



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

**YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4 EM  
PACIENTES COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA**

**FORTALEZA**

**2023**

YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4 EM  
PACIENTES COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA

Trabalho apresentado para o Exame de Defesa,  
visando obter o grau de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas. Área de concentração: doenças  
onco-hematológicas. Linha de Pesquisa:  
Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pi-  
nheiro Gonçalves Lemes

Coorientador: Dr. Fernando Barroso Du-  
arte

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)

---

G211e Garcia, Yhasmine.

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4 EM  
PACIENTES COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA / Yhasmine Garcia. – 2023.

119 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: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Profa. Dra. Fernando Barroso Duarte.

1. Síndrome Mielodisplásica,. 2. ntígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos. 3. morte  
programada 1. 4. checkpoint imunológico. I. Título.

CDD 615

---

YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4 EM  
PACIENTES COM NEOPLASIA MIELODISPLÁSICA

Trabalho apresentado para o Exame de Defesa, visando obter o grau de Doutor em em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: doenças onco-hematológicas. Linha de Pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes

Aprovada em: 01/12/2023

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves  
Lemes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Fernando Barroso Duarte (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra Maria da Silva Pitombeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra Maria Do Patrocinio Ferreira  
Grangeiro Beco  
Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer  
do Ceará (ICC)

---

Prof. Dra Talyta Ellen de Jesus dos Santos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus,

Pela graça de poder realizar esse sonho e pela  
força que me sustentou nas adversidades.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por mais essa realização na minha vida.

A meu Pai, pelo apoio e exemplo, seguir a carreira acadêmica sempre foi uma possibilidade na minha vida, porque tive você como inspiração.

À minha mãe Lusinete, por ser colo, ouvidos, amor e a maior incentivadora para realização deste sonho.

Aos meus avós que mesmo sem entender o que faço sempre perguntam quando vou terminar meus estudos, eu digo que tá perto!

Às minhas irmãs Layla e Louyse pelo amor e visitas que fizeram meus dias em Fortaleza mais divertidos e saudosos.

Agradeço a presença de Lys na minha vida, sem dúvidas ela foi meu maior apoio emocional durante essa trajetória solitária que é estudar longe da família.

Meu imenso agradecimento à Profa. Romélia, que mesmo sem me conhecer me convidou para ser sua aluna e me acolheu como uma mãe. Seu apoio, ensinamentos e conselhos eu levarei para toda vida. Agradeço sua paciência comigo e por sempre me incentivar quando eu desanimava. Serei eternamente grata por tudo.

Agradeço também, ao Dr. Fernando, pela ajuda no tema, ensinamentos, apoio financeiro no projeto e pela oportunidade de trabalhar no CAC. Toda experiência com o senhor foi muito enriquecedora na minha vida profissional.

Agradeço ao Dr. Dario Rocha pela parceria e disponibilidade para ensinar a interpretar os dados das análises imunohistoquímicas. Tens meu respeito e admiração pelo profissional incrível que és. À Dra. Helena Pitombeira e Dra. Patrocínio pelas excelentes contribuições nessa banca.

Agradeço ao Paulo Goberlânio pelo auxílio na análise estatística. Ao departamento de Patologia por ceder os blocos de parafina com as biópsias dos pacientes para as análises e aos profissionais do Hemoce e HUWC pela contribuição tanto nas coletas, ambulatórios e análise de prontuários.

Agradeço ao departamento de Morfologia, principalmente à Profa. Gerli, Patologista Júnior pela ajuda na execução da Imunohistoquímica e ao CAC e sua equipe por ceder a estrutura e os equipamentos para análise de PCR em tempo real.

Agradeço minhas amigas Juliene e Mariana, pelo apoio no projeto e pela amizade que foi construída além da Universidade, foi uma honra compartilhar esses 5 anos com vocês,

cheios de congressos, viagens, cafezinhos e almoços. Levarei vocês para a vida. Aos amigos do laboratório Suzzy, Tarcísio, Pedro, Talyta, Thawanny pela ajuda no projeto.

Agradeço aos amigos de Fortaleza, por serem apoio e alegria.

Agradeço aos amigos e familiares de Teresina, Parnaíba, Balsas e São Paulo pela torcida e compreensão da ausência

Agradeço à Funcap pela ajuda financeira adquirida para execução do projeto.

Agradeço à Capes pelo apoio financeiro.

“Espero que você não deixe o medo te impedir de voar, de amar e de experimentar as alturas de sua existência. Espero que você caia algumas vezes para poder entender que o pulo não era tão alto e assustador quanto imaginou. Espero que quando lágrimas rolarem, você as enxugue com o sorriso de quem se orgulha por estar pelo menos tentando. Espero que o medo jamais te impeça de viver, de corpo e alma. O maior perigo da vida é não viver por medo de se arriscar, porque sem correr riscos não é possível fazer história.”

(Wandy Luz)

## RESUMO

A patogênese das Síndromes Mielodisplásicas (SMD) é caracterizada pela intensa desregulação imune e evasão do sistema imunológico mediada pelos receptores do ponto de verificação da Morte Programada 1 (PD-1), ligante da Morte Programada 1 (PD-L1) e Antígeno 4 Associado a Linfócito T Citotóxico (CTLA-4). O bloqueio desses receptores tem sido utilizado como alvo terapêutico na SMD. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão proteica e gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 e associá-las com o perfil sociodemográfico, clínico e com prognóstico em pacientes com SMD. Trata-se de um estudo transversal, analítico e descritivo com 34 pacientes com SMD e 15 indivíduos saudáveis (grupo controle) acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Os dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais foram obtidos nos prontuários médicos. A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi avaliada por Imunohistoquímica (IHQ) e a expressão gênica por Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR). As análises estatísticas foram realizadas através do programa *SPSS 20.0* e *GraphPadPrism 6.0*, com significância  $p < 0,05$ . A média de idade foi de  $69,91 \pm 16,33$  anos, sendo 52,94% do sexo feminino e 52,94% do interior do estado do Ceará, 20,29%, sendo do tipo SMD com blastos baixos e 44,2% do escore Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) de baixo risco. A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi positiva em 52,18%, 78,26% e 86,95% na biópsia da Medula Óssea (MO) dos pacientes com SMD, respectivamente e houve diferença significativa entre o CTLA-4 e o PD-1 ( $p=0,034$ ). PD-L1 apresentou maior intensidade de marcação comparado ao PD-1 ( $p=0,039$ ). Foi observado também uma marcação positiva de 47,82% para PD-L1, em megacariócitos, nos pacientes com SMD. Na análise multivariada, as expressões das proteínas foram associadas: PD-1 com o sexo feminino ( $p=0,039$ ) e com a mielofibrose ( $p=0,038$ ) e CTLA-4 com a contagem de neutrófilos ( $p=0,015$ ) e com a disgranulopoese ( $p=0,015$ ). A positividade da expressão gênica do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi observada em 28,57%, 23,81% e 33,33% dos pacientes com SMD, respectivamente, não havendo diferença com o grupo controle. Na análise multivariada, a expressão gênica do PD-1 foi associada à idade  $\leq 70$  anos ( $p=0,006$ ); PD-L1 com a dependência transfusional ( $p=0,029$ ) e o subtipo hipoplásico ( $p=0,044$ ). Observou-se uma menor taxa de Sobrevida Global (SG) em pacientes com SMD com a expressão positiva isolada de PD-L1 e quando a mesma estava associada ao CTLA-4. A redução da SG foi relacionada com idade  $>70$  anos, contagem normal de plaquetas, medula hiperclular, dismegacariopoese e progressão para Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Quanto à sobrevida livre de progressão (SLP), observou-se

que variáveis idade >70 anos, medula hipercelular e dismegacariopoese estiveram associadas à menor SLP, enquanto a expressão positiva de PD-L1 + CTLA-4 foi preditiva de fator para menor SLP (IC1,96-90,61; p=0,013). Conclui-se que ao diagnóstico da SMD a expressão positiva gênica e proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 se apresentam aumentadas e que elas estão associadas a um pior prognóstico, reforçando a relevância do uso das mesmas como biomarcadores preditivos de prognóstico e na elegibilidade para tratamento personalizado de pacientes com SMD.

**Palavras-chave:** Síndrome Mielodisplásica, antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos CTLA-4, morte programada 1 PD-1, checkpoint imunológico

## ABSTRACT

The pathogenesis of *Myelodysplastic Syndromes* (MDS) is characterized by intense immune dysregulation and evasion of the immune system, mediated by the programmed death 1 PD-1, programmed death-ligand 1 PD-L1, and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 CTLA-4 checkpoint receptors. The blockade of these receptors has been utilized as a therapeutic target in MDS. The aim of this study was to evaluate the protein and gene expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4, and associate them with sociodemographic, clinical, and prognostic profiles in patients with MDS. This was a cross-sectional, analytical, and descriptive study involving 34 patients with MDS undergoing treatment at the HUWC and 15 healthy individuals (control group). Sociodemographic, clinical, and laboratory data were obtained from medical records. The expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 proteins was evaluated by Immunohistochemistry (IHC), and gene expression was assessed by RT-PCR. Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 and *GraphPad Prism 6.0*, with significance set at  $p < 0.05$ . The mean age was  $69.91 \pm 16.33$  years, with 52.94% females and 52.94% from the countryside of the state of Ceará, Brazil. MDS with low blast counts constituted 20.29% of the patients, and 44.2% had a low-risk IPSS-R score. Protein expression was positive in 52.18%, 78.26%, and 86.95% for PD-1, PD-L1, and CTLA-4, respectively, in Bone Marrow (BM) biopsies of MDS patients, and there was a significant difference between CTLA-4 and PD-1 ( $p = 0.034$ ). PD-L1 showed higher intensity compared to PD-1 ( $p = 0.039$ ). Positive staining for PD-L1 was also observed in 47.82% of megakaryocytes in MDS patients. In multivariate analysis, protein expressions were associated: PD-1 with female sex ( $p = 0.039$ ) and myelofibrosis ( $p = 0.038$ ), and CTLA-4 with neutrophil count ( $p = 0.015$ ) and dysgranulopoiesis ( $p = 0.015$ ). Positive gene expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 was observed in 28.57%, 23.81%, and 33.33% of MDS patients, respectively, with no difference compared to the control group. In multivariate analysis, PD-1 gene expression was associated with age  $\leq 70$  years ( $p = 0.006$ ); PD-L1 with transfusion dependence ( $p = 0.029$ ) and hypoplastic subtype ( $p = 0.044$ ). A lower Overall Survival (OS) rate was observed in MDS patients with isolated positive expression of PD-L1 and when it was associated with CTLA-4. Reduced OS was related to age  $> 70$  years, normal platelet count, hypercellular marrow, dysmegakaryopoiesis, and progression to Acute Myeloid Leukemia (AML). Regarding Progression-Free Survival (PFS), variables age  $> 70$  years, hypercellular marrow, and dysmegakaryopoiesis were associated with shorter PFS, while positive expression of PD-L1+CTLA-4+ was predictive of lower PFS (CI 1.96-90.61;  $p = 0.013$ ). In conclusion, at the diagnosis of MDS, positive gene and protein

expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 are increased and are associated with a worse prognosis, emphasizing their relevance as predictive prognostic biomarkers and in determining eligibility for personalized treatment in MDS patients

**Keywords:** Myelodysplastic syndromes, T lymphocyte-associated antigen 4 receptors, Cytotoxic (CTLA-4), programmed death checkpoint-1 (PD-1), programmed death ligand-1(PD-L1), immunological checkpoint.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de Displasias Presentes em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica	24
Figura 2 – Fisiopatologia da SMD	32
Figura 3 – Mecanismos de desregulação imune na SMD	36
Figura 4 – Ativação das células T CD4 e CD8 e dos mecanismos de check-point imune na SMD.	38
Figura 5 – Receptor de morte Programada 1 PD-1 e seu ligante PD-L1	39
Figura 6 – Receptor da molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) presente nas células TCD4.	41
Figura 7 – Fluxograma do estudo	47
Figura 8 – fluxograma da reação de Imunohistoquímica para análise das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4	49
Figura 9 – Coloração Imunohistoquímica da proteína PD-L1 em megacariócitos da médula óssea de quatro pacientes com (A) reação negativa, (B) fraca, (C) moderada e (D) intensa, respectivamente.	50
Figura 10 – Imunohistoquímica das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4 em médula óssea de pacientes com SMD.	59
Figura 11 – Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em imunohistoquímica de acordo com o grau de marcação	61

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Expressão das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD.....	62
Gráfico 2 - Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD, de acordo com a intensidade de marcação por imunohistoquímica.....	64
Gráfico 3 - Comparação da frequência de expressão dos genes PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD (n = 21).....	74
Gráfico 4 - Nível de expressão do gene PD1 em pacientes com SMD e GC (p=0,7654).....	75
Gráfico 5 - Nível de expressão do gene PD-L1 em pacientes com SMD e GC (p=0,5973).....	75
Gráfico 6 - Nível de expressão do gene CTLA4 em pacientes com SMD e GC (p=0,6663).....	76
Gráfico 7 - Comparação das expressões dos genes PD1, PD-L1, CTLA4 e o gene Controle GAPDH (p=0,005).....	77
Gráfico 8 - Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.....	88
Gráfico 9 - Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características e principais diferenças entre os tipos de pré-SMD e a SMD. . . . .	26
Tabela 2 – Comparação das Classificações da SMD da OMS de 2016 e 2022 . . . . .	28
Tabela 3 – Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD . . . . .	29
Tabela 4 – Grupos Prognósticos citogenéticos de acordo com IPSS-R . . . . .	29
Tabela 5 – Classificação de Risco segundo o Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) . . . . .	30
Tabela 6 – Escore de positividade (EP) das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4 . . . . .	50
Tabela 7 – Sondas utilizadas na expressão gênica por qtPCR . . . . .	52
Tabela 8 – Reagentes utilizados na PCR em tempo real . . . . .	53
Tabela 9 – Característica sociodemográfica dos pacientes com SMD (n = 34). . . . .	55
Tabela 10 – Característica clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD (n = 34). . . . .	56
Tabela 11 – Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 positividade após análise de 100 campos em porcentagem (n=23). . . . .	60
Tabela 12 – Avaliação da associação das características sociodemográficas e clínico-laboratoriais com a expressão por imuno-histoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 dos pacientes com SMD (n=34). . . . .	63
Tabela 13 – Análise multivariada da associação das características sociodemográficas e clínico-laboratoriais com a expressão gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 dos pacientes com SMD (n=21) . . . . .	76
Tabela 14 – Associação da Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD com as variáveis clínicas e sociodemográficas com a expressão de PD-1, PD-L1 E CTLA4. . . . .	89
Tabela 15 – Regressão de Cox da Análise de Sobrevida Global . . . . .	99
Tabela 16 – Associação da Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD com as variáveis clínicas e sociodemográficas com a expressão de PD-1, PD-L1 E CTLA4. . . . .	102
Tabela 17 – Regressão de Cox da Análise de Sobrevida Livre de Progressão . . . . .	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta$ Cq	Delta Ciclo de Quantificação
aHSCT	Transplante Alogênico de Células-Tronco Hematopoiéticas
AML	Acute Myeloid Leukemia
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
AZA	Azacitidina
BM	Bone Marrow
CCUS	Citopenia Clonal de Significância Desconhecida
cDNA	Ácido Desoxrribonucléico complementar
CHIP	Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado
cHL	Linfoma de Hodgkin clássico
Cq	Ciclo de Quantificação
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CTHs	células Trono Hematopoiéticas
CTL	Linfócito T Citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 Associado a Linfócito T Citotóxico
CTM	Mesenquimais Circulantes
DAB	Diaminobenzidina
DAC	Decitabina
DML	Displasia em múltiplas linhagens
DNA	Ácido Desoxrribonucléico
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico
FDA	Food and drugs administration
GAPDH	Gliceraldeído fosfatodesidrogenase
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Macrófagos
HMA	Agentes Hipometilantes
HSCs	Células-Tronco Hematopoiéticas
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICC	Classificação Internacional de Consenso
ICIs	Inibidores do Checkpoint Imune
ICUS	Citopenia Idiopática de Significância Desconhecida
IDUS	Displasia Idiopática de Significado Desconhecido

IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IHC	Imunohistochemistry
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IPSS-R	Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado
IRAEs	Eventos Adversos Relacionados ao Sistema Imunológico
IRAK-4	Inibidores da Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMMC	leucemia mielomonocítica crônica
mAbs	Anticorpos Monoclonais
MCL-1	Células Mieloides Leucêmicas
MDA-CSS	Sistema MD Anderson Comprehensive Scoring
MDS	<i>Myelodysplastic Syndromes</i>
MDS-5q	SMD com Blastos Baixos e del(5q) Isolado
MDS-biTP53	SMD com Inativação Bialélica de TP53
MDS-EB	MDS com Excesso de Blastos
MDS-f	SMD com fibrose
MDS-IB1	SMD com Aumento de Blastos1
MDS-IB2	SMD com Aumento de Blastos2
MDS-MLD	MDS com Displasia em Múltipla Linhagem
MDS-RS	MDS com Sideroblastos em Anel
MDS-RS-MLD	MDS com Sideroblastos de Múltipla Linhagem
MDS-RS-SLD	MDS com Sideroblastos de Única Linhagem
MDS-SF3B1	SMD com Mutação SF3B1 e Blastos Baixos
MDS-SLD	MDS com Displasia de Linhagem Única
MDS-U	Síndrome Mielodisplásica Não Classificada
MDSCs	Células supressoras Derivadas de Mielóides
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
MSCs	Células Estromais Mesenquimais
NHL	Linfoma Não-Hodgki

NK	Células Naturais Killers
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Overall Survival
PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PD-1	Morte Programada 1
PD-L1	ligante da Morte Programada 1
PFS	Regarding Progression-Free Survival
RAEB	Anemia Refratária em Excesso de Blastos
RAEB-1	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1
RAEB-2	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2
RAEB-T	RAEB em Transformação
RAMD	Anemia Refratária com Displasia Multilinhagem
RARS	Anemia Refratária com Sideroblastos Anelados
RC	Citopenia Refratária
RCUD	Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SG	Sobrevida Global
SLP	sobrevida livre de progressão
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SMD-DUL	Displasia em única linhagem
SMD-h	SMD hipoplásica
SMD-IB	SMD com Aumento de Blastos
SMD-LB	SMD com Níveis Baixos de Blastos
SP	Sangue Periférico
T-SMD	SMD Relacionada a Terapia
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Células T
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante- $\beta$

TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TIM-3	imunoglobulina de células T
TME	Microambiente Tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
Treg	Linfocitos T reguladores
UFC	Universidade Federal do Ceará
WPSS	Sistema de Pontuação Prognóstico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	22
2.1	SÍNDROME MIELODISPLÁSTICA - CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
2.2	FISIOPATOLOGIA DA SMD	30
2.3	DESREGULAÇÃO IMUNOLÓGICA NA SMD	32
2.4	CHECK- POINT IMUNE	36
<b>2.4.1</b>	<b>Receptor de Morte Programada 1 (PD-1)</b>	38
<b>2.4.2</b>	<b>Ligante do Receptor de Morte Programada 1 PD-L1</b>	39
<b>2.4.3</b>	<b>Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4)</b>	40
2.5	IMUNOTERAPIA	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	45
3.1	OBJETIVOS GERAIS	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	46
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	46
4.3	CASUÍSTICA	46
<b>4.3.1</b>	<b>Critérios de Inclusão</b>	46
<b>4.3.2</b>	<b>Critérios de exclusão</b>	47
4.4	COLETA DE DADOS E DE MATERIAL BIOLÓGICO	47
4.5	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA PD-1, PD-L1 E CTLA4	47
4.6	INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-1, PD-L1 E CTLA4	49
4.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	51
<b>4.7.1</b>	<b>Extração de mRNA</b>	51
<b>4.7.2</b>	<b>Quantificação de RNA</b>	51
<b>4.7.3</b>	<b>Síntese do cDNA</b>	51
<b>4.7.4</b>	<b>Análise da expressão dos genes CD279, CD274 e CD152 por PCR tempo real quantitativa.</b>	52
<b>4.7.5</b>	<b>Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo</b>	53

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA . . . . .	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> . . . . .	<b>55</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, SOCIODEMOGRÁFICAS (IDADE, SEXO, ORIGEM E PROFISSÃO) E CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACI- ENTES COM SMD. . . . .	55
5.2	EXPRESSÃO DE PD1, PD-L1 E CTLA4 EM PACIENTES COM SMD UTILIZANDO IMUNOHISTOQUÍMICA . . . . .	58
5.3	EXPRESSÃO DE PD1, PD-L1 E CTLA4 EM PACIENTES COM SMD UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL . . . . .	72
5.4	ANÁLISE DE SOBREVIDA . . . . .	85
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> . . . . .	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> . . . . .	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> . . . . .	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO</b> . . . . .	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mielodisplásicas SMD consistem em um grupo heterogêneo de doenças clonais da medula óssea caracterizadas pela hematopoiese ineficaz, resultando na presença de citopenias em uma ou mais linhagens celulares, presença de displasias morfológicas em elementos hematopoiéticos e predisposição ao desenvolvimento de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (GARCIA-MANERO *et al.*, 2020; HASSERJIAN *et al.*, 2021).

A patogênese da SMD é complexa e envolve mecanismos genéticos, epigenéticos, alterações no microambiente da medula óssea e desregulação imune (PENG *et al.*, 2022; DUARTE, 2016). A intensa desregulação imune na SMD fornece uma base razoável para a imunoterapia nos pacientes refratários a outros tratamentos (PENG *et al.*, 2022). Os checkpoints imunológicos são vias com características inibitórias ou estimulatórias que auxiliam a resposta imune e mantêm a autotolerância (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018). Os Check-point imune mais descritos na literatura são de natureza inibitória como o receptor molécula Antígeno 4 Associado a Linfócito T Citotóxico (CTLA-4), o receptor de Morte Programada 1 (PD-1) e seu ligante de morte celular programada 1 PD-L1 (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018). A ligação dos respectivos receptores com seus ligantes promove inativação das células T, o que favorece o escape da vigilância imunológica em diversos cânceres, inclusive na SMD (PENG *et al.*, 2022). O uso de Anticorpos Monoclonais (mAbs) que bloqueiam a ligação desses checkpoints imunes apresenta uma nova estratégia de agentes imunoterápicos para tratamento de vários tipos de cânceres, inclusive na SMD.

Embora a terapia com inibidores do checkpoint imune tenha a eficácia clínica comprovada, nem todos os indivíduos se beneficiam com essa terapia, podendo ser classificados como resistentes à imunoterapia (DARVIN *et al.*, 2018). A expressão de PD-1,PD-L1 e CTLA-4 depende de fatores como o microambiente tumoral, carga de mutação tumoral e variações epigenéticas, idade, sexo, exposições ambientais, sedentarismo, obesidade e microbiota intestinal (ZHOU *et al.*, 2022).

Contudo, avaliar a expressão das proteínas PD-1,PD-L1 e CTLA-4 pode ser sugestivo para indicação do uso dos Inibidores do Checkpoint Imune (ICIs), sugerindo uma melhor eficácia em relação a esse tipo de tratamento e evitando assim possíveis reações adversas contra a imunoterapia.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Síndrome Mielodisplástica - Considerações Gerais

As SMD são doenças clonais caracterizadas pelo acúmulo de mutações somáticas devido a alterações no estroma da medula óssea e intensa desregulação imune que contribuem para uma hematopoiese ineficaz, resultando em citopenias, displasias na medula óssea e predisposição a transformação da SMD em Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (SPERLING *et al.*, 2017).

A incidência da SMD na população geral é de 4,5 casos por 100.000 pessoas por ano e aumenta com o avançar da idade. Em indivíduos com idade entre 70 e 79 anos a incidência é de 26,9 casos por 100.000 pessoas por ano, já entre os indivíduos com idade  $\geq 80$  anos a incidência sobe para 55,4 casos por 100.000 pessoas por ano. A SMD também apresenta maior incidência em homens do que em mulheres (6,2 vs. 3,3 por 100.000 pessoas por ano) (PLATZBECKER *et al.*, 2021).

Em crianças, a SMD é rara e representa  $< 5\%$  dos casos de neoplasias hematológicas infantis, sendo a predisposição genética envolvendo mutações na linhagem germinativa e alterações cromossômicas como monossomia do cromossomo 7, os fatores que contribuem para o desenvolvimento da SMD em crianças que geralmente tem um manejo e objetivos de tratamentos diferentes dos adultos (SCHWARTZ *et al.*, 2017; HASLP, 2016).

No Brasil, não há estimativas da incidência da SMD no país, devido às dificuldades de acesso ao diagnóstico e classificação da SMD, a incidência da doença às vezes é notificada abaixo do ideal ou é subnotificada, refletindo em poucos casos registrados (BELLI *et al.*, 2015). O primeiro levantamento epidemiológico da SMD no Brasil, foi realizado por Magalhaes *et al.*, (2010), onde foram avaliados 476 pacientes diagnosticados com SMD em 12 centros brasileiros entre 2003 e 2007 e observou-se um predomínio de pacientes do sexo feminino (50,8%) com a mediana de idade de 68,3 anos (MAGALHAES *et al.*, 2010). Em 2015, de acordo com o levantamento epidemiológico da SMD na América Latina envolvendo centros da Argentina (n=635), Brasil (n=345) e Chile (n=100), realizado por (BELLI *et al.*, 2015), já foi observado um predomínio do sexo masculino (55,94%) com a média de idade de 65 anos.

Quanto à etiologia, a SMD pode ser classificada como de origem primária (de novo) ou secundária associada à terapia prévia como quimioterapia ou radioterapia (T-SMD) (DUARTE, 2016). As SMD(s) de novo representam a maioria dos casos sem a presença de um evento prévio

e têm a idade como principal fator de risco, já as secundárias desenvolvem-se após um evento mutagênico conhecido, exposição ambiental ou ocupacional a vários agentes, como solventes orgânicos, metais pesados e pesticidas, além do tratamento de outras doenças com quimioterapia e radioterapia e corresponde a 10 – 20% dos casos de SMD (YAROSH *et al.*, 2021).

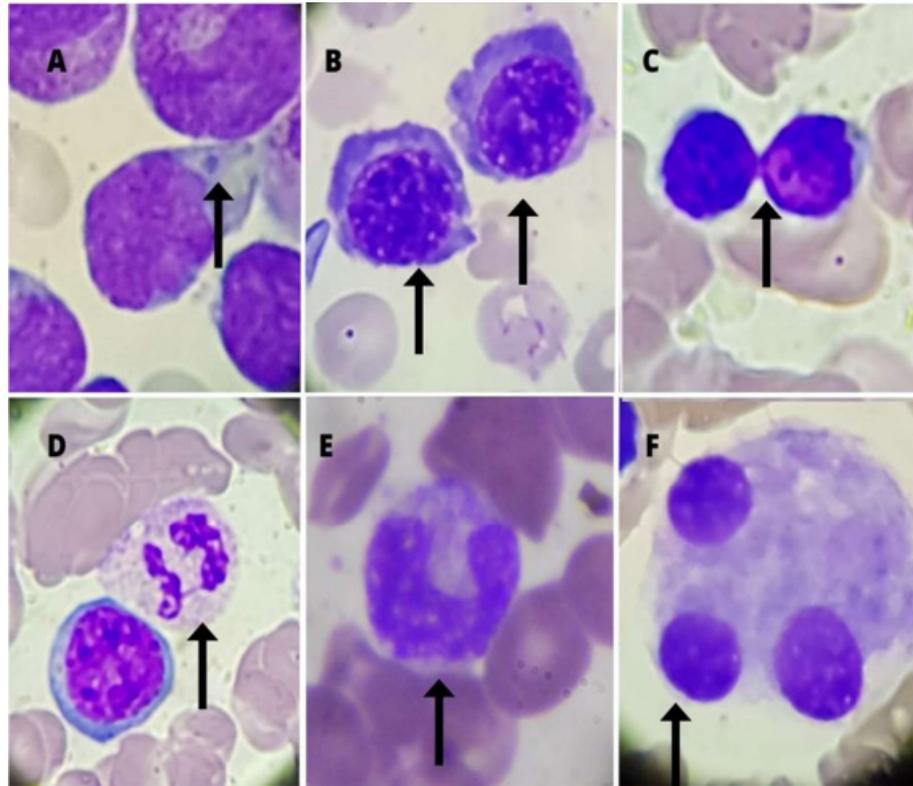
A apresentação clínica dos pacientes com SMD são variáveis, podendo ser assintomáticos ao diagnóstico ou identificados pela presença de citopenias manifestando sintomas clínicos dependendo do tipo de células afetadas, como por exemplo a anemia, fadiga, fraqueza, apatia; sangramentos por trombocitopenia; febres e infecções recorrentes por neutropenia (PLATZBECKER *et al.*, 2021).

Diante disso, o diagnóstico de SMD inicia pela presença de citopenia no sangue periférico, considerado um “*sine qua non*” para o diagnóstico da SMD, sendo identificadas em exames de rotina (GARCIA-MANERO *et al.*, 2020). Os limites recomendados de citopenia incluem hemoglobina  $< 10g/dL$ , contagem de plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$  e contagem absoluta de neutrófilos de  $< 1,8 \times 10^9/L$  (CHOKR *et al.*, 2018).

Além da citopenia, a análise do aspirado medular é essencial pois fornece informações detalhadas da morfologia celular e avaliação da porcentagem de blastos, assim como a determinação da celularidade e arquitetura da medula óssea observadas na biópsia de medula óssea (GARCIA-MANERO *et al.*, 2020).

Na SMD, as alterações morfológicas, ou seja, as displasias podem ocorrer em uma ou mais das linhagens hematopoiéticas. As displasias encontradas na linhagem eritroide são formas megaloblastóides (figura 1.A), multinucleadas ou com lobulação nuclear, picnose da cromatina (figura 1.B), presença de ponte internuclear (figura 1.C), vacuolização e desgaste citoplasmático e presença de sideroblastos em anel. Na linhagem granulocítica, as displasias podem ocorrer na presença de mieloblastos gigantes e bastonetes de Auer (figura 1.A), alterações pseudo-Pelger-Hüet ou hipossegmentação nuclear (figura 1.D), citoplasma anormais, hipogranulação e células gigantes (alteração de Tempka-Braün) (figura 1.E). Já as características displásicas megacariocítica estão os micromegacariócitos, megacariócitos gigantes, mononucleados e binucleados ou com núcleos separados (figura 1.F). As displasias podem variar de leves a aberrantes, sendo considerado um achado significativo quando pelo menos 10% das células em uma determinada linhagem forem displásicas (CHOKR *et al.*, 2018).

Figura 1 – Exemplos de Displasias Presentes em Pacientes com Síndrome Mielodisplásica



Legenda: A) aspirado medular de paciente com LMA a SMD, MO hiper celular com presença de Mieloblasto(seta) com núcleo irregular, nucléolo presente e corpos phi.(seta) B) dois Eritroblastos displásicos com assincronismo maturativo entre o núcleo e citoplasma, desgaste citoplasmático e núcleo aberrante com cromatina com picnose; C). eritroblastos com mitose anômala (*daughter cell*); D. neutrófilo (seta) com hipogranulação e hiposegmentação (ou pseudo Pelger-Huët) e eritroblasto com assincronismo maturativo entre núcleo e citoplasma, com fragmentos nucleares e gigantismo (alteração de Tempka-Braün). E: Metamielócito gigante (ou alteração de TempkaBraün) com assincronismo maturativo; F: megacarioblasto displásico com núcleos separados. Coloração (*Wright-Giemsa*,  $\times 100$ ). Fonte: próprio autor.

A análise de alterações citogenéticas por análise de análise cariotípica convencional de banda G, ou *FISH* também contribui para o diagnóstico, classificação, avaliação de risco e terapia na SMD (ZAHID *et al.*, 2017). Já é bem estabelecido na SMD algumas alterações citogenéticas desequilibradas, que resultam de perda ou ganho de material cromossômico, como por exemplo as monossomias e as deleções dos cromossomos 5 (-5 /del5q) e 7 (-7 /del7q), a trissomia do cromossomo 8 (+8) e deleção do cromossomo Y (-Y) e as alterações citogenéticas raras na SMD, como a deleção do -X, anormalidades 3q, +13/del(13q), i(17q), +21/-21) (ZAHID *et al.*, 2017).

