GN)	9	3042 (268 – 8146)	
<b>Controle x ≥RMM (GD)</b>			
Controle	23	1164 (618 – 1968)	0,3117 <sup>a</sup>
≥RMM (GD)	6	956,4 (348 – 1481)	
<b>Controle x &lt;RMM (GI)</b>			
Controle	23	1164 (618 – 1968)	0,1210 <sup>b</sup>
<RMM (GI)	14	1444 (441 – 3221)	
<b>RMM (GI) x RMP (GI)</b>			
RMM (GI)	14	2526 (841 – 5756)	0,3470 <sup>a</sup>
RMP (GI)	13	1595 (628 – 2738)	
<b>≥RMM (GI) x ≥RMM (GN)</b>			
≥RMM (GI)	25	1793 (628 – 4392)	0,0936 <sup>a</sup>
≥RMM (GN)	9	3042 (268 – 8146)	
<b>≥RMM (GI) x ≥RMM (GD)</b>			
≥RMM (GI)	25	1793 (628 – 4392)	<b>0,0099<sup>a</sup></b>
≥RMM (GD)	6	956,4 (348 – 1481)	
<b>≥RMM (GN) x ≥RMM (GD)</b>			
≥RMM (GN)	9	3042 (268 – 8146)	<b>0,0176<sup>a</sup></b>
≥RMM (GD)	6	956,4 (348 – 1481)	

Legenda | Grupo imatinibe (GI); Grupo nilotinibe (GN); Grupo dasatinib (GD); Teste de *Mann Whitney* (a); Teste de T não pareado (b); Resposta molecular maior (RMM); Resposta molecular profunda (RMP).  
Nota | Para a realização dos testes estatísticos, os *outliers* foram excluídos das análises afim de obter um grupo mais homogêneo e minimizar possível influência de outras variáveis na expressão do gene *NKp46*.

A Tabela 12 mostra que a >RMM pode exercer alguma contribuição no aumento da expressão do gene *NKp46*, pelo menos para os pacientes em uso de imatinibe e nilotinibe e que, para os pacientes em uso de imatinibe, o nível de resposta molecular além da RMM parecer não exercer uma contribuição adicional na expressão do gene *NKp46*.

A comparação do nível de expressão do gene *CTLA-4* em pacientes com LMC com os parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais é mostrada na Tabela 13. Nossos resultados mostraram um nível de expressão do gene *CTLA-4* maior em pacientes com LMC com RCgC ( $p=0,0230$ ). Além disso, nossas análises revelaram um aumento na média de expressão do gene *CTLA-4* em pacientes com níveis crescentes de resposta molecular (RM), no entanto, como observado no Gráfico 2.1, com teste de *Kruskal-Wallis*, evidenciamos uma diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos sem RMM e RMP ( $p<0,05$ ).

Tabela 14 – Comparação do nível de expressão do gene *CTLA-4* em pacientes com LMC com os parâmetros sociodemográficos e clínico-laboratoriais.

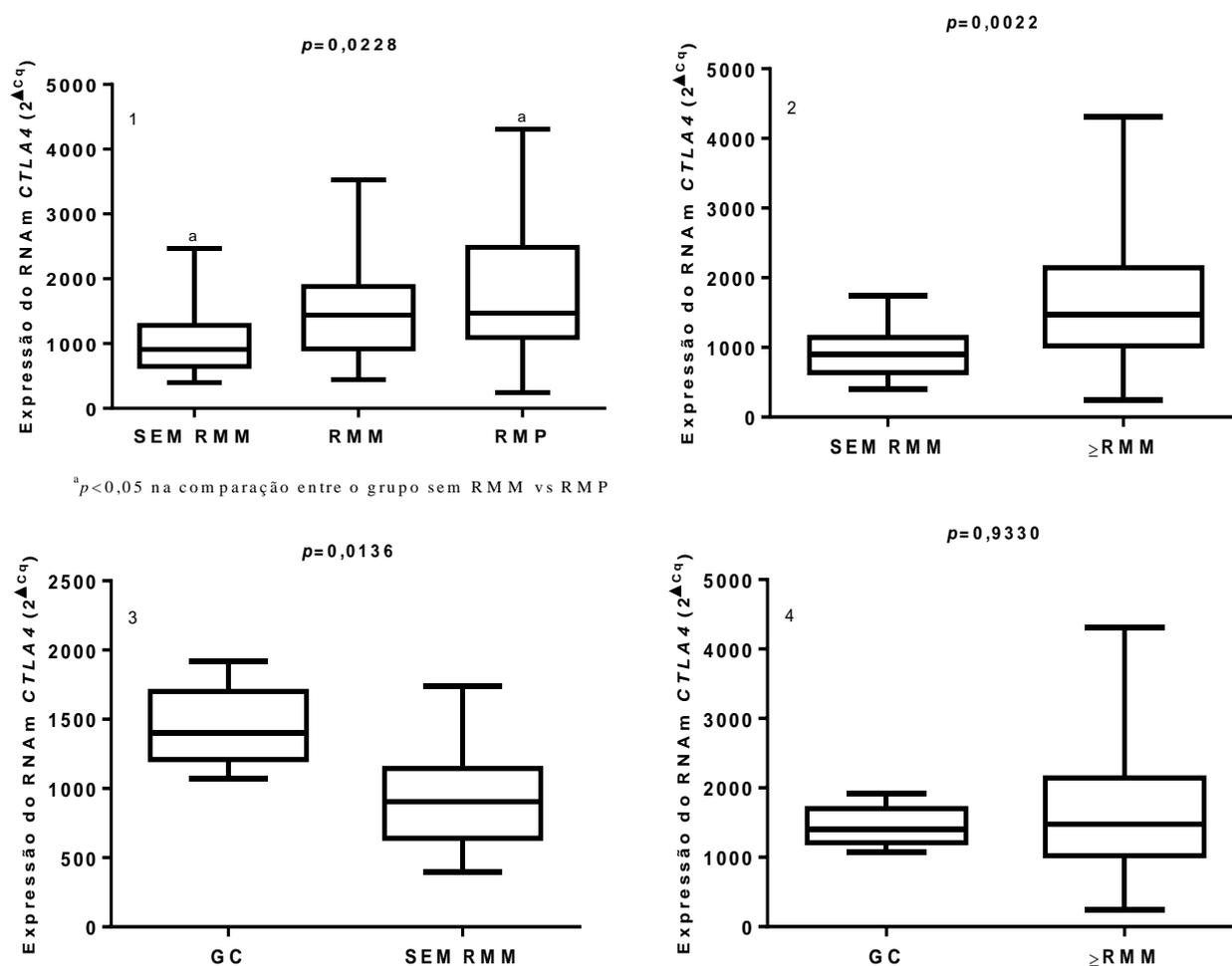
Variáveis	Média ou r		Variáveis	Média ou r	
	Expressão de <i>CTLA-4</i>	<i>p</i> Valor		Expressão de <i>CTLA-4</i>	<i>p</i> Valor
<b>Sexo</b>			<b>EUTOS</b>		
Masculino	1769	0,0987 <sup>a</sup>	Baixo	1245	0,3485 <sup>d</sup>
Feminino	2126		Alto	1378	
			PRCgC (18 meses)	0,05	0,6807 <sup>b</sup>
<b>Idade (Diagnóstico)</b>			<b>ELTS</b>		
Masculino	0,00	0,9828 <sup>b</sup>	Baixo	1127	0,4859 <sup>c</sup>
Feminino	0,23	0,1937 <sup>b</sup>	Intermediário	1459	
Ambos	0,12	0,3213 <sup>b</sup>	Alto	1340	
<b>Idade (Coleta)</b>			<b>Transcritos</b>		
Masculino	-0,07	0,6580 <sup>b</sup>	<i>b2a2</i>	1327	0,3800 <sup>c</sup>
Feminino	0,31	0,0706 <sup>b</sup>	<i>b3a2</i>	1404	
Ambos	0,11	0,3503 <sup>b</sup>	Ambos	1771	
<b>Tabagismo</b>			<b>Cariótipo</b>		
Fumantes	1573	0,6953 <sup>a</sup>	Sem ACA	971,1	0,1812 <sup>a</sup>
Não fumantes	1532		ACA	1682	
<b>Etilismo</b>			<b>Resposta citogenética</b>		
Etilista	1472	0,5811 <sup>a</sup>	RCgC	1679	<b>0,0230<sup>a</sup></b>
Não etilista	1553		Sem RCgC	1085	
<b>Sokal</b>			<b>Resposta molecular</b>		
Baixo	1566	0,7263 <sup>c</sup>	Sem RM	1045	<b>0,0228<sup>c</sup></b>
Intermediário	1220		RMM	1443	
Alto	1311		RMP	1878	
<b>Hasford</b>			<b>Células sanguíneas</b>		
Baixo	1503	0,2847 <sup>c</sup>	Linfócitos	-0,03	0,7779 <sup>b</sup>
Intermediário	1513		Leucócitos	0,14	0,2526 <sup>b</sup>
Alto	1025				

Legenda | Teste de *Mann Whitney* (a); Correlação de *Spearman* (b); Teste de *Kruskal-Wallis* (c); Teste T não pareado (d); Probabilidade de resposta citogenética em 18 meses (PRCgC); Anormalidade citogenética adicional (ACA); Resposta citogenética completa (RCgC); Resposta molecular (RM); Resposta molecular maior (RMM); Resposta molecular profunda (RMP). Nota | Para a realização dos testes estatísticos, os *outliers* foram excluídos das análises afim de obter um grupo mais homogêneo e minimizar possível influência de outras variáveis na expressão do gene *CTLA-4*.

Ao juntarmos os grupos com RMM e RMP ( $\geq$ RMM) e compararmos com os pacientes sem RMM, observamos que a diferença entre o grupo sem RMM e com  $\geq$ RMM se manteve (GRÁFICO 2.2). Além disso, ao compararmos os pacientes sem RMM com

o GC foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes ( $p=0,0136$ ) (GRÁFICO 2.3). Em contraste com as análises do Gráfico 2.3, a comparação entre os pacientes com  $\geq$ RMM e o GC presente no Gráfico 2.4, indicando que o nível de expressão do gene *CTLA-4* pode ter sido restaurado com a  $\geq$ RMM, uma vez que nenhuma diferença foi encontrada.

Gráfico 2 – Expressão do gene *CTLA-4* em pacientes sem RMM e com diferentes graus de resposta molecular e grupo controle.



Legenda | Grupo controle (GC); Resposta molecular maior (RMM); Resposta molecular profunda (RMP); RMM + RMP ( $\geq$ RMM). Gráfico 2.1 – Expressão dos genes *CTLA-4* em pacientes sem RMM, com RMM e com RMP. Gráfico 2.2 – Expressão dos genes *CTLA-4* em pacientes sem RMM e com  $\geq$ RMM. Gráfico 2.3 – Expressão dos genes *CTLA-4* no GC e em pacientes sem RMM. Gráfico 2.4 – Expressão dos genes *CTLA-4* no GC e em pacientes  $\geq$ RMM. Nota | Para a realização do teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*, os *outliers* foram excluídos da análise afim obter um grupo mais homogêneo e minimizar possível influência de outras variáveis na expressão do genes *CTLA-4*. Os dados no gráfico representam a mediana e intervalo interquartil em cada grupo.

## 5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *NKp46* foi maior nos pacientes que utilizavam nilotinibe. Além disso, nenhuma correlação com o tempo de uso de ITK foi encontrada, sugerindo que o nilotinibe parecer modular positivamente a expressão do gene *NKp46* de uma maneira tempo-independente. Em contraste com as análises do gene *NKp46*, o nível de expressão do gene *CTLA-4* não se alterou com o tipo de ITK utilizado. A  $\geq$ RMM também parece exercer alguma contribuição no aumento da expressão do gene *NKp46*, pelo menos para os pacientes em uso de imatinibe e nilotinibe. Para o grupo em uso de imatinibe, a comparação entre pacientes com RMM e RMP foi analisada, mostrando que o nível de resposta molecular além da RMM parecer não exercer uma contribuição adicional na expressão do gene *NKp46*. Para o gene *CTLA-4*, um menor nível de expressão foi observado nos pacientes sem RMM, enquanto que para os pacientes com  $\geq$ RMM o nível de expressão parece ser restaurado a níveis normais, semelhante ao encontrado no GC. Um padrão de expressão semelhante foi encontrado em pacientes com e sem RCgC. Além disso, a expressão do gene *NKp46* quanto ao escore de risco EUTOS foi avaliada, mostrando que pacientes de alto risco apresentam maior expressão do gene ( $p=0,0386$ ).

Em nosso estudo, a mediana de idade dos pacientes com LMC ao diagnóstico foi de 42 anos, muito semelhante ao encontrado nas casuísticas nacionais que têm mostrado uma mediana de idade variando de 40 a 46 anos (BANDEIRA *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2006; FUNKE *et al.*, 2005; LORAND-METZE *et al.*, 2005). Em casuísticas internacionais, a mediana de idade variou de 47 a 55 anos, discretamente maior ao encontrado em nosso estudo (BENELUX CML STUDY GROUP, 1998; BONIFAZI *et al.*, 2001; HASFORD *et al.*, 1998; HEHLMANN *et al.*, 2003; KANTARJIAN *et al.*, 2006). Alguns trabalhos internacionais, sobretudo os mais antigos, têm mostrado uma mediana de idade ao diagnóstico de 7 – 9 anos maior em comparação aos trabalhos nacionais, nós hipotetizamos que as limitações no estabelecimento do diagnóstico em diferentes épocas e regiões poderiam ser responsáveis por atrasos no diagnóstico e, conseqüentemente, na idade mais elevada observada nesses trabalhos. Quanto a proporção da doença entre os sexos, nosso trabalho mostrou uma maior frequência no sexo masculino, corroborando com os dados publicados em outros estudos (BENELUX CML STUDY GROUP, 1998; BONIFAZI *et al.*, 2001; HASFORD *et al.*, 1998; HEHLMANN *et al.*, 2003).