Além disso, a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e o sequenciamento de nova geração, contribuem para o diagnóstico ao detectar genes, com diferentes funções, que estão implicados no desenvolvimento da SMD (KENNEDY *et al.*, 2017). Como por exemplo, as

mutações somáticas em genes envolvidos na regulação epigenética (TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1 / 2), *splicing* de RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2), resposta ao dano ao DNA (TP53) regulação transcricional (RUNX1, BCOR, ETV6) e transdução de sinal (CBL, NRAS, JAK2) foram identificados em pacientes com SMD (GANGAT *et al.*, 2016).

Por se tratar de um diagnóstico complexo, outros métodos diagnósticos, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo, e alguns testes como citoquímica de células da medula óssea (peroxidases, esterases) e a imunohistoquímica, como, por exemplo, a expressão anômala de CD34, CD117 ou da proteína p53 em células imaturas, contribuem para fechar o diagnóstico e manejo da SMD (CHOKR *et al.*, 2018).

Portanto, para concluir o diagnóstico de SMD, deve-se descartar outras condições que causam citopenias e displasias, outras doenças clonais das células tronco hematopoiéticas, doenças infecciosas e autoimunes (SANTOS, 2019) . Além disso, ao diagnóstico podem ocorrer situações em que os achados clínicos e laboratoriais são sugestivos de SMD, mas os achados morfológicos não preenchem os critérios para ser considerado SMD (VALENT, 2019; SANTOS, 2019) . Essas condições são conhecidas como “pré-SMD” e categorizam 4 grupos: Citopenia Idiopática de Significância Desconhecida (ICUS), Displasia Idiopática de Significado Desconhecido (IDUS), Citopenia Clonal de Significância Desconhecida (CCUS) e Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado (CHIP) (Tabela 1). Se o paciente preencher todos os critérios como citopenia, displasia, presença de mutação somática e anormalidade cariotípica clonal, os pacientes podem ser considerados como SMD (VALENT, 2019).

O ICUS caracteriza-se pela presença de citopenias com ausência dos critérios morfológicos considerados para o diagnóstico da SMD (CAZZOLA *et al.*, 2013). A IDUS deve-se à presença de displasia medular >10% sem citopenia periférica. A CCUS é uma condição clonal, em que mutações estão presentes com a citopenia, mas sem displasia. E CHIP ocorre quando as Células-Tronco Hematopoiéticas (HSCs) anormais abrigam mutações encontradas em neoplasias hematológicas detectadas na MO, porém sem evidência de doença hematológica identificada (VALENT, 2019; CAZZOLA *et al.*, 2013). A Tabela 1 resume as características que diferenciam as 4 categorias de “pré-SMD” com a SMD e auxiliam no diagnóstico clínico.

Por ser uma doença heterogênea a SMD é classificada de acordo com os achados clínicos e com isso existem vários tipos sistemas de classificação da SMD, sendo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016, a versão mais amplamente utilizada (GREENBERG, 2023).

Tabela 1 – Características e principais diferenças entre os tipos de pré-SMD e a SMD.

<b>Condição Clínica</b>	<b>Principais características e critérios diagnósticos</b>
<b>ICUS</b>	Presença de citopenia Critérios de SMD não preenchidos Nenhuma mutação relacionada a SMD Nenhuma ou raras displasias (<10%) Blastos <5%
<b>IDUS</b>	Ausência de Citopenia(s) Critérios de SMD não preenchidos Nenhuma mutação relacionada a SMD Presença de displasia em $\geq 10\%$ de neutrófilos, eritróides e/ou megacariócitos Blastos <5%
<b>CCUS</b>	Presença de Citopenia(s) Critérios SMD não preenchidos Presença de uma ou mais mutações relacionadas a SMD Nenhuma ou raras displasias (<10%) Blastos <5%.
<b>CHIP</b>	Ausência de Citopenia(s) Critérios SMD não preenchidos Presença de uma ou mais mutações relacionadas a SMD Nenhuma ou raras displasias (<10%) Blastos <5%.
<b>SMD</b>	Presença de Citopenia(s) Uma ou mais mutações relacionadas a SMD Presença de displasia em $\geq 10\%$ de neutrófilos Eritróides e/ou megacariócitos Blastos <5%

Legenda: Citopenia Idiopática de Significância Desconhecida (ICUS), Displasia Idiopática de Significado Desconhecido (IDUS), Citopenia Clonal de Significância Desconhecida (CCUS), Hematopoiese Clonal de Potencial Indeterminado (CHIP), Síndromes Mielodisplásicas (SMD).  
Adaptado por (VALENT, 2019)

O sistema mais antigo de classificação foi estabelecido pelo Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) em 1976 baseado nos parâmetros morfológicos do sangue periférico e na medula óssea (BORTOLHEIRO, 2006). Em 1982, a Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB), revisou a classificação incluindo além das alterações morfológicas, as displasias no Sangue Periférico (SP) ou na Medula Óssea (MO), a porcentagem de blastos; a porcentagem de sideroblasto em anel na MO; contagem de monócitos no Sangue Periférico (SP) e a presença de bastonetes de Auer, categorizando assim, a SMD em cinco grupos: anemia refratária, anemia refratária com sideroblastos em anel, leucemia mieloide crônica, Anemia Refratária em Excesso de Blastos (RAEB) , e RAEB em Transformação (RAEB-T).

Com intuito de agrupar melhor subtipos com comportamento clínico semelhantes, em

1997 a Organização Mundial da Saúde (OMS) iniciou os estudos para modificar a classificação SMD. Em 2001, a OMS publicou uma nova modificação da classificação da SMD que associa a imunofenotipagem e a genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citológicos utilizados na classificação FAB, classificando a SMD nos seguintes grupos: Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem (RCUD), Anemia Refratária com Sideroblastos Anelados (RARS), Anemia Refratária com Displasia Multilinhagem (RAMD), Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1 (RAEB-1), Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2 (RAEB-2) (RAEB-2), Síndrome Mielodisplásica Não Classificada (MDS-U), SMD associada à deleção isolada 5q e Citopenia Refratária (RC) da infância (GUPTA *et al.*, 2010).

Em 2008 com posterior revisão em 2016, a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) foi revisada de acordo com novos estudos clínicos e laboratoriais, sendo a versão de 2016 a mais amplamente utilizada, esta utiliza critérios morfológicos, de marcadores imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares, com um refinamento relacionado à interpretação da morfologia e caracterização da citopenias, além da adição da informação genética. De acordo com a OMS de 2016 a SMD é classificada como: MDS com Displasia de Linhagem Única (MDS-SLD), MDS com Displasia em Múltipla Linhagem (MDS-MLD), MDS com Sideroblastos em Anel (MDS-RS) (MDS-RS), MDS com Sideroblastos de Única Linhagem (MDS-RS-SLD) (MDS-RS-SLD) e MDS com Sideroblastos de Múltipla Linhagem (MDS-RS-MLD), MDS com Excesso de Blastos (MDS-EB) do tipo 1 e tipo 2, MDS com del(5q) isolado, MDS, Síndrome Mielodisplásica Não Classificada (MDS-U) e Citopenia Refratária (RC) (provisória) (Tabela 2) (BENNETT, 2016).

Em 2022, a OMS lançou um novo esquema de classificação para neoplasias mielóides e histiocíticas/dendríticas, onde as principais diferenças com a classificação de 2016 foram a mudança do termo síndrome mielodisplásica para neoplasias mielodisplásicas, enfatizando sua natureza neoplásica, além disso a classificação da SMD agora está dividida em aquelas com anormalidades genéticas definidoras e aquelas que são morfológicamente definidas com base também na integração de dados morfológicos (citologia e histologia), imunofenotípicos, citogenéticos e moleculares (GREENBERG, 2023). Na SMD definida por alterações genéticas temos SMD com Blastos Baixos e del(5q) Isolado (MDS-5q) . A SMD com Inativação Bialélica de TP53 (MDS-biTP53) e a SMD com Mutação SF3B1 e Blastos Baixos (MDS-SF3B1) que substitui o subtipo anterior de MDS com Sideroblastos em Anel (MDS-RS). Já a SMD definida pela morfologia temos SMD com Níveis Baixos de Blastos (SMD-LB) e SMD com Aumento

de Blastos (SMD-IB). Pacientes sem aumento de blastos são divididas em SMD com Níveis Baixos de Blastos (SMD-LB) e SMD hipoplásica (SMD-h). Pessoas com aumento de blastos são divididas em MDS-IB1, MDS-IB2 e SMD com fibrose (MDS-f). SMD-h e SMD com fibrose (MDS-f) são considerados subtipos distintos, ressaltando a importância da biópsia de medula óssea (ZHANG *et al.*, 2022).

Recentemente, o sistema de Classificação Internacional de Consenso (ICC), também publicou uma classificação da SMD em 2022, categorizando a doença de acordo com anormalidades citogenéticas ou cariotípicas específicas, grau de displasia ou presença de excesso de blastos. Na categoria de SMD com Anomalias genéticas ou cariotípicas específicas temos a SMD com SF3B1 mutado e SMD com deleção do cromossomo 5q. Já a categoria quanto as displasias subdividem em SMD, sem displasia, SMD com displasia unlinhagem, SMD com displasia multilinhagem e na categoria quanto a presença de Blastos, temos a SMD com excesso de blastos e SMD/LMA (ZHANG *et al.*, 2023).

O risco da SMD é avaliado pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) ou por outros escores como o IPSS, o Sistema de Pontuação Prognóstico (WPSS) e o Sistema MD Anderson Comprehensive Scoring (MDA-CSS) (MONTALBAN-BRAVO *et al.*, 2018).

Tabela 2 – Comparação das Classificações da SMD da OMS de 2016 e 2022

<b>OMS - 2016</b>	<b>OMS - 2022</b>
	<b>SMD com anormalidades genéticas definidoras</b>
SMD com del(5q) isolado	SMD com del(5q) isolado
SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA) SMD -SA -DUL SMD -SA -DML	SMD SF3B1 SMD biTP53
	<b>SMD definida pela morfologia</b>
SMD com Displasia em única linhagem (SMD-DUL)	SMD baixo blastos
SMD com displasia multilinhagem (MDS-DML)	SMD hipoplásica
SMD com excesso de blastos (SMD-EB1) (SMD-EB2)	SMD com excesso de blastos (SMD-EB1) (SMD-EB2)
SMD não classificável (SMD-U)	SMD com fibrose
Citopenia refratária da infância (provisória)	Neoplasias mielodisplásicas em crianças

Legenda: Adaptado por (HONG; HE, 2017; ZAHID *et al.*, 2017)

O IPSS e o IPSS-R são os mais utilizados e ambos levam em consideração o número de citopenias, o perfil citogenético e a porcentagem de blastos na medula óssea para agrupar pacientes com SMD em quatro categorias de prognóstico: baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco (PAPPA *et al.*, 2017). A estratificação de risco em muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto risco é fundamental para estabelecer o prognóstico, tratamento, a sobrevida e a transformação em Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (Tabela 3) (MONTALBAN-BRAVO *et al.*, 2018). O recente desenvolvido IPSS-M, inclui ao risco as anormalidades moleculares com dados hematológicos e citogenéticos. Ele ajuda a determinar a sobrevida e a probabilidade de transformação leucêmica dos pacientes com SMD. Essa abordagem mais abrangente permite uma estratificação mais precisa dos riscos e auxilia na tomada de decisões clínicas, como a escolha do tratamento mais adequado para cada paciente (KEWAN *et al.*, 2023).

Tabela 3 – Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD

<b>Variáveis</b>	<b>Escore</b>				
<b>Cariótipo*</b>	Muito Bom	Bom	Intermediário	Ruim	Muito Ruim
<b>Blastos (%)</b>	≤ 2	> 2 a < 5	-	10	
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	≥ 10	8 a < 10	8	-	
<b>Neutrófilos (<math>Imm^3</math>)</b>	≥ 800	800	-	-	
<b>Plaquetas (<math>x10^3/mm^3</math>)</b>	≥ 100	0-100			

Nota: Adaptado de (GREENBERG, 2023)

Tabela 4 – Grupos Prognósticos citogenéticos de acordo com IPSS-R

<b>Grupos Prognósticos</b>	<b>Categorias cromossômicas</b>	<b>Tempo médio de sobrevida (meses)</b>
<b>Muito Bom</b>	del(11q), -Y;	60,8
<b>Bom</b>	Normal, del(20q), del(5q) isolada e dupla, del(12p)	48,5
<b>Intermediário</b>	+8, 7q-, i(17q), +19, +21, qualquer outra alteração isolada ou dupla	25,0
<b>Ruim</b>	inv(3)/t(3q)/del(3q), -7, anormalidades duplas incluindo -7/del(7q), 3 anormalidades	15,0
<b>Muito Ruim</b>	presença de > 3 anormalidades	5,7

Nota: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R). Adaptado de (GREENBERG, 2023)

Tabela 5 – Classificação de Risco segundo o Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R)

<b>Classificação de Risco</b>	<b>Pontuação</b>	<b>Sobrevida Média (anos)</b>
<b>Muito Baixo</b>	$\leq 1,5$	8,8
<b>Baixo</b>	$> 1,5$ a 3,0	5,3
<b>Intermediário</b>	3,0 a 4,5	3,2
<b>Alto</b>	$> 4,5$ a 6,0	1,6
<b>Muito Alto</b>	$> 6,0$	0,2

Nota: Adaptado de (GREENBERG, 2023)

A estratificação de risco pelo escore prognóstico IPSS-R é amplamente utilizada e é essencial para o tratamento da SMD. Os pacientes de baixo risco normalmente apresentam uma doença mais indolente, no qual o tratamento tem o objetivo de apenas melhorar os sintomas de citopenias. Em muitos casos, a anemia e a citopenia requerem reposição de vitaminas, transfusões e tratamento com agentes estimuladores de eritróides (VOLPE *et al.*, 2022). Alguns subgrupos de pacientes com SMD de baixo risco, podem se beneficiar de terapias específicas, incluindo lenalidomida para pacientes com (SMD com deleção 5q), luspatercept em casos de (SMD com sideroblastos em anel), ou terapia imunossupressora na (SMD hipocelular). (BAZINET; BRAVO, 2022)

Na SMD de alto risco, a doença tende a ser mais agressiva, e o tratamento tem como objetivo modificar a história natural da doença e prolongar a sobrevida. Para os pacientes elegíveis, o Transplante Alogênico de Células-Tronco Hematopoiéticas (aHSCT) é a única opção com potencial curativo. Os Agentes Hipometilantes (HMA) como Azacitidina (AZA) ou Decitabina (DAC) são o tratamento padrão para os pacientes de alto risco, com abordagens incluindo quimioterapia intensiva (VOLPE *et al.*, 2022; MONTALBAN-BRAVO *et al.*, 2018; BAZINET; BRAVO, 2022).

Aos pacientes que não respondem ou progridem após o uso dos HMA, existem alternativas como o uso de venetoclax, Células Mieloides Leucêmicas (MCL-1), Inibidores da Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1 (IRAK-4), pevonedistat, seclidemstat e as imunoterapias (BAZINET; BRAVO, 2022).

## 2.2 Fisiopatologia da SMD

O desenvolvimento da SMD é complexo e pode envolver tantos mecanismos genéticos, epigenéticos como imunomediados (DUARTE, 2016). A SMD resulta de uma combinação

de mutações genéticas nas Células-Tronco Hematopoiéticas (HSCs) que podem ser induzidas pelo envelhecimento e/ou ambiente inflamatório, por exposição a agentes genotóxicos, infecções crônicas e/ou CHIP, que podem induzir a desregulação da sinalização imune inata em HSCs, em parte criando um microambiente extremamente inflamatório na MO com o aumento de citocinas contribuindo para a senescência das células tronco hematopoiéticas levando a uma diferenciação celular prejudicada e a morte celular aumentada (BARREYRO *et al.*, 2012).

Os defeitos genéticos na SMD, incluem alterações cromossômicas, mutações genéticas, alterações no número de cópias e expressão anormal de genes (VISCONTE *et al.*, 2014). As alterações citogenéticas clonais e recorrentes como del5q, del 7q, +8, del 20q, dentre outros contribuem para evolução da SMD visto que a instabilidade genômica provocada pelas deleções, translocações de cromossomos podem abranger regiões contendo genes supressores de tumor relevantes para o desenvolvimento da SMD (VISCONTE *et al.*, 2014; SHALLIS *et al.*, 2018). Estas alterações citogenéticas ocorrem em 50% dos casos “de novo” e 70% dos casos T-SMD (SHALLIS *et al.*, 2018). O cariótipo complexo contendo de 3 ou mais defeitos está correlacionado com prognósticos ruins e são observados após quimioterapia/radioterapia e exposição a produtos químicos tóxicos (SHAHJAHANI *et al.*, 2019).