A proporção de algumas variáveis clínico-laboratoriais, tais como o cariótipo e o tipo de transcrito, também estão de acordo com os dados publicados na literatura. Jabbuor, Kantarjian, (2022) têm mostrado que a proporção de pacientes com alterações adicionais além da translocação t(9;22) é de 5%, semelhante aos 8,4% encontrado em nosso estudo. Nossos resultados também têm mostrado uma maior proporção de pacientes expressando o transcrito *b3a2*, esse achado corrobora com os dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando uma maior proporção desses transcritos na mesma população e em outras (DE ALMEIDA FILHO *et al.*, 2019). A distribuição de frequência dentro da estratificação de risco dos diferentes escores, Sokal, Hasford, EUTOS e ELTS, são diferentes entre os trabalhos na literatura, sugerindo que tal variável se distribui de forma aleatória em cada população estudada (BENELUX CML STUDY GROUP, 1998; BONIFAZI *et al.*, 2001; HEHLMANN *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2013; PFIRRMANN *et al.*, 2020). Ademais, as estratificações de risco dependem de parâmetros do diagnóstico, que podem variar a depender do tempo para o estabelecimento do diagnóstico, que é diferente para cada paciente, explicando, assim, as diferentes proporções encontradas nos diferentes trabalhos.

Na LMC, fatores associados ao sistema imunológico têm ganhado importância devido a possível relação com RLT sustentada (REA *et al.*, 2017; ILANDER *et al.*, 2017). Nesse cenário, a células NK têm ganhado destaque, uma vez que os pacientes com percentual aumentado de células NK no momento da interrupção do medicamento tiveram maior probabilidade de permanecer em remissão (ILANDER *et al.*, 2017). Essas células apresentam um importante receptor de ativação conhecido como receptor de citotoxicidade natural (NCR), NCR1 (NKp46), NCR2 (NKp44), NCR3 (NKp30), sendo o NKp46 o mais importante receptor de citotoxicidade nas células NK (SIVORI *et al.*, 1999; BARROW; MARTIN; COLONNA, 2019). Na LMC, pouco se sabe a respeito da influência dos ITKs sobre a expressão do gene *NKp46*. Nosso estudo tem mostrado uma maior expressão desse gene nos pacientes em uso de nilotinibe em comparação com o GC e com os pacientes em uso de dasatinibe, no entanto não houve diferença com o grupo em uso de imatinibe. Nós hipotetizamos que o nilotinibe pode, pelo menos em parte, aumentar a expressão do gene *NKp46* e, mesmo tendo um espectro de inibição proteico semelhante ao do imatinibe, parecer ser dotado de efeitos adicionais que não estão presentes nos outros ITKs. Ademais, nenhuma correlação com o tempo de uso de ITK foi encontrada, sugerindo que o nilotinibe parecer modular positivamente a expressão do gene *NKp46* de uma maneira tempo-independente. Em contraste com nossos

achados, dados preliminares de um pequeno estudo publicado por Binotto *et al.* (2014) têm mostrado um aumento da expressão proteica dos três receptores de citotoxicidade natural em pacientes com LMC tratados com imatinibe. Nós sugerimos que essa diferença pode advir de vários fatores que poderiam influenciar o sistema imunológico, tais como: comorbidades de caráter inflamatório, doenças autoimunes e uso de anti-inflamatórios. Naturalmente, por se tratar de amostras biológicas humanas, os resultados de Binotto *et al.* (2014) podem ter sofrido influência de alguns desses fatores, uma vez que tem reportado presença de 6 pacientes com doenças imunológicas num total de 25 pacientes em uso de imatinibe.

Tem sido reportado na literatura que a proporção aumentada de células NK associada a resposta TH1 de células T CD4<sup>+</sup> e o auxílio de células T CD8<sup>+</sup> foi encontrado em pacientes que conseguiram manter a RLT após a interrupção do imatinibe, sugerindo, assim, que esse perfil pode exercer algum papel no controle da LMC (ILANDER *et al.*, 2017; imatinibeZOGUCHI *et al.*, 2013; OHYASHIKI *et al.*, 2012). Dada a importância dessas células, avaliamos, em nosso estudo, a expressão do gene *CTLA-4*, que codifica um receptor inibitório encontrado em células T (células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e, mais recentemente, Treg), células B e monócitos (KRUMMEL, ALLISON, 1995; LEVINGS, SANGREGORIO, RONCAROLO, 2001; WANG *et al.*, 2002). Diferente do gene *NKp46*, nossos resultados mostraram que o tratamento com diferentes ITKs e tempo de uso de ITK não exerceu qualquer influência sobre a expressão gênica de *CTLA-4*.

Avaliamos, também, a possível relação entre a expressão desses genes com as variáveis sociodemográficas e clínico-laboratoriais. No entanto, a comparação do nível de expressão do gene *NKp46* com essas variáveis não apresentou diferença estatística, exceto na comparação com escore EUTOS. Apesar da diferença estatística encontrada entre os grupos de baixo risco e alto risco, acreditamos que esse resultado seja espúrio e represente uma limitação do nosso estudo, uma vez que, com a estratificação de risco no escore EUTOS, a maioria dos pacientes são classificados como de baixo risco, tornando o grupo de alto risco pequeno. Ademais, por essa limitação, não conseguimos estratificar os pacientes quanto aos ITKs, podendo esse ser um fator influenciador responsável pela diferença encontrada.

O nível de expressão do gene *NKp46* não apresentou diferença estatística entre os pacientes com e sem resposta molecular. No entanto, ao estratificarmos os pacientes quanto ao ITK utilizado e os comparamos entre eles e com o grupo controle, encontramos alguns resultados interessantes. Nossos resultados mostraram que a  $\geq$ RMM

pode contribuir, para uma maior expressão do gene *NKp46* para o grupo em uso de imatinibe e nilotinibe. Hantschel, Rix, Superti-Furga, (2008) têm mostrado um perfil semelhante de inibição proteica desses dois ITKs, o que poderia explicar o comportamento semelhante no que diz respeito a expressão do gene *NKp46*. Apesar de semelhantes, nilotinibe parece exercer uma modulação positiva mais pronunciada, sugerindo efeitos adicionais que não estariam presentes nos outros ITKs. Um estudo publicado por Hughes *et al.* (2017) têm mostrado que o sistema imunológico é restaurado com a RMM ou RM4,5. Hughes *et al.* (2017) compararam pacientes ao diagnóstico, pacientes com a RMM ou RM4,5 e um grupo controle, demonstrando que diversos marcadores de resposta imunológica estavam suprimidos ao diagnóstico, mostrando, assim, que mecanismos fisiopatológicos no início da doença podem induzir imunossupressão. Entre os marcadores do sistema imunológico restaurados com a RMM e RM4,5 reportado por Hughes *et al.* (2017) está o receptor de ativação *NKp46*, o que reforça nossos achados de que a >RMM contribui para um melhor perfil de expressão do gene *NKp46*. Interessantemente, o estudo de publicado por Hughes *et al.* (2017) não incluiu análises da influência dos ITKs na expressão de *NKp46*, e nosso trabalho é pioneiro em mostrar a contribuição dos ITKs na expressão desse importante receptor de citotoxicidade. Embora não tenha sido encontrado diferença estatística com o grupo controle, dasatinibe apresentou menor média de expressão do gene *NKp46*. Hantschel, Rix, Superti-Furga, (2008) têm mostrado que dasatinibe inibe diversas proteínas, algumas envolvidas com a resposta imunológica, tais como TEC, BMX, BTK, dessa forma é possível que, devido seu amplo espectro de inibição, dasatinibe seja o ITK com o maior potencial de imunossupressão.