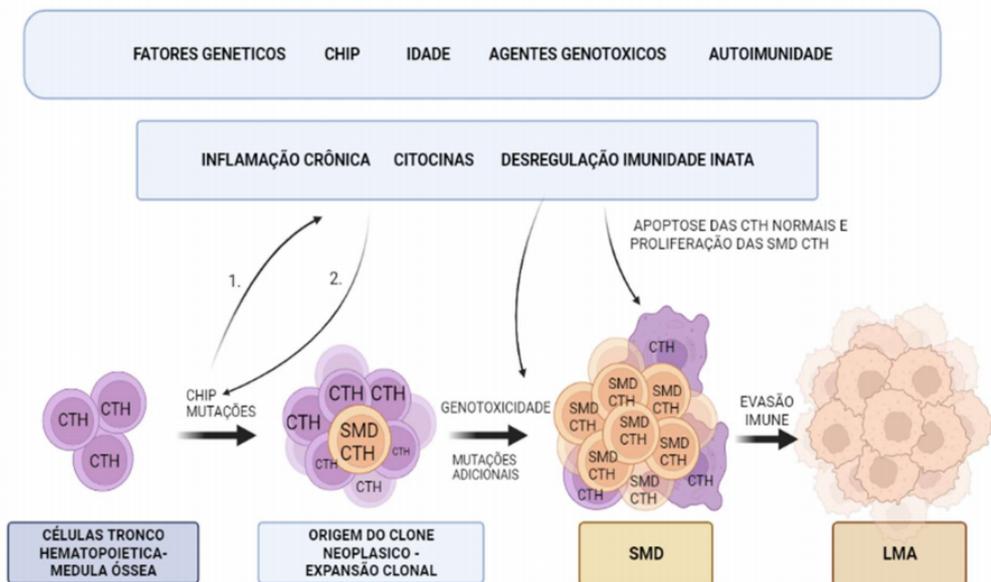
As mutações somáticas nas HSCs estão presentes em 78% dos pacientes com SMD, nos quais carregam pelo menos uma mutação somática e o acúmulo de mutações aumenta a propensão para desenvolver LMA (VISCONTE *et al.*, 2014). Mutações em diversos genes foram identificados e implicados na patogênese molecular da SMD (KENNEDY *et al.*, 2017). Entre eles mutações somáticas nos genes envolvidos na regulação epigenética (TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1 / 2), splicing de RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2), resposta ao dano ao DNA (TP53) regulação transcricional (RUNX1, BCOR, ETV6) e transdução de sinal (CBL, NRAS, JAK2) (GANGAT *et al.*, 2016). Essas mutações genéticas e epigenéticas em blastos conferem a essas células mutantes capacidades de autorrenovação e progressão clonal descontroladas (YANG *et al.*, 2022).

Acredita-se que na SMD, as mutações nesses genes podem ocorrer por pelo menos 2 mecanismos independentes. (1) Mutações associadas ao CHIP (ou seja, mutações nos genes DNMT3a ou TET2) que ocorrem nas HSCs por mecanismos independentes de imunidade inata e conduzem a expansão de HSCs com viés mieloide levando a sinalização imune inata alterada e desenvolvimento de SMD. (2) Outra hipótese seria que a sinalização imune inata prolongada causada por HSCs com viés mieloide expandido clonalmente aumenta diretamente o risco de

adquirir mutações (ou seja, mutações CHIP) que contribuem para a SMD. A desregulação da sinalização imune inata no estágio SMD ocorre através de mecanismos intrínsecos à célula (ou seja, aumento da morte celular via piroptose) e mecanismos extrínsecos da célula (ou seja, estimulação de citocinas e alarminas de macrófagos e Células supressoras Derivadas de Mielóides (MDSCs)). Como resultado da sinalização imune inata alterada, as MDSCs também promovem a ativação de Linfócitos T reguladores (Treg) para limitar a vigilância de células T, com isso as células neoplásicas sobrevivem e proliferam contribuindo para o estabelecimento da SMD (BARREYRO *et al.*, 2012).

Diante disso, a desregulação das vias de sinalização imune e inflamatória no microambiente da MO são importantes no desenvolvimento da SMD (PENG *et al.*, 2022).

Figura 2 – Fisiopatologia da SMD



Legenda: Hipóteses para origem do clone neoplásico e desenvolvimento da SMD. (1) Mutações associadas a CHIP (ou seja, DNMT3a ou TET2) ocorrem nas CTH e impulsionam a expansão de CTH com viés mielóide levando a sinalização imune inata alterada e desenvolvimento de MDS. Ou (2) a sinalização imune inata prolongada causada por CTHs com viés mielóide expandido de forma clonal aumenta o risco de adquirir mutações (CHIP) que contribuem para a SMD. A desregulação da sinalização imune inata, além da expressão das moléculas do check-point imune contribuem para evasão do sistema imune e progressão da doença para LMA. (BARREYRO *et al.*, 2012).

### 2.3 Desregulação Imunológica na SMD

Na medula óssea (MO), a hematopoiese normal é regulada pelo sistema imune por meio da interação entre células T, células da imunidade inata, citocinas e Células Estromais

Mesenquimais (MSCs) e os mecanismos que promovem a desregulação imune na SMD, inclui superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, supressão da MO mediada por células T, ativação excessiva das vias envolvidas na imunidade inata e MSCs alteradas com expressões alteradas (Figura 3). (CHOKR *et al.*, 2018).

Como resultado dessa intensa desregulação imune, na SMD observamos intensa apoptose de células tronco normais que acarreta a citopenia na SMD de baixo risco e escape da vigilância imunológica na SMD de alto risco (SUGIMORI *et al.*, 2010). As células neoplásicas da SMD conseguem evitar a detecção e destruição pelo sistema imunológico através de vários mecanismos. Isso inclui o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, a presença de células T disfuncionais e alterações no estroma do nicho hematopoiético. Além disso, essas células expressam a molécula PD-L1, que libera sinais que impedem a ação das células T citotóxicas. Isso permite que as células neoplásicas evitem a resposta imune e sobrevivam. (Figura 3) (WAKI *et al.*, 2014).

A expressão anormal de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento contribuem para o desenvolvimento da SMD. Nesta, pelo menos 30 citocinas apresentam alterações na sua expressão tanto no sangue periférico como na medula óssea BM dos pacientes, estando relacionados ao desfecho clínico da SMD. Observa-se níveis aumentados de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Fator de Crescimento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Interleucina (IL) IL-6, IL-8, IL-32 e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Macrófagos (GM-CSF) em pacientes com SMD, e seus níveis de expressão podem estar relacionados ao resultado a desregulação na diferenciação mielóide e na sinalização inflamatória (BARREYRO *et al.*, 2012; WARLICK; MILLER, 2011). No entanto, a secreção anormal de citocinas é diferente na SMD com diferentes estratificações de risco (PENG *et al.*, 2022)

Em pacientes com SMD de baixo risco, os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-12 e IL-17 aumentam e induzem a apoptose de HSCs normais na MO. Já na SMD de alto risco, as Células supressoras Derivadas de Mielóides (MDSCs) da MO secretam muitas citocinas imunossupressoras, como IL-10, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ , fazendo com que as células tumorais escapem da vigilância imunológica (PENG *et al.*, 2022). Além disso, existem muitas citocinas desreguladas no microambiente imunológico da BM da , mas o mecanismo regulatório específico e o impacto no prognóstico ainda não estão claros, o que requer mais pesquisas. (PENG *et al.*, 2022)

Os linfócitos T são as células que participam da imunidade mediada por células

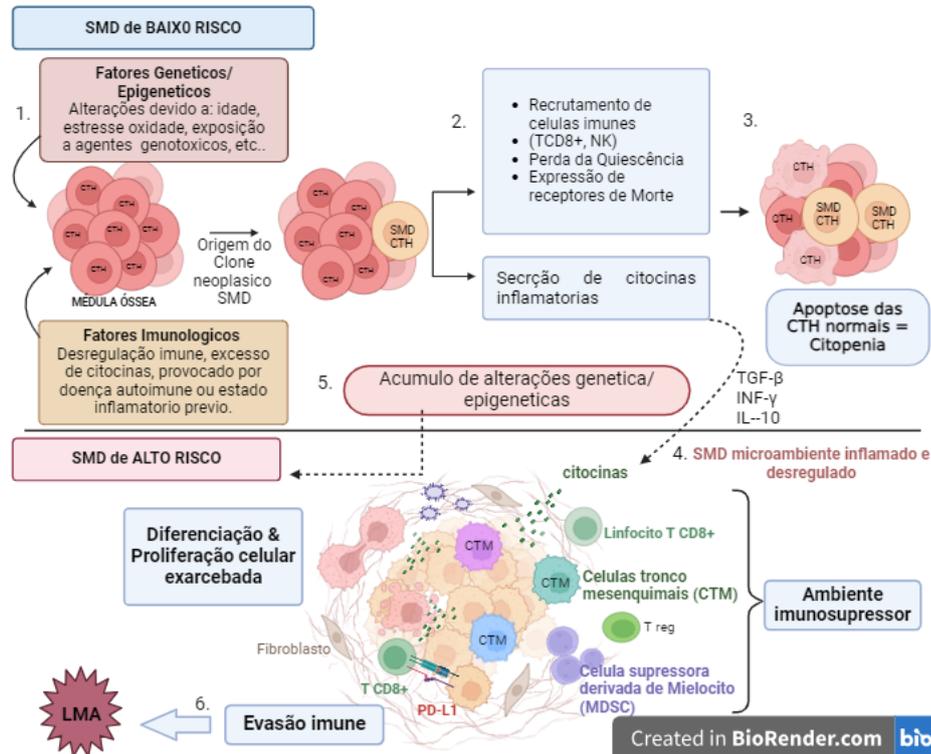
e da imunidade humoral. A linfocitopenia T é muito comum em pacientes com SMD, e sua expressão também difere de acordo com a estratificação de risco. Os linfócitos T CD8+, também chamados de Linfócito T Citotóxico (CTL), são as células T efetoras da imunidade antitumoral porque atacam diretamente as células tumorais. Na SMD de baixo risco, ocorre a ativação dos linfócitos T CD8+, que são estimulados a se multiplicar. Esses linfócitos inibem a hematopoiese, ou seja, a formação de células sanguíneas, tanto normais quanto neoplásicas, a partir das células Trono Hematopoiéticas (CTHs). Isso resulta na indução de apoptose intramedular, um processo de morte celular programada. principalmente na SMD de alto risco, as células TCD8+ após ativadas passam a expressar um receptor, a proteína de Morte Programada 1 (PD-1), uma molécula inibitória responsável por manter autotolerância da ativação imune, mas na SMD é superexpressam e contribui para o escape das células tumorais da imunovigilância. As células Treg também são reguladores do sistema imunológico com função imunossupressora e na SMD de baixo risco está diminuída e podem ser usadas como um fator prognóstico para prever o grau de anemia, a taxa de transformação de Acute Myeloid Leukemia (AML) e a Overall Survival (OS) (PENG *et al.*, 2022).

As Células Naturais Killers (NK) também participam da imunidade inata quanto do sistema de imunidade adaptativa. e tem função antitumoral com efeito de morte direta e na SMD, as células NK no sangue periférico e MO estão diminuídas significativamente, o que consequentemente contribui para a progressão da doença (PENG *et al.*, 2022). Acredita-se que o microambiente supressor na SMD prejudica ainda mais a função das células NK e a imunoterapia seria uma estratégia para modular as células NK aumentando a citotoxicidade contra as células cancerígenas na SMD. (ARELLANO-BALLESTERO *et al.*, 2023). As Células Estromais Mesenquimais (MSCs) são o componente chave do microambiente da MO em pacientes com SMD e são importantes na manutenção da estabilidade imunológica ao regular negativamente a intensidade da resposta imune. Na SMD de baixo risco induz a proliferação e ativação excessivas de células T na MO e libera muitas moléculas pró-inflamatórias para induzir apoptose das HSCs normais. na SMD de alto risco as MSCs são imunossupressoras e induzem a expressão aumentada de TGF- $\beta$  e capacidade de induzir Treg e inibir a proliferação e ativação de células T. (PENG *et al.*, 2022). As Células supressoras Derivadas de Mielóides (MDSCs) são estruturas imunológicas que foram descobertas recentemente e têm efeitos inibitórios na imunidade. As MDSCs exacerbam os defeitos de diferenciação induzindo desvio mielóide matando precursores eritroide, e suprimem a resposta autoimune por Células T CD8+ bem como provavelmente

participando da mudança para um microambiente imunotolerante (GAÑÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015).

Os checkpoints imunológicos são moléculas regulatórias responsáveis por manter a auto-tolerância imune. Os mais relevantes na SMD são a proteína de Morte Programada 1 (PD-1) e seu ligante PD-L1, a proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos CTLA-4, a mucina-3 de imunoglobulina de células T (TIM-3) a imunoglobulina de células T e o domínio ITIM (TIGIT) e o gene de ativação de linfócitos-3 (LAG-3). Esses *checkpoints*, na SMD, estão desregulados e contribuem para um microambiente supressor que protege as células cancerosas da destruição imune (WAKI *et al.*, 2014). Por exemplo, as células neoplásicas de origem mielóide na SMD exploram esses pontos de verificação imunes e superexpressam os ligantes dos *checkpoints*, como PD-L1, B7-1, B7-2 e CD47, para regulação positiva inibitória, facilitando sua sobrevivência, longevidade e proliferação (LINDER; LULLA, 2021). Diversos estudos demonstraram a função dinâmica da sinalização PD-1/PD-L1 na promoção da leucemogênese em SMD/LMA, aumentando a atenção para esse campo (YANG *et al.*, 2022; LINDER; LULLA, 2021; BODDU *et al.*, 2017)).

Figura 3 – Mecanismos de desregulação imune na SMD



Legenda: (1) Na SMD de baixo risco, fatores genéticos, ambientais e a desregulação imune alteram o microambiente das células Trono Hematopoiéticas (CTHs)), dando origem a um clone neoplásico da SMD. (2) As células MDS neoplásicas (CTHs SMD) expressam receptores imunológicos que induzem a expansão clonal de células T CD8+ e NK. (3) As células T CD8+ produzem citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que contribuem para a apoptose, resultando em citopenias. (4) A constante liberação de citocinas pró-inflamatórias torna o microambiente da MO imunossupressor devido à presença de Células supressoras Derivadas de Mielóides (MDSCs), células-tronco Mesenquimais Circulantes (CTM), Linfócitos T reguladores (Treg) e células T CD8+. (5) Com o acúmulo de aberrações genéticas/epigenéticas adicionais e a inflamação contínua, as citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzem a expressão de PD-L1 em células clonais de SMD. (6) O PD-L1 permite que as células MDS escapem da vigilância imunológica pela supressão de células T, contribuindo assim para a evolução da SMD para Leucemia Mieloide Aguda (LMA). (CHOKR *et al.*, 2018; GAÑÁN-GÓMEZ *et al.*, 2015)

## 2.4 Check- Point Imune

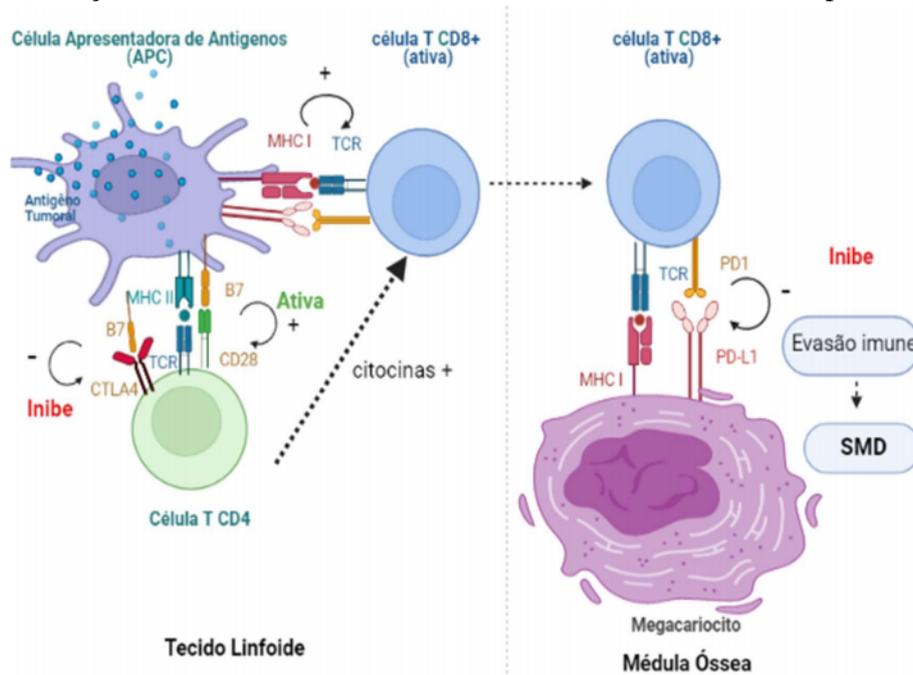
No sistema imunológico é um requisito fundamental distinguir o próprio de não-próprio. Portanto, os ‘checkpoints imunológicos’ ou “pontos de verificação imune” são mecanismos com características inibitórias ou estimulatórias responsáveis por manter a autotolerância, regulando a ativação das células T em diferentes estágios e assim auxiliam na resposta imune (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018; BUCHBINDER *et al.*, 2016)

No presente estudo, daremos ênfase aos check-point de natureza inibitória mais descritos na SMD, que incluem a Antígeno 4 Associado a Linfócito T Citotóxico (CTLA-4), o

receptor 1 de morte celular programada PD-1 e o ligante 1 de morte celular programada PD-L1 (MARIN-ACEVEDO *et al.*, 2018).