A importância do receptor *NKp46* em malignidades hematológicas tem sido reportada por Costello *et al.* (2002,2012) e Fauriat *et al.* (2007), mostrando que a expressão diminuída de *NKp46* tem sido associada à menor citotoxicidade dessas células na leucemia mieloide aguda (LMA) e na leucemia linfocítica crônica (LLC). Em nosso estudo, apesar de não termos realizado testes de citotoxicidade, tem sido mostrado o efeito benéfico de alguns dos diferentes ITKs e da >RMM na expressão do gene *NKp46* o que, em tese, poderia conferir uma proteção adicional aos pacientes em uso desse fármaco, uma vez que, o aumento da expressão gênica e, conseqüentemente, do receptor *NKp46* pode estar ligada ao aumento da citotoxicidade de células NK.

Para o gene *CTLA-4*, foi evidenciado uma menor expressão em pacientes sem RMM e em pacientes sem RCgC. O baixo nível de expressão do gene *CTLA-4* nos

pacientes sem RMM pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos achados publicados no estudo Pistillo *et al.* (2003) que têm mostrado baixa quantidade de RNAm de *CTLA-4* em células com alta expressão de CTLA-4 de superfície, sugerido um rápido processamento e tradução do RNAm e consequente expressão da proteína CTLA-4 de superfície. Outro mecanismo envolvido pode estar relacionado a uma *down* regulação do RNAm de *CTLA-4delTM* em células ativadas, uma forma alternativa da proteína que não apresenta a região transmembrana, sendo conhecida como CTLA-4 solúvel (sCTLA-4) (MAGISTRELLI *et al.*, 1999).

Apesar de não termos comparado a expressão do gene *CTLA-4* em pacientes ao diagnóstico, é possível que o nível de expressão do gene *CTLA-4* nesses pacientes seja semelhante ou ainda mais baixo do que o encontrado em nosso estudo para pacientes sem RMM, uma vez que, ao diagnóstico, há uma grande carga leucêmica. De fato, no estudo de Hughes *et al.* (2017) a maioria dos fatores associados a resposta imunológica avaliada no estudo foram semelhantes em pacientes ao diagnóstico e em pacientes pré-RMM (sem RMM), sendo restaurados na medida em que alcançavam melhores respostas moleculares, atingindo restauração máxima com o alcance de RM4,5. De forma semelhante, ao compararmos os pacientes com LMC com >RMM com o GC não evidenciamos diferença estatística, no entanto a comparação entre pacientes sem RMM e o GC mostrou níveis de expressão estatisticamente inferiores em pacientes sem RMM, sugerindo que os níveis de expressão do gene *CTLA-4* são restaurados com o alcance de melhores RMs. Interessantemente, o estudo publicado por Brück *et al.* (2018) têm demonstrado uma elevada expressão da proteína CTLA-4 de superfície em pacientes com LMC ao diagnóstico, o que pode, por extrapolação, significar um aumento de CTLA-4 de superfície em pacientes sem RMM, visto que representam um grupo intermediário e com considerável carga leucêmica, assim como encontrado nos pacientes ao diagnóstico. Tomados juntos, esses dados podem explicar, pelo menos em parte, a presença de um sistema imunológico disfuncional associado ao início da doença e que podem perdurar até que o alcance de RMP. A saber, ao diagnóstico, as células T CD8<sup>+</sup> apresentam expansão, toxicidade e produção de citocinas limitada, aumento da expressão de PD1, outro inibidor da função de células T, em células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, aumento da população de células Treg (células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) e aumento no número de monócitos MDSC (células supressoras derivadas mielóide), todos restaurados em pacientes com RMM ou RM4,5 (HUGHES *et al.*, 2017; REUBEN *et al.*, 2000). Nossos dados também demonstraram uma maior expressão do gene *CTLA-4* em paciente com RCgC, no entanto

esse resultado não estabelece necessariamente uma relação entre esse nível de resposta alcançado e o nível de expressão do gene *CTLA-4*, uma vez que a maioria dos pacientes com RCgC também apresentavam  $\geq$ RMM.

Evidências da importância de CTLA-4 na LMC tem sido demonstrada no estudo com pCDs que expressam ligantes de CTLA-4 (CD86 ou B.7) (SCHÜTZ *et al.*, 2017). As pCD são capazes de exercer efeitos duais sobre o sistema imunológico, podendo induzir a expansão de células Th1 CD4<sup>+</sup>, Th2 CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de memória e virgens ou, ainda, exercer efeitos supressores e tolerogênicos através da indução de anergia de células T CD4<sup>+</sup>, produção prejudicada de IL-2 e IFN- $\gamma$ , produção de IL-10 e indução de células Treg (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2023). Na LMC, essas células parecem exercer feitos supressores, uma vez que os dados publicados de Schütz *et al.* (2017) têm demonstrado que pacientes com altas contagens de pCD CD86<sup>+</sup> tiveram maior risco de recaída depois da descontinuação com ITK e correlação com um perfil de exaustão (mensurado pela expressão de PD-1) de células T CD8<sup>+</sup> específicas da leucemia. Dessa forma, Schütz *et al.* (2017) tem sugerido 3 mecanismos supressores envolvendo pCD CD86<sup>+</sup>: (1) as pCD CD86<sup>+</sup> que através da ligação do CTLA-4, presentes em célula T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, com CD86, presente em pCD, poderia restringir a ativação de células T; (2) promoção da manutenção e tolerância induzida por células Treg (que expressam CTLA-4 de forma constitutiva) e (3), em um cenário de coestimulação crônica, promover exaustão de células T. Embora o estudo que Schütz *et al.* (2017) não tenham avaliado células NK, um importante componente celular do sistema imunológico também envolvido no controle da doença após descontinuação dos ITKs, é possível que as pCD CD86<sup>+</sup> possam exercer algum efeito supressor sobre essas células, uma vez que as células NK também expressam CTLA-4. Os dados publicados por Esen, Deniz e Aktas (2021) têm mostrado que células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup> (menos madura) apresentam maiores níveis de PD-1, CTLA-4, ambos associados a maior produção de IL-10 e menor de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , granzimas A e perforinas. Interessantemente, Rea *et al.* (2017) mostraram que o perfil citotóxico de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (mais maduras) de pacientes com LMC estavam aumentados em pacientes que não apresentaram recaída da doença no momento da descontinuação do tratamento com imatinibe. Esses dados despertam para o envolvimento de várias células e moléculas que podem interagir e promover o controle ou permitir a recaída da doença. Embora as diferenças entres os pacientes que permitem o controle ou a recaída da doença seja desconhecido, essas vias de interações podem ser importantes como estratégias terapêuticas futuras.

Em suma, nossos dados mostram um melhor desempenho do nilotinibe em *up* regular a expressão de *NKp46* em paciente com LMC em fase crônica da doença, o que pode representar um efeito benéfico adicional desse medicamento, uma vez que *NKp46* é um importante receptor de citotoxicidade de células NK. Ademais, evidenciamos, em nosso estudo, uma restauração da expressão gênica de *CTLA-4* em pacientes com melhores RMs ao tratamento com ITKs, no entanto nenhum benefício adicional foi notado em pacientes em uso de diferentes ITKs. Destacamos que o sistema imunológico é composto por diversas células e moléculas que trabalham de forma conjunta para nos proteger, mas que podem ser modulados por diferentes doenças. Na LMC, muitos marcadores da resposta imunológica parecem ser restaurados com o alcance de melhores RMs, no entanto não são suficientes para eliminar as células tronco leucêmica ou, pelo menos, controlar a doença. Isso é verdade para uma parte dos pacientes, podendo existir mecanismos supressores/de escape do sistema imunológico que podem estar envolvidos na recaída de pacientes após a descontinuação do tratamento com ITKs. Nesse contexto, a ligação de *CTLA-4* em células T CD4<sup>+</sup> T CD8<sup>+</sup> e NK com as moléculas de *CD86* presentes, por exemplo, em células pCD, pode representar um importante mecanismo supressor e sua inibição com fármacos tais como, ipilimumabe, abre perspectivas para uma nova abordagem no controle da doença.

## 6 CONCLUSÃO

- No que diz respeito ao perfil sociodemográfico, nosso estudo apontou uma maior frequência sexo masculino entre os pacientes com LMC e uma maior frequência do sexo feminino no GC. Em ambos os grupos, LMC e GC, diversas faixas etárias foram observadas, no entanto o grupo com LMC foi caracterizado por indivíduos mais velhos.
- Quanto ao perfil dos pacientes em relação aos dados clínicos-laboratoriais (cariótipo, transcritos e escores de risco), a maioria dos pacientes apresentaram alterações citogenéticas típicas (cromossomo Ph) da LMC, o transcrito *b3a2* foi o mais prevalente e nos escores Sokal, Hasford e EUTOS, houve uma maior frequência de pacientes classificados com baixo risco. Para o escore ELTS, a distribuição dos pacientes quanto a classificação de risco foi muito semelhante entres os pacientes de risco baixo e intermediário, porém ambas foram maiores do que o grupo de alto risco;
- A expressão do gene *NKp46* foi maior nos pacientes uso de nilotinibe, no entanto, para o gene *CTLA4*, nenhuma diferença foi observada entres os pacientes em uso de diferentes ITKs;
- Nenhuma correlação com a expressão dos genes *NKp46* e *CTLA4* com o tempo de uso de ITK foi observada;
- A expressão do gene *NKp46* foi maior em pacientes de baixo risco para o escore EUTOS, no entanto a diferença encontrada parece ser espúria. Para o gene *CTLA4* foi encontrada uma maior expressão em pacientes com RCgC e com RMP.
- Em pacientes com  $\geq$ RMM a expressão do gene *NKp46* foi maior em pacientes que utilizavam imatinibe ou nilotinibe em relação aos controles, no entanto, por apresentar a maior média de expressão, nilotinibe pareceu exercer um efeito mais pronunciado. Para o gene *CTLA4*, a média de expressão foi gradativamente maior com o alcance de melhores RMs, tendo os pacientes com RMP a maior média de expressão. Considerando pacientes com  $\geq$ RMM, não houve diferença com os controles, indicando que os níveis de expressão do gene *CTLA4* foram restaurados.

## REFERÊNCIA

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. Ed. Rio de Janeiro:Saunders Elsevier, 2015.

APPERLEY, J F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, v. 385, n. 9976, p. 1447-1459, 2015.

APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **Lancet Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1018-1029, 2007.

BACCARANI, M. *et al.* Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 6041-6051, 2009.

BACCARANI, M. *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872-884, 2013.

BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BANDEIRA, D. M. A. *et al.* Análise do perfil epidemiológico dos pacientes com leucemia mielóide crônica do hospital universitário Prof. Alberto Antunes no período de 1996 a 2005. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 28, 2006.

BARROW, A.D.; MARTIN, C.J.; COLONNA, M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 909, 2019.

BASTA, S.; ALATERY, A. The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 65, n. 4, p. 311-319, 2007.

BENELUX CML STUDY GROUP. Randomized study on hydroxyurea alone versus hydroxyurea combined with low-dose interferon- $\alpha$ 2b for chronic myeloid leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 91, n. 8, p. 2713-2721, 1998.

BEN-NERIAH, Y. *et al.* The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science**, v.233, n.4760, p.212-214, 1986.

BENNETT, J. H. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver: In which Death Took Place from Suppuration of the Blood. **Edinburgh Medical and Surgical Journal**, v.64, p.433, 1845.

BENNOUR, A. *et al.* Comprehensive analysis of BCR/ABL variants in chronic myeloid leukemia patients using multiplex RT-PCR. **Clinical Laboratory**, v.58, n.5-6, p.433-439, 2012.

BENNOUR, A.; SAAD, A.; SENNANA, H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.97,

p.263-274, 2016.

BINOTTO, G. *et al.* Comparative analysis of NK receptor and T-cell receptor repertoires in patients with chronic myeloid leukemia treated with different tyrosine kinase inhibitors. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 5508, 2014.

BLOOM, B.R. Natural killers to rescue immune surveillance?. **Nature**, v. 300, n. 5889, p. 214-215, 1982.

BONIFAZI, F. *et al.* Chronic myeloid leukemia and interferon- $\alpha$ : a study of complete cytogenetic responders. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 98, n. 10, p. 3074-3081, 2001.

BORTOLHEIRO, T.; CHIATTONE, C.S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. supl. 1, p. 3-7, 2008.

BOWER, H. *et al.* Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 24, p. 2851-2857, 2016.

BRADSHAW, J. M. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. **Cellular signalling**, v. 22, n. 8, p. 1175-1184, 2010.

BRÜCK, O. *et al.* Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML. **Leukemia**, v. 32, n. 7, p. 1643-1656, 2018.

BRUNNER-WEINZIERL, M. C.; HOFF, H.; BURMESTER, G.R. Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2004.

BUSTIN, S. A. *et al.* The imatinibeQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR Experiments. 2009.

BYRD, A. *et al.* Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. **PloS one**, v. 2, n. 12, p. e1339, 2007.

CAMPOS, M. G. *et al.* Considerações sobre idade e perfil de apresentação em leucemia mielóide crônica. **Rev bras hematol hemoter**, v. 28, n. 2, 2006.

CARULLI, G. *et al.* Abnormal phenotype of bone marrow plasma cells in patients with chronic myeloid leukemia undergoing therapy with Imatinib. **Leukemia research**, v. 34, n. 10, p. 1336-1339, 2010.

CEBO, C. *et al.* The decreased susceptibility of Bcr/Abl targets to NK cell-mediated lysis in response to imatinib mesylate involves modulation of NKG2D ligands, GM1 expression, and synapse formation. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 2, p. 864-872, 2006.

- CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.
- CHEENT, K.; KHAKOO, S.I. Natural killer cells: integrating diversity with function. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 449-457, 2009.
- CHEN, C. I. U. *et al.* NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR–ABL-positive mice. **Leukemia**, v. 26, n. 3, p. 465, 2012.
- CHEN, J. *et al.* Nilotinib hampers the proliferation and function of CD8+ T lymphocytes through inhibition of T cell receptor signalling. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 5b, p. 2107-2118, 2008.
- CHEN, K. *et al.* Impact of BCR-ABL1 transcript type on outcome in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: A pairwise and bayesian Network meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 841546, 2022.
- CHEN, Y. *et al.* Research progress on NK cell receptors and their signaling pathways. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.
- CORTES, J. E. *et al.* Final 5-year study results of DASISION: the dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 20, p. 2333, 2016.
- CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **The American Journal of Medicine**, v. 100, n. 5, p. 555-570, 1996.
- COSTELLO, R.T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell–triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 99, n. 10, p. 3661-3667, 2002.
- COSTELLO, R.T. *et al.* Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Immunology**, v. 135, n. 2, p. 151-157, 2012.
- CWYNARSKI, K. *et al.* Imatinib inhibits the activation and proliferation of normal T lymphocytes in vitro. **Leukemia**, v. 18, n. 8, p. 1332, 2004.
- DALEY, G. Q.; VAN ETTEN, R. A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, n. 4944, p. 824-830, 1990.
- DAUB, H.; SPECHT, K.; ULLRICH, A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1001-1010, 2004.
- DE ALMEIDA FILHO, T.P. *et al.* Does BCR-ABL transcript type influence the prognosis of patients in chronic myelogenous leukemia chronic phase?. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, p. 114-118, 2019.

DE LAVALLADE, H. *et al.* Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.20, p.3358-3363, 2008.

DE LOCHT, V.; VAN KESSEL, G.; WITTE, D. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. **British Journal of Haematology**, v. 102, n. 3, p. 768-774, 1998.

DEININGER, M. W.; DRUKER, B. J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 401-423, 2003.

DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2640-2653, 2005.

DEKMEZIAN, R. *et al.* The relevance of reticulin stain-measured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 59, n. 10, p. 1739-1743, 1987.

DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The immune system. **New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DEN HAAN, J. M. M; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunology letters**, v. 162, n. 2, p. 103-112, 2014.

DERDERIAN, P. M. *et al.* Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. **The American Journal of Medicine**, v. 94, n. 1, p. 69-74, 1993.

DIETZ, A. B. *et al.* Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. **Blood**, v. 104, n. 4, p. 1094-1099, 2004.

DRUKER, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nature medicine**, v. 2, n. 5, p. 561-566, 1996.

DRUKER, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

DRUKER, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.355, n.23, p.2408-2417, 2006.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of clinical**

**investigation**, v. 105, n. 1, p. 3-7, 2000.

DULUCQ, S.; MAHON, F. X. Deep molecular responses for treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. **Cancer medicine**, v. 5, n. 9, p. 2398-2411, 2016.

ELLIOTT, M. *et al.* WHO-defined chronic neutrophilic leukemia: a long-term analysis of 12 cases and a critical review of the literature. **Leukemia**, v. 19, n. 2, p. 313-317, 2005.

EPSTEIN, F. H. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.

EPSTEIN, F. H. *et al.* The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 15, p. 990-998, 1988.

ESEN, F.; DENIZ, G.; AKTAS, E. C. PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions. **Immunology letters**, v. 240, p. 15-23, 2021.

FADERL, S.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1337-1354, 2003.

FALCHI, *et al.* Significance of deeper molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with tyrosine kinase inhibitors. **American journal of hematology**, v. 88, n. 12, p. 1024-1029, 2013.

FAURIAT, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 323-330, 2007.

FEI, F. *et al.* Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **British journal of haematology**, v. 144, n. 2, p. 195-205, 2009.

FEI, F. *et al.* Effects of nilotinib on regulatory T cells: the dose matters. **Molecular cancer**, v. 9, n. 1, p. 22, 2010.

FRASER, C. K. *et al.* Dasatinib inhibits recombinant viral antigen-specific murine CD4+ and CD8+ T-cell responses and NK-cell cytolytic activity in vitro and in vivo. **Experimental hematology**, v. 37, n. 2, p. 256-265, 2009.

FUJISAWA, S. *et al.* Efficacy and safety of dasatinib versus imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP): subset analysis of the DASISION trial with 2-year follow-up. **International journal of hematology**, v. 99, n. 2, p. 141-153, 2014.

FUNKE, V. A. M. *et al.* Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: a study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 159-165, 2005.

GAMBACORTI-PASSERINI, C. *et al.* Inhibition of the ABL kinase activity blocks the

- proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 23, n. 3, p. 380-394, 1997.
- GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 15, p. 1451-1464, 2003.
- GORRE, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 876-880, 2001.
- GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, Arlene H. The B7 family revisited. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 515-548, 2005.
- HANTSCHHEL, O.; RIX, U.; SUPERTI-FURGA, G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. **Leukemia & lymphoma**, v. 49, n. 4, p. 615-619, 2008.
- HANTSCHHEL, O.; SUPERTI-FURGA, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 33-44, 2004
- HASFORD, J. *et al.* A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 11, p. 850-859, 1998.
- HASFORD, J. *et al.* Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. **Blood**, v. 118, n. 3, p. 686-692, 2011.
- HAYASHI, Y. *et al.* Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. **Leukemia & lymphoma**, v. 53, n. 6, p. 1084-1089, 2012.
- HEHLMANN, R. *et al.* Randomized comparison of interferon  $\alpha$  and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon  $\alpha$  and hydroxyurea. **Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 1529-1537, 2003.
- HEHLMANN R, *et al.* Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. **Leukemia**. v.31, p. 2398-2406, 2017.
- HEISTERKAMP, N. *et al.* Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 306, p. 239-242, 1983.
- HOCHHAUS, A. *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2190-2196, 2002.

- HOCHHAUS, A. *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 34, n. 4, p. 966-984, 2020.
- HOCHHAUS, A. *et al.* Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 10, p. 917-927, 2017.
- HOFFMANN, V. S. *et al.* The EUTOS prognostic score: review and validation in 1288 patients with CML treated frontline with imatinib. **Leukemia**, v. 27, n. 10, p. 2016-2022, 2013.
- HOLYOAKE, D. T. L. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. **British Journal of Haematology**, v. 113, n. 1, p. 11-23, 2001.
- HUET, S. *et al.* Molecular characterization and follow-up of five CML patients with new BCR-ABL1 fusion transcripts. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 54, n. 10, p. 595-605, 2015.
- HUGHES, A. *et al.* CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 129, n. 9, p. 1166-1176, 2017.
- ILANDER, M. *et al.* Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 31, n. 5, p. 1108, 2017.
- IMAGAWA, J. *et al.* Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. **The Lancet Haematology**, v. 2, n. 12, p. e528-e535, 2015.
- IRANI, Y. D. *et al.* Association of TIM-3 checkpoint receptor expression on T cells with treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. **Blood Advances**, p. bloodadvances. 2022008854, 2023.
- JABBOUR, E. *et al.* Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 9, p. 1800-1811, 2011.
- JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 547-556, 2014.
- JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. **American journal of hematology**, v. 97, n. 9, p. 1236-1256, 2022.
- JACKNOW, G. *et al.* Extramedullary presentation of the blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 61, n. 2, p. 225-236, 1985.

KANTARJIAN, H. *et al.* Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 24, p. 2260-2270, 2010.

KANTARJIAN, H. *et al.* Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: A single-institution historical experience. **Blood**, v. 119, p. 1981-7, 2012.

KANTARJIAN, H. M. *et al.* Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. **Cancer**, v. 61, n. 7, p. 1441-1446, 1988.

KANTARJIAN, H. M. *et al.* Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon- $\alpha$ -based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1835-1840, 2006.

KANTARJIAN, H. M. *et al.* Chronic myelogenous leukemia: a concise update. **Blood**, v. 82, n. 3, p. 691-703, 1993.