As células T para serem ativadas requerem dois sinais: Na ativação das células TCD4 helper, primeiro sinal é o reconhecimento do antígeno pelo Receptor de Células T (TCR) após a apresentação do antígeno por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II na superfície das Células Apresentadoras de Antígeno (APCs) e, de um segundo sinal, que é a ligação da molécula por CD80 ou CD86 (B7) ao receptor CD28 e em seguida a citocina IL-2 é secretada para conferir expansão clonal e diferenciação em células com funções efetoras (ABBAS *et al.*, 2015). Após ativação da célula TCD4+, o CTLA-4 é expresso e migra para a superfície das células T e compete com o receptor CD28 para se ligar a CD80 ou CD86(B7-1 e B7- 2) bloqueando assim a ativação das células TCD4. As células TCD8 (citotóxica) também é ativada após ligação do TCR com MHC de classe I presente nas APCs (ABBAS *et al.*, 2015). E após ativação, dentro de horas a dias, as células T ativadas também começam a expressar o receptor co-inibitório PD-1. As células TCD8 no Microambiente Tumoral (TME) produz interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que induz a expressão de PD-L1 em macrófagos e nas células tumorais. E quando o receptor PD-1 se ligar ao seu ligante PD-L1 as Células TCD8 +PD-1 + serão funcionalmente desativadas favorecendo o escape da vigilância imune e como consequência evolução para neoplasia (TOPALIAN *et al.*, 2016). (Figura 4)

Figura 4 – Ativação das células T CD4 e CD8 e dos mecanismos de check-point imune na SMD.



Legenda: CTLA4: Antígeno Citotóxico T-Linfócito 4, MHC-I: complexo Principal de Histocompatibilidade classe I, MHC-II: complexo Principal de Histocompatibilidade classe II, PD1: receptor de Morte Programada - 1, PD-L1: Ligante 1 do receptor de morte programada, TCR: Receptor de célula T (TOPALIAN *et al.*, 2016)

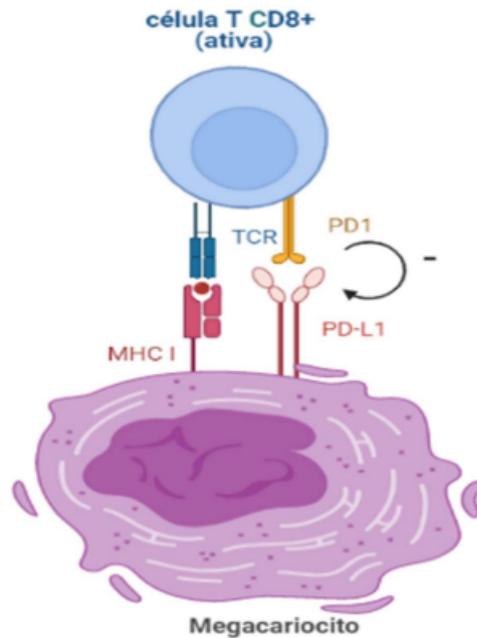
#### 2.4.1 Receptor de Morte Programada 1 (PD-1)

O PD-1 é um receptor co-estimulatório pertencente a família B7, onde sua principal função é regular as respostas efetoras das células T previamente ativadas, principalmente nos tecidos periféricos em relação à infecção, inflamação e limitar a autoimunidade (Figura 5) (DONG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). A expressão de PD-1 está presente nas células T efetoras, nas Linfócitos T reguladores (Treg), nas células B ativas e virgens, nas células natural killer, nas células dendríticas mielóides e nos monócitos de baixa intensidade (DONG *et al.*, 2017).

A proteína PD-1 é codificada pelo gene PDCD1, localizado no locus 2q37.3 (VOENA *et al.*, 2016). A expressão de PD-1 nas células T é regulada pela metilação do Ácido Desoxribonucléico (DNA), em circunstâncias normais, a desmetilação do promotor da PD-1 parece ser mediada pela ligação do Receptor de Células T (TCR) (BALLY *et al.*, 2016). Em processos infecciosos e no câncer, o promotor PD-1 permanece não metilado com superexpressão contínua de PD-1 nas células T ativadas, levando a disfunções (ØRSKOV *et al.*, 2015). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com HMA aumentam a expressão de PD-1

em células T ativadas e de PD-L1 em tumores (YANG *et al.*, 2014).

Figura 5 – Receptor de morte Programada 1 PD-1 e seu ligante PD-L1



Legenda: MHC-I: complexo Principal de Histocompatibilidade classe I, PD-1: receptor de Morte Programada - 1, PD-L1: Ligante 1 do receptor de morte programada, TCR: Receptor de célula T (TOPALIAN *et al.*, 2016)

#### 2.4.2 Ligante do Receptor de Morte Programada 1 PD-L1

Os dois ligantes para PD-1 são conhecidos atualmente, o PD-L1 (B7-H1) e o PD-L2 (B7-DC). Em circunstâncias normais, ambos são expressos constitutivamente por vários tipos de células hematopoiéticas, incluindo macrófagos, células dendríticas, células T, células B, mastócitos megacariócitos e alguns tipos de células não hematopoiéticas, como células endoteliais vasculares. Além disso, PD-L1 pode ser regulado positivamente em vários tipos de células em resposta a citocinas inflamatórias e outros estímulos, sendo muitas vezes superexpresso em vários tipos de células cancerígenas e/ou células estromais tumorais. (JELINEK *et al.*, 2017; WAKI *et al.*, 2014).

A expressão de PD-L1 é induzida via fosforilação das STAT3 e STAT5 que aumenta a atividade do promotor PD-L1 e a expressão da proteína PD-L1 em vários tipos de células, incluindo megacariócitos, que normalmente conduzem a doença mieloproliferativas (Figura 5) (PRESTIPINO; AL., 2018). A interação da proteína PD-1 com os ligantes PD-L1/PD-L2 inibe a proliferação de células T e a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  e

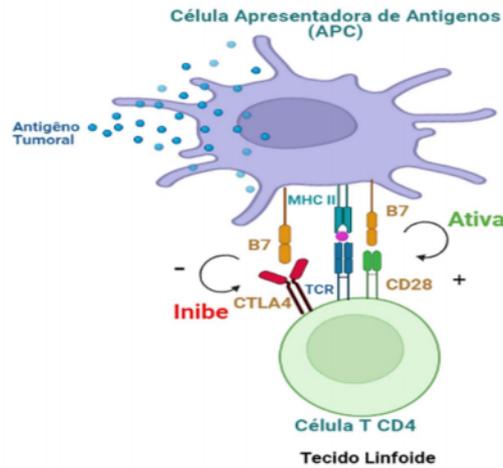
IL-2 e reduz a sobrevivência de células T (ROEMER *et al.*, 2016). Além disso, a PD-1 também tem um papel na regulação das respostas de células B e monócitos.(SALMANINEJAD *et al.*, 2018).

O ligante PD-L1 é codificado pelo gene CD274, localizado no cromossomo 9p24.1 (STRAUB *et al.*, 2016) . Sua expressão é observada em leucócitos, células não hematopoiéticas e tecidos não linfoides, podendo ser induzida por citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$  ou vias de sinalização tumorigênicas (BUCHBINDER *et al.*, 2016). Além disso, a expressão de PD-1 também pode ser induzida pelo tratamento com hipometilantes, como a azacitidina (WRANGLE *et al.*, 2013). PD-L1 é encontrado em diferentes tipos de tumores e está associado a um aumento na quantidade de Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TILs) e pior prognóstico (GRAVELLE *et al.*, 2017).

### **2.4.3 Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4)**

O CTLA-4 é homólogo a CD28, sendo expresso principalmente em células T ativadas e células tumorais e tem função de interromper as células T potencialmente autorreativas normalmente nos gânglios linfáticos (BUCHBINDER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2014). Inibição via CTLA-4 ocorre após a ativação das células T quando os Receptor de Células T (TCR) se ligam ao antígeno exibido no complexo MHC das células apresentadoras de antígeno em conjunto com a coestimulação mediada pela ligação de CD28 a B7. Se o estímulo da ligação de TCR for forte, a expressão de CTLA-4 é regulada positivamente pelo aumento do transporte para a superfície celular a partir de reservas intracelulares no qual o CTLA-4 compete com o CD28 pela ligação de moléculas B7 resultando num sinal negativo, o que limita a produção e proliferação de IL-2 e limita a sobrevivência da célula T (BUCHBINDER *et al.*, 2016). Portanto, o bloqueio do CTLA-4 pode restaurar a resposta imune (YANG *et al.*, 2014).

Figura 6 – Receptor da molécula 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) presente nas células TCD4.



Legenda: CTLA4: Antígeno Citotóxico T-Linfócito 4, B7: proteína ligante co-estimulatória, CD28 receptor co-estimulatório de células T, MHC-II: complexo Principal de Histocompatibilidade classe II, TCR: Receptor de célula T (TOPALIAN *et al.*, 2016)

## 2.5 Imunoterapia

A imunoterapia tornou-se uma alternativa promissora no tratamento do câncer (YANG *et al.*, 2014). James P. Allison e Tasuku Honjo receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2018 pela descoberta do tratamento que suprime a imunomodulação contra o câncer, melhorando a especificidade e a eficácia do sistema imunológico contra as células cancerígenas. Estudos sobre os *checkpoints* imunes PD-1, PD-L1 e CTLA-4 sugerem que a inibição dessas moléculas pode reativar as células T e eliminar as células cancerígenas de forma mais eficiente (HAN *et al.*, 2020).

Os Anticorpos Monoclonais (mAbs) são utilizados para bloquear o receptor PD-1, bloqueando a ligação das moléculas co-inibitórias CTLA-4, PD-1 e seu ligante PD-L1 (HAN *et al.*, 2020). A imunoterapia com inibidores de *checkpoints* imunológicos tornou-se um alvo importante para o tratamento de diversos tipos de neoplasias sólidas e hematológicas, incluindo linfoma de Hodgkin clássico (cHL), Linfoma Não-Hodgkin (NHL), Mieloma Múltiplo (MM), Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e SMD. (YANG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2022; LINDER; LULLA, 2021; HAN *et al.*, 2020; DAVER *et al.*, 2018).

Em tumores sólidos, a carga mutacional, a quantidade de células T CD8+ infiltrantes e a expressão de PD-L1 são fatores preditivos da resposta imunoterápica com inibidores de *checkpoints* imunológicos (WARLICK; MILLER, 2011). Em pacientes com SMD, estudos sobre

a expressão desses *checkpoints* mostraram aumento dessas proteínas em pacientes refratários ou recidivantes à terapia com Agentes Hipometilantes (HMA) Azacitidina (AZA) e Decitabina (DAC).

O tratamento com azacitidina resulta na hipometilação do promotor PD-1 e o status de metilação do DNA está inversamente correlacionado com a expressão da proteína PD-1, ou seja, com o uso dos hipometilantes, o promotor fica hipometilado e aumenta a expressão de PD-1 nas células T, contribuindo para a exaustão das células T específicas do tumor (DAVER *et al.*, 2018).

O nivolumab e o pembrolizumab são exemplos de anticorpos monoclonais que bloqueiam o PD-1 nas células T, mostrando eficácia clínica em vários tumores sólidos (GARCIA-MANERO *et al.*, 2016). Estudos com o uso do nivolumab/pembrolizumab em combinação com azacitidina em pacientes com SMD mostraram eficácia clínica em pacientes refratários ou recidivantes (GARCIA-MANERO *et al.*, 2016).

Os inibidores de *checkpoints* imunológicos atualmente testados em ensaios clínicos em combinação com azacitidina na SMD e LMA incluem os anti-PD-1 nivolumab, pembrolizumab, os anti-CTLA-4 ipilimumab e tremelimumab em células T, os anti-PD-L1 durvalumab, atezolizumab em células apresentadoras de antígeno e células tumorais, e os anti-receptores KIR (lirimumab) em células NK (DAVER *et al.*, 2018)

Embora a terapia com Inibidores do Checkpoint Imune (ICIs) tenha eficácia clínica comprovada, nem todos os pacientes respondem a essa terapia. Cada paciente é único, com um perfil genético de mutações e uma história clínica que pode afetar a resposta ao tratamento com ICIs (ERAUSO *et al.*, 2020). Alguns pacientes apresentam Eventos Adversos Relacionados ao Sistema Imunológico (IRAEs) após o uso dos ICIs e esses eventos afetam cerca de 30 a 90% dos pacientes. Os IRAEs podem acometer diferentes órgãos como cutâneo, pulmonar, renal, oftalmológico reumatoide, hematológico, dentre outros, com graus variáveis de gravidade e com potencial fatal (PENG *et al.*, 2022).

Além disso, a maioria dos pacientes tratados com ICIs recaem ou apresentam resistência intrínseca ou resistência adquirida imunoterapia (ERAUSO *et al.*, 2020). Dentre os casos de resistência aos ICIs temos a doença hiperprogressiva, caracterizada por uma aceleração drástica inesperada no crescimento do tumor após o início da terapia com consequências fatais. Além disso, temos a pseudoprogressão que ocorre em pacientes respondedores, onde os ICIs provocam infiltração massiva de células imunes no tumor acarretando uma progressão de lesões

neoplásicas (ERAUSO *et al.*, 2020).

Ou seja, a eficácia dos inibidores do check-point pode ser atribuída a uma série de mecanismos que podem diferir de acordo com o tipo de tumor e a fatores específicos do paciente. Portanto, existem fatores intrínsecos da célula tumoral e extrínsecos específicos do paciente que contribuem para o sucesso no tratamento com os ICIs (HUDSON *et al.*, 2020). Dentre os fatores intrínsecos, temos a antigenicidade insuficiente do tumor, expressão constitutiva de PD-L1, defeitos na transdução do sinal de IFN nas células cancerígenas e alterações na regulação das vias oncogênicas. Já os fatores extrínsecos do tumor ligados ao sistema imunológico são, esgotamento irreversível de células T, expressão de outros check-point e seus ligantes (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, VISTA e BTLA), diferenciação e expansão de células imunossupressoras e a quantidade de citocinas imunossupressoras e metabólitos no microambiente tumoral (ZHOU *et al.*, 2022).

A expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 são mecanismos intrínsecos das células cancerígenas que regulam vários mecanismos pró-carcinogênicos como: inibir as atividades efetoras de células T, servir como escudo anti-apoptótico e como recrutador de MDSCs para tornar o microambiente tumoral imunossupressivo (ZHOU *et al.*, 2022)

Diante disso, a expressão do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 são biomarcadores reconhecidos para a estratificação de paciente elegíveis e responsivos para a imunoterapia, principalmente aos pacientes refratários às terapias convencionais na SMD. (TOPALIAN *et al.*, 2016).