KONOPKA, J. B.; WATANABE, S. M.; WITTE, O. N. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1035-1042, 1984.

KREUTZMAN, A. *et al.* Dasatinib reversibly disrupts endothelial vascular integrity by increasing non-muscle myosin II contractility in a ROCK-dependent manner. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 21, p. 6697-6707, 2017.

KRUMMEL, M.F.; ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 2, p. 459-465, 1995.

KRUSE, P. H. *et al.* Natural cytotoxicity receptors and their ligands. **Immunology and cell biology**, v. 92, n. 3, p. 221-229, 2014.

LARMONIER, N. *et al.* Imatinib mesylate inhibits CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL<sup>-</sup> tumors. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 10, p. 6955-6963, 2008.

LARSON, A. *et al.* Efficacy and safety of nilotinib (NIL) vs imatinib (IM) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP): long-term follow-up (f/u) of ENESTnd. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 4541, 2014.

LARSON, R. *et al.* Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. **Leukemia**, v. 26, n. 10, p. 2197-2203, 2012.

LEDER, C. *et al.* Modulation of T-effector function by imatinib at the level of cytokine secretion. **Experimental hematology**, v. 35, n. 8, p. 1266-1271, 2007.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M.G. Human CD25+ CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 11, p. 1295-1302, 2001.

LICHTMAN, M. A.; ROWE, J. M. Hyperleukocytic leukemias: rheological, clinical, and therapeutic considerations. **Blood**, v. 60, n. 2, p. 279-283, 1982.

LIPSCOMB, M.F.; MASTEN, B.J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiological reviews**, 2002.

LIU, L. G. *et al.* Chronic myelogenous leukemia with e13a3 (b2a3) type of BCR-ABL transcript having a DNA breakpoint between ABL exons a2 and a3. **American Journal of Hematology**, v. 74, n. 4, p. 268-272, 2003.

LOMBARDO, L.J. *et al.* Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 27, p. 6658-6661, 2004.

LORAND-METZE, I. *et al.* Fatores que influem na resposta citogenética com o uso do imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27, 2005.

LÜBKING, Anna *et al.* Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in the TKI era: population-based data from the Swedish CML registry. **Bone marrow transplantation**, v. 54, n. 11, p. 1764-1774, 2019.

LUGO, T. G. *et al.* Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. **Science**, v. 247, n. 4946, p. 1079-1082, 1990.

MAHON, F. X. *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. **The lancet oncology**, v. 11, n. 11, p. 1029-1035, 2010.

MAHON, F. X. *et al.* Treatment-free remission after second-line nilotinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from a single-group, phase 2, open-label study. **Annals of internal medicine**, v. 168, n. 7, p. 461-470, 2018.

MAIA FILHO, P. A. *et al.* Genotoxicity associated with the use of tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 59, n. 3, p. 260-262, 2018.

MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; MESTAN, J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1, p. 3-13, 2005.

MAGISTRELLI, Giovanni *et al.* A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. **European journal of immunology**, v. 29, n. 11, p. 3596-3602, 1999.

MARTENS, U. M. **Small Molecules in Oncology**. Springer, 2014. ISBN 3642544894.

MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. N. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 18, p. 6558-6562, 1987.

MELO, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2375-2384, 1996a.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 441-453, 2007.

MELO, J. V.; BARNES, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 441-453, 2007.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Letters**, v.249, n.2, p.121-132, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas-Leucemia Mieloide Crônica de Crianças e Adolescentes. 2021.

MIZOGUCHI, Izuru *et al.* Sustained upregulation of effector natural killer cells in chronic myeloid leukemia after discontinuation of imatinib. **Cancer Science**, v. 104, n. 9, p. 1146-1153, 2013.

MOLICA, M.; ABRUZZESE, E.; BRECCIA, M.. Prognostic significance of transcript-type BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, 2020.

MONTANI, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. **Circulation**, v. 125, n. 17, p. 2128-2137, 2012.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 5, p. 626-633, 2004.

MUGHAL, T. I.; SCHRIEBER, A. Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Biologics: targets & therapy**, v. 4, p. 315, 2010.

NEUMANN, E. Uber myelogene leukemia. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 15, p. 69-72, 1878.

NOWELL, P. C. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, v. 132, p. 1497-1501, 1960.

- O'BRIEN, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 11, p. 994-1004, 2003.
- O'HARE, T.; EIDE, C. A.; DEININGER, M. W. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2242-2249, 2007.
- OHYASHIKI, K. *et al.* Increased natural killer cells and decreased CD3+ CD8+ CD62L+ T cells in CML patients who sustained complete molecular remission after discontinuation of imatinib. **British journal of haematology**, v. 157, n. 2, p. 254-256, 2012.
- OKADA, M. *et al.* Final 3-year results of the Dasatinib discontinuation trial in patients with chronic myeloid leukemia who received Dasatinib as a second-line treatment. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 18, n. 5, p. 353-360. e1, 2018.
- PANE, F. *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). **Blood**, v. 88, n. 7, p. 2410-2414, 1996.
- PAVLOVSKY, C.; KANTARJIAN, H.; CORTES, J. E. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. **American journal of hematology**, v. 84, n. 5, p. 287-293, 2009.
- PEGRAM, H. *et al.* Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 2, p. 216-224, 2011.
- PENDE, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 10, p. 1505-1516, 1999.
- PFIRRMANN, M. *et al.* Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 1, p. 48-56, 2016.
- PFIRRMANN, M. *et al.* The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 34, n. 8, p. 2138-2149, 2020.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- PINILLA-IBARZ, J.; CORTES, J.; MAURO, M. J. Intolerance to tyrosine kinaseinhibitors in chronic myeloid leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 4, p. 688-697, 2011.
- PISTILLO, M.P. *et al.* CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 101, n. 1, p. 202-209, 2003.

QUINTÁS-CARDAMA, A. *et al.* Nilotinib. In: (Ed.). **Small Molecules in Oncology**: Springer, 2010. p.103-117.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 113, n. 8, p. 1619-1630, 2009.

REA, D. *et al.* Natural killer cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. **Haematologica**, p. haematol. v. 102, p. 1368–1377, 2017.

REN, R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 172-183, 2005.

REUBEN, James M. *et al.* Restoration of Th1 cytokine synthesis by T cells of patients with chronic myelogenous leukemia in cytogenetic and hematologic remission with interferon- $\alpha$ . **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 1671-1677, 2000.

ROMEE, R. *et al.* NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 18, p. 3599-3608, 2013.

ROSNER, F.; SCHREIBER, Z. R.; PARISE, F. Leukocyte alkaline phosphatase: Fluctuations with disease status in chronic granulocytic leukemia. **Archives of Internal Medicine**, v. 130, n. 6, p. 892-894, 1972.

ROSS, D. M. *et al.* Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. **Blood**, p. blood-2013-02-483750, 2013.

ROUSSELOT, P. *et al.* Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 58-60, 2007.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290-293, 1973.

SALIH, J. *et al.* The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. **International Journal of cancer**, v. 127, n. 9, p. 2119-2128, 2010.

SANTACHIARA, R. *et al.* Development of hypogammaglobulinemia in patients treated with imatinib for chronic myeloid leukemia or gastrointestinal stromal tumor. **haematologica**, v. 93, n. 8, p. 1252-1255, 2008.