Alguns ensaios de imuno-histoquímica para quantificar a expressão de PD-L1 são atualmente aprovados pela FDA, como Dako 28-8, Dako 22C3, Ventana SP142 e Ventana SP263. No entanto, não são atualmente padronizados, pois cada ensaio é diferente e apresenta sistemas de pontuação e classificações para detectar o PD-L1. Além disso, a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 podem ser altamente variáveis e heterogêneas, o que dificulta a análise por imunohistoquímica. Alguns pacientes com tumores PD-L1 negativos são responsivos a terapias anti-PD-L1/PD-1, pois PD-L1 também é expresso por muitos outros tipos de células, incluindo células apresentadoras de antígenos mielóides. Contudo a associação da análise por imunohistoquímica com PCR em tempo real, além de análise por PET Scan de tumores e metástases marcados com sondas provavelmente resolverão esses problemas. (ERAUSO *et al.*, 2020)

Diante disso, a identificação de biomarcadores verdadeiramente preditivos e prognósticos de resposta é atualmente uma prioridade na prática clínica. Ressalta-se a importância

da investigação do perfil individual de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 por imunohistoquímica e por PCR em tempo real como fator indicativo de tratamento com inibidores do *checkpoint* imunológico na SMD para uma melhor qualidade de vida, evitando os eventos adversos e efetivando o uso dos ICIs para diminuir os casos de recaídas e resistências dos pacientes tratados com inibidores do *checkpoint* imunológico (PINTO, 2015).

Contudo, o presente estudo vai beneficiar os pacientes do HEMOCE, pois este é primeiro estudo a avaliar o perfil de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com SMD no nordeste brasileiro. Assim como trará uma alternativa de um biomarcador para o tratamento da SMD para que possam ajudar a selecionar os pacientes evitando toxicidades significativas e reduzindo os custos com o uso inadequado dos ICIs. Além disso, o presente estudo servirá de base para novas análises para efetivar o uso dos ICIs, além de avaliar a combinação com outras terapias, como quimioterapia, radioterapia, células CAR-T ou outros *checkpoints* para obter resultados clínicos duradouros para os pacientes com SMD.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Estudo da expressão gênica e proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com Síndromes Mielodisplásicas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a frequência da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com SMD;
- Avaliar a expressão dos genes PD-1 (PDCD1), PD-L1 (CD274) e CTLA-4 (CD152) em pacientes com SMD.
- Associar o perfil de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-44 com: sexo, idade, cariótipo, citocinas e sistema Internacional de Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R);
- Associar os perfis de expressões com a sobrevida dos pacientes com SMD.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará, com o CAAE: 95298618.6.0000.5054, sob o nº de parecer 2.889.524 sendo desenvolvido seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes receberam as orientações acerca do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **4.2 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo transversal, analítico e descritivo da avaliação da expressão gênica e proteína de PD-1 (PDCD1), PD-L1 (CD274) e CTLA-4 (CD152) em pacientes com SMD associando-os aos marcadores clínicos, escores prognósticos e com o tratamento.

### **4.3 Casuística**

Foram analisados 34 pacientes adultos com SMD atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e 12 amostras de voluntários saudáveis (doadores de sangue do HEMOCE) no período de novembro de 2019 a dezembro de 2021. Desses, 23 pacientes realizaram análise da expressão proteica e 21 pacientes realizaram análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

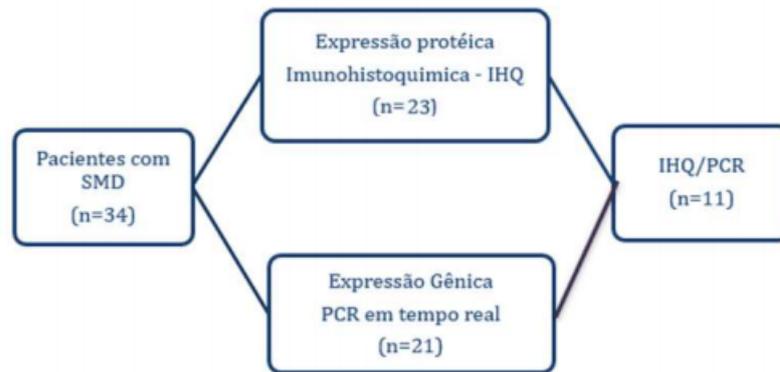
#### **4.3.1 Critérios de Inclusão**

- Paciente com diagnóstico confirmado de Síndrome Mielodisplásica.
- Pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos.
- Paciente com tratamento oncológico realizado no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).
- Paciente com Biopsia de medula óssea suficiente para realizar a pesquisa armazenados no departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes em terapia com inibidores de check-point.
- Biopsia medula óssea danificada ou insuficiente.

Figura 7 – Fluxograma do estudo



Legenda: Síndrome Mielodisplásica (SMD); Fonte: Próprio autor.

### 4.4 Coleta de dados e de material biológico

Os dados foram coletados através de consulta em prontuários. Foram coletados dados como idade, sexo, hemograma, mielograma, biopsia de medula óssea, classificação e estratificação de risco e tratamento.

Para análise de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 por imunohistoquímica, foi solicitada a autorização para utilização de uma amostra da biopsia de medula óssea em bloco de parafina obtida no momento do diagnóstico e que se encontra armazenada no departamento de patologia da UFC.

Para expressão gênica do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 por PCR em tempo real, uma amostra de 5 mL de sangue periférico foi obtida com uma seringa e agulha descartáveis, quando o paciente foi realizar o hemograma, previamente solicitado pelo médico para sua consulta de acompanhamento. A coleta foi realizada por um profissional capacitado do HUWC/HEMOCE.

### 4.5 Análise imuno-histoquímica da proteína PD-1, PD-L1 e CTLA4

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada no departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, de forma automatizada com o equipamento *Autostainer Plus* (DAKO®). Para a análise da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foram utilizadas

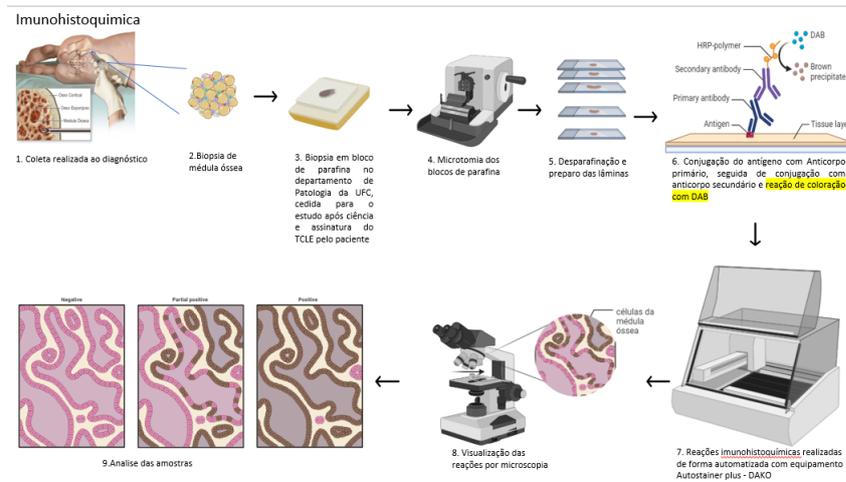
biópsia de Medula Óssea (MO) em bloco de parafina de cada paciente diagnosticado com SMD e como controle positivo foi utilizado tecido de amígdala e para controle negativo foi utilizado um tecido de paciente saudável, ou seja, sem o diagnóstico de SMD.

As biópsias de MO foram seccionadas por microtomia no departamento de morfologia e as lâminas foram confeccionadas com cortes em triplicata com espessura de  $4\mu m$  para a realização da Imunohistoquímica. As amostras de MO cortadas foram desparafinizadas com inserção em estufa ( $70^{\circ}C$ ) e três ciclos de imersão em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em álcool absoluto. Os cortes histológicos foram então lavados com água destilada por 10 minutos e em seguida foi realizada a recuperação antigênica utilizando o *PT Link (Dako)* com  $99^{\circ}C$  por 20 min. Os tampões de recuperação antigênica utilizados foram o *EnVision Flex Target Retrieval Solution High pH - K8000*. Esse tampão é 50x diluível e serve para que o tecido fique livre de formol para poder receber e se ligar ao anticorpo primário.

Em seguida, os cortes foram lavados com solução de lavagem *tris Buffered Saline Plus tween 20* (pH = 7,4) por 5 minutos em temperatura ambiente. Dando continuidade ao protocolo, realizou-se o bloqueio enzimático com kit *peroxidase block for image Analysis* por 5 minutos. Em seguida, aos cortes foram adicionados o (*Supre Block 8ml*) por 5 minutos, que reforça ainda mais o bloqueio enzimático e a cada etapa descrita foram realizadas uma lavagem com a solução *tris buffered* por 4 minutos.

Os cortes foram incubados *overnight* ( $4^{\circ}C$ ) com o anticorpo primário anti-PD1 (Scy-Tek®), anti-PDL1 e anti-CTLA4 (ABclonal®) e por 20 minutos diluídos em 1:800, 1:1000 e 1:1000, respectivamente, em *Antibody Diluent Tris, Green*. Após a lavagem com Tampão salino de fosfato (PBS), adicionou-se o *CRF TM Anti-Polyvalent HRP* por 20 minutos para melhorar a visualização da ligação do anticorpo primário com o antígeno. Após nova lavagem, seguiu-se a revelação por meio da coloração com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Scy-Tek®, uma gota de DAB para um mL de diluente), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Gil (DAKO®) por 10 minutos. O DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Por fim, realizou-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas com *entelan*.

Figura 8 – fluxograma da reação de Imunohistoquímica para análise das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4



Legenda Imunohistoquímica; Fonte: Proprio Autor

#### 4.6 Interpretação da expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4

A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 apresentam perfil de marcação de membranas e citoplasmática, no qual o anticorpo anti-PD1 marca as células T e células NK, o anti-PD-L1 marca as células mieloides displásicas e células em proliferação, já o anti-CTLA4 marca somente células T. A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi revisada e pontuada de forma independente por dois analistas. Casos discrepantes foram analisados até que um consenso fosse alcançado. O tecido da amígdala com positividade conhecida para PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi utilizado como controle positivo e o tecido de medula óssea de paciente saudável foi utilizado como controle negativo (n=3).

Para a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4, foi considerado positivo quando  $\geq 1\%$  de células foram marcadas. Para PD-1, CTLA-4 foram considerados positivos pequenas células marcadas, ou seja, linfócitos. Para PD-L1 foram consideradas positivas células gigantes, em proliferação, megacariócitos, células com grânulos. Devido a marcações inespecíficas fibrina, células endoteliais e adipócitos que coraram variavelmente para PD-L1, e não foram consideradas neste estudo.

Portanto, diante da positividade e da variação da intensidade da marcação dos anticorpos anti-PD-1, anti PD-L1 e anti-CTLA4 foi elaborado um escore de positividade levando em consideração a quantidade de células positivas expressa em porcentagem e a intensidade de coloração. Para isso foi realizada a varredura total da lâmina, contando até a 100 células, considerando negativa a ausência total de células marcadas, fraca intensidade quando se observa

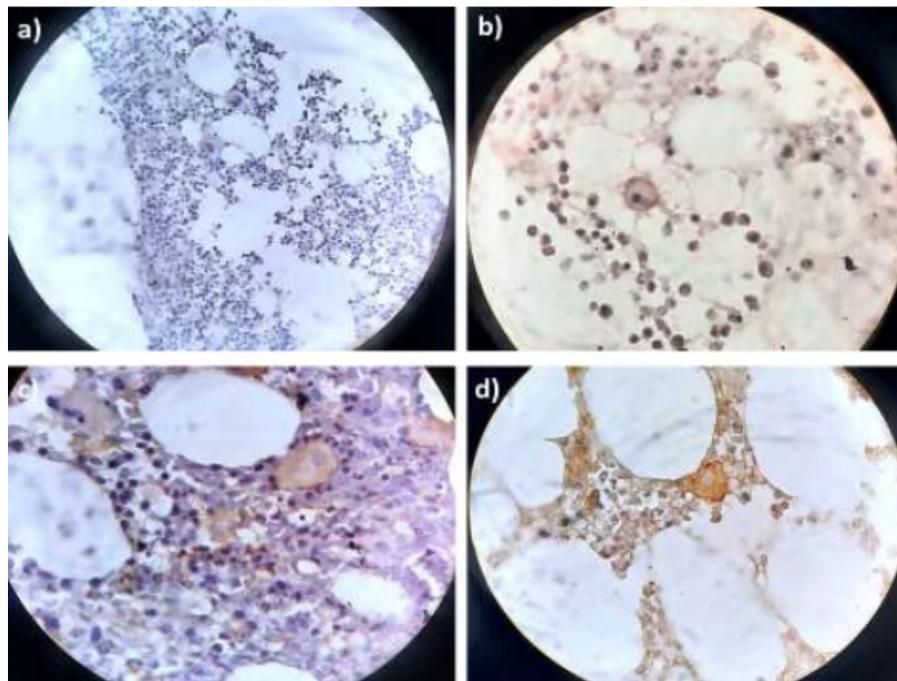
marcação em até 10% de células, foi considerado de intensidade moderada marcações entre 11% e 50% das células e marcação de intensidade forte quando mais de 50% de células foram marcadas de acordo Tabela 6. (PINTO, 2015). Casos representativos de várias intensidades de coloração são ilustrados na Figura 9

Tabela 6 – Escore de positividade (EP) das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4

<b>A (porcentagem de células positivas)</b>	<b>B (intensidade de coloração)</b>	<b>Status</b>
0 = células negativas	0 = ausência de coloração	0 = negativo
1 = 1-10% células positivas	1 = reação fraca	1 = positivo
2 = 11-50% células positivas	2 = reação moderada	-
3 = > 50% células positivas	3 = reação intensa	-

Legenda: Adaptado de (PINTO, 2015)

Figura 9 – Coloração Imunohistoquímica da proteína PD-L1 em megacariócitos da médula óssea de quatro pacientes com (A) reação negativa, (B) fraca, (C) moderada e (D) intensa, respectivamente.



Legenda: Coloração: cromógeno DAB – contra coloração hematoxilina de Gil. Aumento 40x. a) ausência de marcação de PD-L1 (10x). b) fraca marcação de PD-L1; c) moderada marcação de PD-L1; d) forte marcação de PD-L1. Fonte: Propio Autor

## 4.7 Análise da Expressão Gênica

### 4.7.1 Extração de mRNA

Após a coleta de sangue periférico, a extração de Ácido ribonucleico (RNA) das células do pool medular dos pacientes com SMD foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O sobrenadante obtido de cada amostra foi retirado e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol, e incubado overnight a -20°C. O precipitado foi armazenado a -80°C para posterior extração de DNA. Após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em álcool etílico e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi ressuspensão em 20µL de água livre de RNase. Os RNAs foram quantificados e congelados em freezer a -80°C.

### 4.7.2 Quantificação de RNA

RNA obtido das amostras foi quantificado através de leitura em nanoespectrofotômetro (Nanodrop) no comprimento de onda de 260nm, utilizando equivalência de 46 40µg/ml para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8. A qualidade do RNA total foi também verificada em gel de agarose 1%.

### 4.7.3 Síntese do cDNA

A transcrição reversa do RNA para Ácido Desoxribonucleico complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercial partir de Transcrição Reversa da *AppliedBiosystems®(High CapacityDNA Reverse Transcription Kit AppliedBiosystems®)*. Para a reação, foram utilizados 2µL de *Buffer RT 10X*, 0,8µL de *dNTP 25X (100mM)*, 2µL de *Randon primers RT 3µg/µL*, 1µL 26 de *Reverse Transcripase*, 8,2µL de água e 6µL de RNA. As amostras foram amplificadas em termociclador com ciclos de 25°C por 10', 2x (37°C 60'), 85°C por 10' e 4°C∞. O cDNA obtido foi diluído cinco vezes para análise e armazenado a -20°C.

#### 4.7.4 Análise da expressão dos genes CD279, CD274 e CD152 por PCR tempo real quantitativa.

As reações foram realizadas no aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), em placas transparentes de 96 poços (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas *TaqManAssay*® com marcação FAMMGB pela *Applied Biosystems*. O volume final de cada reação foi de 10µL, sendo 5µL de TaqMan Universal, 0,5µL de primer (*TaqManAssay*), 0,5µL de água e 4,0µL de cDNA. A relação das sondas utilizadas na expressão gênica por qPCR e 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) (Tabela 7). Para a leitura foi utilizado fluoróforo FAM para marcar os nucleotídeos (Tabela 8).