SASAKI, K. *et al.* Relative survival in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia in the tyrosine-kinase inhibitor era: analysis of patient data from six prospective clinical trials. **The Lancet Haematology**, v. 2, n. 5, p. e186-e193, 2015.

SATO, N. *et al.* The effects of STI571 on antigen presentation of dendritic cells generated from patients with chronic myelogenous leukemia. **Hematological oncology**, v. 21, n. 2, p. 67-75, 2003.

SAUSSELE, S. *et al.* The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 8, p. 1638-1647, 2016.

SAVAGE, D. G.; ANTMAN, K. H. Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 9, p. 683-693, 2002.

SAVAGE, D. G.; SZYDLO, R. M.; GOLDMAN, J. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. **British Journal of Haematology**, v. 96, n. 1, p. 111-116, 1997.

SAWYERS, C. L. *et al.* Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3530-3539, 2002.

SCHADE, A. E. *et al.* Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1366-1377, 2008.

SCHIFFER, C. A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 258-265, 2007.

SCHÜTZ, C. *et al.* Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. **Leukemia**, v. 31, n. 4, p. 829-836, 2017.

SHAH, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 117-125, 2002.

SIVORI, S. *et al.* NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. **European journal of immunology**, v. 29, n. 5, p. 1656-1666, 1999.

SOKAL, J. E. *et al.* Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood**, v. 63, n. 4, p. 789-799, 1984.

SPIERS, A. The clinical features of chronic granulocytic leukaemia. **Clinics in Haematology**, v. 6, n. 1, p. 77-95, 1977.

TEFT, W. A.; KIRCHHOF, M.G.; MADRENAS, Joaquín. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 65-97, 2006.

TERJANIAN, T. *et al.* Clinical and prognostic features of patients with philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia and extramedullary disease. **Cancer**, v. 59, n. 2, p. 297-300, 1987.

THIELEN, N. *et al.* Chronic myeloid leukemia in the Netherlands: a population-based study on incidence, treatment, and survival in 3585 patients from 1989 to 2012. **European Journal of Haematology**, v. 97, n. 2, p. 145-154, 2016.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 49-53, 1998.

VAIDYA, S.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review. **European journal of haematology**, v. 87, n. 5, p. 381-393, 2011.

VALENT, P. Emerging stem cell concepts for imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia: implications for the biology, management, and therapy of the disease. **British Journal of Haematology**, v. 142, n. 3, p. 361-378, 2008.

VERRIER, T. *et al.* Phenotypic and functional plasticity of murine intestinal NKp46+ group 3 innate lymphoid cells. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 11, p. 4731-4738, 2016.

VIRCHOW, R. Zur pathologischen Physiologie des Bluts. **Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin**, v. 1, n. 3, p. 547-563, 1847.

VIVIER, E. *et al.* Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 4, p. 239, 2012.

WALKER, L.S.K; SANSOM, D.M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 852-863, 2011.

WANG, H. *et al.* ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a002279, 2010.

WANG, X.-B. *et al.* Expression of CTLA-4 by human monocytes. **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 1, p. 53-60, 2002.

WEICHSEL, R. *et al.* Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 8, p. 2484-2491, 2008.

WEISBERG, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. **Cancer Cell**, v. 7, n. 2, p. 129-141, 2005.]/XIAOimatinibeN, G. *et al.* Chronic myeloid leukemia with e14a3 BCR-ABL transcript: analysis of characteristics and prognostic significance. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n. 12, p. 3343-3347, 2015.

WELCH, H.G.; KRAMER, B.S.; BLACK, W.C. Epidemiologic signatures in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 14, p. 1378-1386, 2019.

YU, S. *et al.* A review of the challenge in measuring and standardizing BCR-ABL1. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 55, n. 10, p. 1465-1473, 2017.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Reclassifying plasmacytoid dendritic cells as innate lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 1, p. 1-2, 2023.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado por Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes como participante da pesquisa intitulada “Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e sistema imune em pacientes com leucemia mieloide crônica”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

#### **NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

O objetivo da pesquisa é estudar o material genético de pacientes portadores de leucemia mieloide crônica gerando dados que favoreçam a uma melhor compreensão do surgimento, evolução clínica, resposta ao tratamento e acompanhamento desta doença.

#### **PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES**

As coletas das amostras serão realizadas no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea. Esta corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas. A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato e plano localizado no centro do tórax (região peitoral). A coleta para a pesquisa será realizada no momento das realizações dos exames de rotina (como mielograma e citogenética) para o diagnóstico e acompanhamento ambulatorial do participante. Serão coletadas, para a pesquisa, somente 4 mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta será realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos. O procedimento para a coleta de medula óssea através da punção esternal, pode, raramente, determinar o aparecimento de uma mancha arroxeada ao redor do local da coleta, desaparecendo em poucos dias. Poderá, também, ocorrer dor discreta e de fácil alívio e, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local e, raramente, poderá ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária apenas em casos excepcionais, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Além da medula óssea, serão coletados dois tubos de 4 mL de sangue periférico contendo EDTA como anticoagulante e 1 tubo de 5 mL com gel separador para obtenção do soro. As amostras de sangue serão obtidas a partir de uma punção venosa no braço. A punção venosa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de dor e formação de uma mancha roxa devido à coleta. Caso haja um dano na sua integridade física e mental serão minimizados pela garantia de atendimento médico e psicológico.

Necessitamos, também, que o Sr.(a) autorize a coleta de dados, como: nome, idade, sexo, escolaridade, ocupação, contato, data de diagnóstico (LMC), número do prontuário e informações relacionadas ao uso de medicamentos, todas essas pertinentes à pesquisa, que serão coletadas em um único momento através da aplicação de questionário ou através de consultas ao seu prontuário.

## PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você terá a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deverá informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nessa instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

**Nome:** Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes  
**Instituição:** Universidade Federal Do Ceará  
**Endereço:** Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brasil.  
**Telefones para contato:** (85) 33668264

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
Nome da testemunha	Data	Assinatura
(se o participante não souber ler)		
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ PROPESQ - UFC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE REPARO DO DNA E SISTEMA IMUNE EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

**Pesquisador:** ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 09558718.0.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 8.088.725

#### Apresentação do Projeto:

Foi solicitado a inclusão no projeto dos genes CTLA-4, POLN, REV3L, POLB, REV1, POLL e PCNA para avaliação da expressão gênica nas amostras já coletadas, sem alteração na metodologia e no cronograma já aprovados.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar os mecanismos de reparo do DNA e o sistema imune em pacientes com leucemia mieloide crônica com e sem uso de inibidores da tirosina quinase por meio da associação da expressão de genes de resposta das células NK e de reparo no DNA, da contagem de células NK como seus receptores e co-receptores e do perfil de citocinas com características clínicas, laboratoriais, score de risco da doença, níveis de resposta ao tratamento, polimorfismo genético e sobrevida global.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve alteração.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram inseridos os genes CTLA-4, POLN, REV3L, POLB, REV1, POLL e PCNA sem alteração na metodologia e cronograma aprovados anteriormente.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodovalho Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ PROPESQ - UFC



Continuação do Parecer: 6.006.725

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 16 de Maio de 2023

---

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: [conep@ufc.br](mailto:conep@ufc.br)