Para análise dos dados, uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da PCR foram incluídos na placa os NTCs (no-templante controls), no qual água foi adicionada no lugar do RNA. O gene Gliceraldeído fosfatodesidrogenase (GAPDH) foi escolhido como controle endógeno para normalizar os dados de expressão de todos os genes em investigação. Além disso, todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise, sendo também normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX, para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação. Todos os ensaios de qRT-PCR envolveram pelo menos dois controles negativos, para atestar ausência de contaminação da reação.

Tabela 7 – Sondas utilizadas na expressão gênica por qtPCR

Gene	Sondas (TaqManAssay)	Amplicon
PD-1 (CD279)	Hs01550088_m1	127
PD-L1 (CD274)	Hs01125299_m1	89
CTLA-4 (CD152)	Hs00175480_m1	93
GAPDH (controle)	Hs03929097_g1	58

Legenda: (CORPORATION, 2010)

Tabela 8 – Reagentes utilizados na PCR em tempo real

Reagentes	$\mu L$
Tampão TaqMan Genotyping Master Mix	5,0
Sonda (primers)	0,5
Água para qPCR	2,0
cDNA	2,5
<b>Total</b>	<b>10,0</b>

Legenda: (CORPORATION, 2010)

#### 4.7.5 Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo

Algumas variáveis foram controladas na análise da expressão gênica, como a quantidade de material inicial, qualidade do RNA utilizado, eficiência da Transcrição Reversa (RT)), componentes inibitórios e diferença na atividade transicional global das células. Para a normalização dos parâmetros acima, foi utilizado um gene de referência GAPDH (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram avaliados através da obtenção dos valores do Ciclo de Quantificação (Cq). Ao final de cada corrida, os dados foram exportados para planilhas do software Excel® para o cálculo dos valores de Delta Ciclo de Quantificação ( $\Delta Cq$ ). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*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 fórmula  $2^{\Delta Cq} = \text{média do Cq do gene alvo} - \text{média do Cq do gene de referência}$ .

#### 4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Programa *GraphPad Prism 6.0.* e do *SPSS 20.0* para *Windows Os* testes realizados foram determinados de acordo com a normalidade dos dados usando o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis sociodemográficas foram apresentadas pelas frequências e porcentagens. Os resultados de expressão proteica foram expressos em escores que variam de acordo com a positividade e intensidade de marcação e os resultados de expressão gênica foram expressos em valores do *Cycle Threshold* (CT), o qual se refere ao número ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja um determinado limiar de detecção. Os valores CT de cada um dos genes de interesse, para cada uma das amostras, foram subtraídos dos valores CT do controle endógeno GAPDH para obtenção de valores normalizados

( $\Delta CT$ ), utilizados para a análise estatística.

Para as análises de comparação de dois grupos, foi utilizado o teste de Mann Whitney, para as análises de comparações envolvendo 3 ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. As frequências de imunopositividade para PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foram associadas com demais variáveis por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. O nível de significância estatística utilizado para todas as análises foi de  $p < 0,05$ . O tempo médio e mediano de sobrevida global e sobrevida livre de progressão foram calculados por meio e curvas de Kaplan-Meier as quais foram associadas com demais variáveis por meio do teste de Log-Rank Mantel-Cox. As variáveis com  $p < 0,200$  foram submetidas a modelo de regressão de Cox (análise multivariada) .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características clínicas, sociodemográficas (idade, sexo, origem e profissão) e Clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD.

O presente estudo é composto por 34 pacientes com diagnóstico confirmado de SMD e um grupo controle composto por 15 indivíduos declaradamente saudáveis. A maioria dos pacientes do estudo eram do sexo feminino 52,94%, a média de idade dos pacientes com SMD foi de  $69,91 \pm 16,33$ , a média de idade do grupo controle foi de  $36,36 \pm 13,35$ . 52,94% dos pacientes do serviço de hematologia eram provenientes do interior do Ceará. Dentre as profissões informadas, a maioria dos pacientes eram domésticas 17,65% e agricultores 14,71%. As características sociodemográficas estão descritas na (Tabela 9).

Tabela 9 – Característica sociodemográfica dos pacientes com SMD (n = 34).

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupos</b>	<b>Total de Pacientes n(%)</b>
<b>Sexo</b>	Feminino	18(52,94)
	Masculino	16 (47,06)
<b>Idade</b>		$69,91 \pm 16,33^*$
<b>Procedência</b>	Fortaleza e Região Metropolitana	16 (47,06)
	Interior	18(52,94)
<b>Profissão</b>	Não informado	14 (50)
	Agricultor	5 (14,71)
	Doméstica	6 (17,65)
	Autônomo	3 (8,82)
	Outras profissões	3 (8,82)

Legenda: Pacientes com SMD (n = 34). Grupo Controle (indivíduos saudáveis) (n =20). Nota: outras profissões: cabeleireiro, motorista e professor.

Os dados laboratoriais como hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea e cariótipo, bem como a classificação, estratificação de risco, tratamento e desfecho dos pacientes com SMD estão descritos na (Tabela 10).

Quanto aos parâmetros do hemograma, a média da hemoglobina dos pacientes com SMD foi de 9,39g/dL, leucócitos  $4941mm^3$ , linfócitos  $756,2mm^3$  e plaquetas  $133791mm^3$ . 50% dos pacientes com SMD apresentaram citopenias em duas linhagens, 62,5% apresentaram displasias afetando duas linhagens hematopoiéticas, sendo a média da porcentagem de blastos na MO de 2%. Quanto ao cariótipo, 82,4% dos pacientes foram considerados “Bom”. De acordo

com a Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) 2016, 35,3% eram pacientes com SMD com Displasia em múltiplas linhagens (DML) e 23,5% eram pacientes com SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens (SMD-SA-DML). Na Classificação da OMS 2022, a maioria dos pacientes foram classificados como SMD com blastos baixos 20,29%, SMD com blastos baixos e sideroblastos em anel 17,65%, SMD COM excesso de blastos-1 17,65% e SMD hipoplásica 14,71%. De acordo com o escore de prognóstico IPSS-R 44,2% dos pacientes eram considerados de baixo risco.

Diante disso, a maioria dos pacientes faziam uso de fatores estimulantes para o tratamento 47%, além de uso de vitaminas como suplementação de ferro, folato e vitamina B12 35,3%. Apenas 9,38% dos pacientes foram submetidos ao Transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). Dos pacientes do estudo 44,1% foram a óbito no período de 2018 a 2022 (Tabela 10).

Tabela 10 – Característica clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD (n = 34).

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupos</b>	<b>Total de Pacientes n(%)</b>
<b>Hemograma</b>	Hemácias	2,979 ± 0,957
	Hemoglobina	9,394 ± 3,052*
	Hematócrito	29,49 ± 7,798*
	Leucócitos	4941 ± 2813*
	Neutrófilos	2648 ± 2036*
	Linfócitos	756,2 ± 532,9*
	Plaquetas	5 133791 ± 99572*
<b>Citopenias (n=32)</b>	1 Linhagem	2 (6,25)
	2 linhagens	16 (50,0)
	3 linhagens	14 (43,75)
<b>Displasias (n=32)</b>	1 linhagem	3 (9,38)
	2 linhagens	20 (62,5)
	3 linhagens	9 (28,12)
<b>Celularidade da MO</b>	Normocelular	6 (17,60)
	Hipocelular	9 (26,5)
	Hiper celular	19 (55,9)

Continua na próxima página

Tabela 10 – Continuação da página anterior

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupos</b>	<b>Total de Pacientes n(%)</b>
<b>% Blastos na MO</b>		2,018 ± 2,130*
<b>Cariótipo</b>	Muito bom	1 (2,9)
	Bom	28 (82,4)
	Intermediário	2 (5,9)
	Ruim	1 (2,9)
	Muito ruim	2 (5,9)
<b>Classificação (OMS-2016)</b>	SMD DUL	5 (14,7)
	SMD DML	12 (35,3)
	SMD SA DUL	1 (2,9)
	SMD SA DML	8 (23,5)
	SMD com excesso de blastos 1	5 (14,7)
	SMD com excesso de blastos 2	1 (2,9)
	SMD del(5q)	1 (2,9)
	SMD inclassificável	1 (2,9)
<b>Classificação (OMS-2022)</b>	SMD-5q	1 (2,94)
	SMD -SF3B1	3 (8,82)
	SMD -bi TP53	1 (2,94)
	SMD com blastos baixos e sideroblastos em anel	6 (17,65)
	SMD com blastos baixos (SMDLB)	7 (20,59)
	SMD com aumento de blastos (SMD-IB1)	6 (17,65)
	SMD com aumento de blastos(SMD-IB2)	1 (2,94)
	SMD com fibrose (SMD-f)	4 (11,76)
	SMD hipoplásica (SMD-h)	5 (14,71)

Continua na próxima página

Tabela 10 – Continuação da página anterior

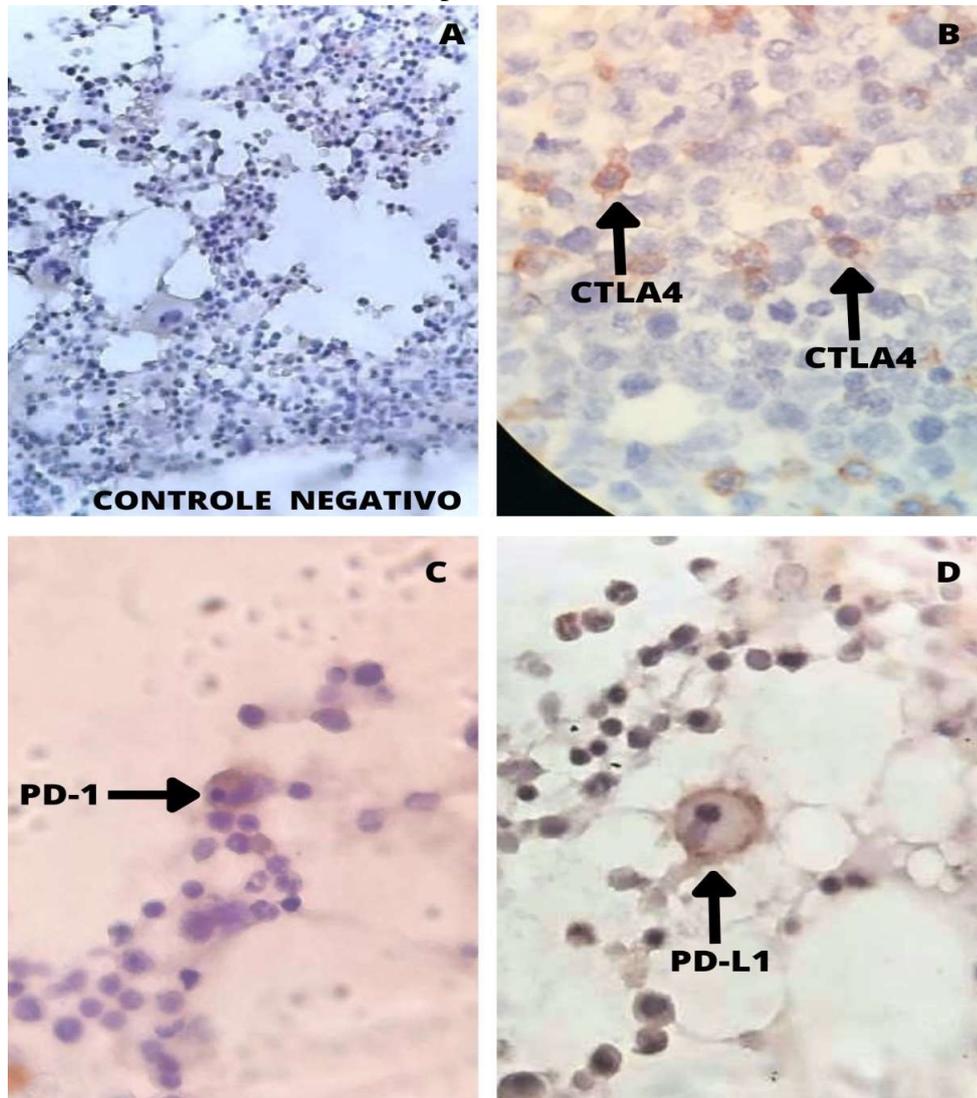
<b>Parâmetros</b>	<b>Grupos</b>	<b>Total de Pacientes n(%)</b>
<b>IPSS-R</b>	Muito baixo	8 (23,5)
	Baixo	15 (44,2)
	Intermediário	8 (23,5)
	Muito baixo	8 (23,5)
	Baixo	15 (44,2)
	Intermediário	8 (23,5)
<b>Óbito</b>	Não	19 (55,9)
	Sim	15 (44,1)
<b>Tratamento</b>	Vitaminas**	12 (35,3)
	Fator estimulante	16(47,05)
	Agente hipometilante	6 (17,60)
	Dependência transfusional	8 (23,5)
	TCTH 3	(9,38)

Nota: \* Dados expressos como média e desvio padrão. \*\* Vitaminas: (Vit B12, ferro, ácido fólico) SMD: Síndrome Mielodisplásica Hb: hemoglobina; HT: hematocrito; SMD com inativação bialélica de TP53, SMD-DUL: SMD com displasia em única linhagem; SMDDML: SMD com displasia em múltiplas linhagens; SMD-SA-DMI: SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens; IPSS-R: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado.

## 5.2 Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD utilizando Imunohistoquímica

A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foram realizadas em 67,64% dos pacientes. As amostras foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico, sendo analisadas nas objetivas de 40x e 100x. Os resultados foram considerados positivos quando acima de 1% das células estão marcadas (Figura 10).

Figura 10 – Imunohistoquímica das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4 em médula óssea de pacientes com SMD.



(A) Medula óssea de paciente com SMD considerado negativa para marcação das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4 por imunohistoquímica (B) Biopsia de medula óssea apresentando marcação positiva de linfócitos para CTLA4. (C) Biopsia de medula óssea apresentando marcação positiva de linfócitos para PD-1. Megacariócitos com marcação de positiva de PD-L1. (D) Megacariócito com marcação forte de PD-L1. As amostras foram coradas com hematoxilina eosina. Objetiva  $\times 40$  (A) e  $\times 100$  (B, C e D).

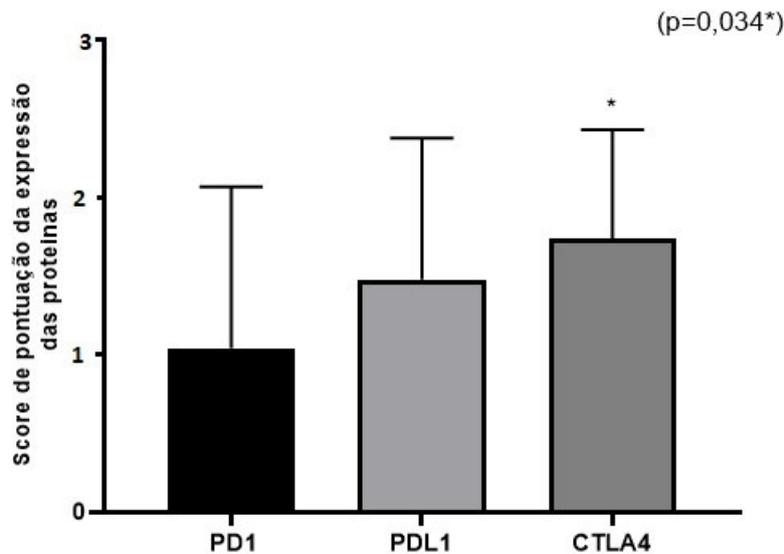
A expressão positiva das proteínas de PD1, PD-L1 e CTLA4 foram observadas em 52,18%, 78,26% e 86,95% dos pacientes com SMD, respectivamente (Tabela 11). Observou-se uma maior expressão da proteína CTLA4 nos pacientes com SMD quando comparado a expressão de PD-1 ( $p=0,034^*$ ) (Gráfico 1).

Tabela 11 – Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 positividade após análise de 100 campos em porcentagem (n=23).

Presença de marcação	PD1 n (%)	PD-L1 n (%)	CTLA4 n (%)
Positivo	12 (52,18)	16 (69,56)	20 (86,95)
Negativo	11 (47,82)	7 (30,44)	3 (13,05)

Nota: Distribuição de frequência. SPSS 20.0

**Gráfico 1:** Expressão das proteínas PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD



Nota: Score de pontuação de expressão das proteínas: 0= ausente, 1=fraco, 2= moderado e 3= forte. Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. ( $p < 0,05$ ).

A figura 11 , está descrito a porcentagem de expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em imunohistoquímica de acordo com a intensidade de marcação negativa, fraco, moderado e forte. Para PD-1 foram consideradas positivas pequenas células marcadas com marcação membranar ou citoplasmática. Dos 52,18% dos pacientes com marcação positiva de PD-1 observamos perfis de marcações com variação entre fraca 30,42%, moderada 17,40% e forte 4,35%.

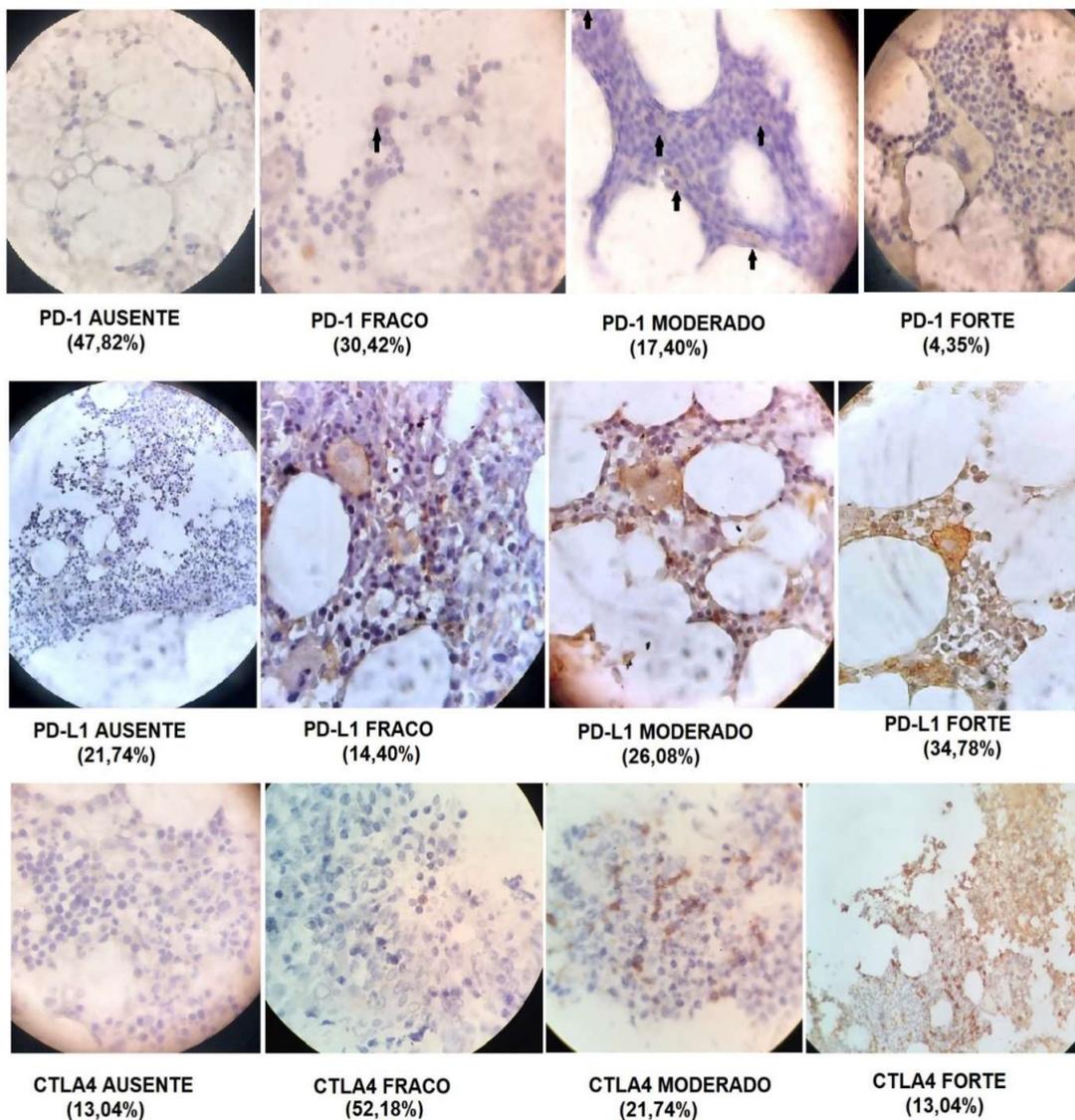
A expressão da proteína PD-L1 foi positiva em 78,26% dos pacientes, marcação que variaram de fraca 17,40%, moderada 26,08% e forte 34,78% nas células nucleadas da medula óssea, enquanto 21,74% não apresentaram marcação. Observamos a expressão positiva de PD-L1 em megacariócitos em 47,82% dos pacientes (Figura 10d; Figura 11).

Para CTLA4 foram consideradas positivas pequenas células marcadas (linfócitos). A proteína CTLA4 apresentou marcação em 86,95% dos pacientes com positividade, sendo a proteína com maior frequência de positividade. A marcação de CTLA4 variou entre fraca 52,18%, moderada 21,73% e forte intensidade 13,05%. Além disso, marcações inespecíficas em

células no estroma foram observadas, porém não foram consideradas.

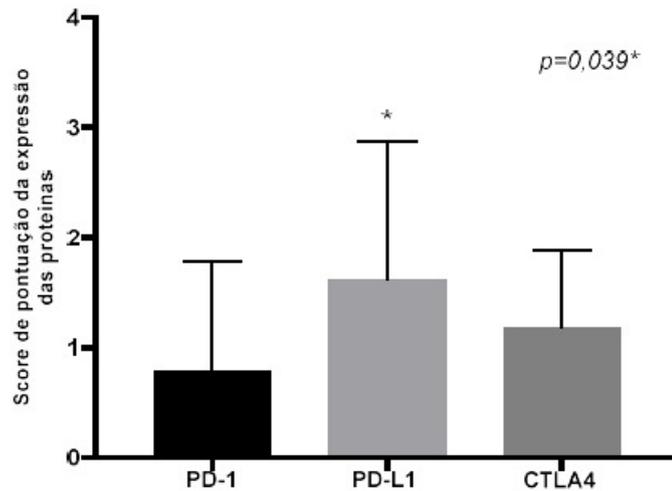
No Gráfico 2, está exposto a intensidade da expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD, observou-se uma maior intensidade de marcação de células tronco hematopoiéticas com do PD-L1 nos pacientes com SMD quando comparado ao PD-1 ( $p = 0,039^*$ ).

Figura 11 – Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em imunohistoquímica de acordo com o grau de marcação



Nota: As amostras de médula óssea de pacientes com SMD. Após a reação imunohistoquímica com os anticorpos Anti-PD1, anti PD-L1 e anti- CTLA4 as lâminas das amostras foram coradas com hematoxilina eosina. Objetiva  $\times 40$  e  $\times 100$ . Fonte próprio autor.

**Gráfico 2:** Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD, de acordo com a intensidade de marcação por imunohistoquímica.



Nota: Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. \*( $p < 0,05$ ).

A análise de associação entre os perfis de expressão das proteínas PD1, PDL1 e CTLA4 com as variáveis clínicas e demográficas estão descritas na (Tabela 12). A expressão positiva da proteína PD-1 apresentou associação significativa com o sexo feminino ( $p=0,039$ ), ausência de mielofibrose ( $p=0,038$ ) e com a expressão concomitante de CTLA4 ( $p=0,010$ ). Na análise de associação de PD-L1 com as variáveis clínicas, observou-se associação significativa entre a expressão positiva de PD-L1 com a expressão positiva de CTLA4 ( $p=0,001$ ). Já na expressão de CTLA4, observou-se associação estatisticamente significativa com os neutrófilos com parâmetros normais ( $p=0,015$ ), alterações na linhagem granulocítica ( $p=0,015$ ) e com a expressão positiva de PD-1 e PD-L1, com significância de ( $p=0,010$ ) e ( $p=0,001$ ) respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 – Avaliação da associação das características sociodemográficas e clínico-laboratoriais com a expressão por imuno-histoquímica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 dos pacientes com SMD (n=34).

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Sexo</b>									
Masculino	11 (64,7%)	5(29,4%)	0,039*	9(64,3%)	7(35,0%)	0,092	7(63,6%)	9(39,1%)	0,18
Feminino	6(35,3%)	12 (70,6%)		5 (35,7%)	13 (65,0%)		4 (36,4%)	14 (60,9%)	
<b>Idade</b>									
Até 70	7 (43,8% )	6 (37,5%)	0,719	6 (46,2% )	7 (36,8% )	0,598	4 (36,4%)	9 (42,9%)	0,722
>70	9 (59,9%)	10 (62,5%)		7 (53,8%)	12 (63,2%)		7(63,6%)	12 (57,1%)	
<b>Procedência</b>									
Interior	2 (11.8%)	6 (35.3%)	0,236	4 (28.6%)	4 (20.0%)	0,516	2 (18.2%)	6 (26.1%)	0,051
Fortaleza	8 (47.1%)	7 (41.2%)		7 (50.0%)	8 (40.0%)		8 (72.7%)	7 (30.4%)	
Não Informado	7 (41.2%)	4 (23.5%)		3 (21.4%)	8 (40.0%)		1 (9.1%)	10 (43.5%)	
<b>Profissão</b>									
Não Informado	10 (58.8%)	7 (41.2%)	0,558	7 (50.0%)	10 (50.0%)	0,541	4 (36.4%)	13 (56.5%)	0,671
Agricultor	1 (5.9%)	4 (23.5%)		3 (21.4%)	2 (10.0%)		2 (18.2%)	3 (13.0%)	
Doméstica	3 (17.6%)	3 (17.6%)		1 (7.1%)	5 (25.0%)		2 (18.2%)	4 (17.4%)	
Autônomo	2 (11.8%)	1 (5.9%)		2 (14.3%)	1 (5.0%)		1 (9.1%)	2 (8.7%)	
Outros	1 (5.9%)	2 (11.8%)		1 (7.1%)	2 (10.0%)		2 (18.2%)	1 (4.3%)	

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Hemácias</b>									
Baixo	14 (87.5%)	15 (100.0%)	0,157	13 (92.9%)	16 (94.1%)	0,887	9 (81.8%)	20 (100.0%)	0,067
Normal	2 (12.5%)	0 (0.0%)		1 (7.1%)	1 (5.9%)		2 (18.2%)	0 (0.0%)	
<b>Hemoglobina</b>									
Baixo	15 (93.8%)	15 (93.8%)	1	13 (92.9%)	17 (94.4%)	0,854	10 (90.9%)	20 (95.2%)	0,631
Normal	1 (6.3%)	1 (6.3%)		1 (7.1%)	1 (5.6%)		1 (9.1%)	1 (4.8%)	
<b>Hematócrito</b>									
Baixo	14 (93.3%)	12 (75.0%)	0,165	12 (85.7%)	14 (82.4%)	0,8	10 (90.9%)	16 (80.0%)	0,429
Normal	1 (6.7%)	4 (25.0%)		2 (14.3%)	3 (17.6%)		1 (9.1%)	4 (20.0%)	
<b>Leucócito</b>									
Baixo	7 (43.8%)	4 (25.0%)	0,365	6 (42.9%)	5 (27.8%)	0,493	6 (54.5%)	5 (23.8%)	0,193
Normal	9 (56.3%)	11 (68.8%)		8 (57.1%)	12 (66.7%)		5 (45.5%)	15 (71.4%)	
Alto	0 (0.0%)	1 (6.3%)		0 (0.0%)	1 (5.6%)		0 (0.0%)	1 (4.8%)	
<b>Neutrófilo</b>									
Baixo	7 (43.8%)	3 (18.8%)	0,22	6 (42.9%)	4 (22.2%)	0,346	7 (63.6%)	3 (14.3%)	0,015*
Normal	9 (56.3%)	12 (75.0%)		8 (57.1%)	13 (72.2%)		4 (36.4%)	17 (81.0%)	
Alto	0 (0.0%)	1 (6.3%)		0 (0.0%)	1 (5.6%)		0 (0.0%)	1 (4.8%)	
<b>Eosinófilo</b>									

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
Baixo	5 (31.3%)	7 (43.8%)	0,696	7 (50.0%)	5 (27.8%)	0,435	4 (36.4%)	8 (38.1%)	0,993
Normal	9 (56.3%)	8 (50.0%)		6 (42.9%)	11 (61.1%)		6 (54.5%)	11 (52.4%)	
Alto	2 (12.5%)	1 (6.3%)		1 (7.1%)	2 (11.1%)		1 (9.1%)	2 (9.5%)	
<b>Linfocito</b>									
Baixo	11 (68.8%)	10 (62.5%)	0,71	9 (64.3%)	12 (66.7%)	0,888	8 (72.7%)	13 (61.9%)	0,54
Normal	5 (31.3%)	6 (37.5%)		5 (35.7%)	6 (33.3%)		3 (27.3%)	8 (38.1%)	
<b>Basofilo</b>									
Baixo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1
Normal	16(100.0%)	16 (100.0%)		14(100.0%)	18 (100.0%)		11(100.0%)	21(100.0%)	
<b>Monocito</b>									
Baixo	3 (18.8%)	2 (12.5%)	0,881	3 (21.4%)	2 (11.1%)	0,597	3 (27.3%)	2 (9.5%)	0,4
Normal	9 (56.3%)	10 (62.5%)		7 (50.0%)	12 (66.7%)		6 (54.5%)	13 (61.9%)	
Alto	4 (25.0%)	4 (25.0%)		4 (28.6%)	4 (22.2%)		2 (18.2%)	6 (28.6%)	
<b>Plaqueta</b>									
Baixo	12 (75.0%)	11 (68.8%)	0,911	12 85.7%)	11 (61.1%)	0,238	9 (81.8%)	14 (66.7%)	0,501
Normal	3 (18.8%)	4 (25.0%)		2 (14.3%)	5 (27.8%)		2 (18.2%)	5 (23.8%)	
Alto	1 (6.3%)	1 (6.3%)		0 (0.0%)	2 (11.1%)		0 (0.0%)	2 (9.5%)	
<b>Citopenia</b>									

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
1 Linhagem afetada	1 (6.3%)	1 (6.3%)	0,765	1 (7.1%)	1 (5.6%)	0,982	1 (9.1%)	1 (4.8%)	0,862
2 Linhagens afetadas	7 (43.8%)	9 (56.3%)		7 (50.0%)	9 (50.0%)		5 (45.5%)	11 (52.4%)	
3 Linhagens afetadas	8 (50.0%)	6 (37.5%)		6 (42.9%)	8 (44.4%)		5 (45.5%)	9 (42.9%)	
<b>Displasias</b>									
1 Linhagem afetada	3 (18.8%)	1 (5.9%)	0,39	2 (14.3%)	2 (10.5%)	0,924	1 (9.1%)	3 (13.6%)	0,253
2 Linhagens afetadas	8 (50.0%)	12 (70.6%)		8 (57.1%)	12 (63.2%)		5 (45.5%)	15 (68.2%)	
3 Linhagens afetadas	5 (31.3%)	4 (23.5%)		4 (28.6%)	5 (26.3%)		5 (45.5%)	4 (18.2%)	
<b>Celularida da MO</b>									
Normocelular	4 (23.5%)	2 (11.8%)	0,535	2 (14.3%)	4 (20.0%)	0,586	1 (9.1%)	5 (21.7%)	0,201
Hipocelular	5 (29.4%)	4 (23.5%)		5 (35.7%)	4 (20.0%)		5 (45.5%)	4 (17.4%)	
Hiper celular	8 (47.1%)	11 (64.7%)		7 (50.0%)	12 (60.0%)		5 (45.5%)	14 (60.9%)	
<b>Eritopoeese</b>									
Normal	4 (23.5%)	4 (23.5%)	0,44	4 (28.57%)	4 (21.05%)	0,908	2 (18.18%)	6 (27.27%)	0,941
Hiperplasia	7 (43.8%)	4 (23.5%)		5 (35.71%)	6 (31.58%)		4 (36.36%)	7 (31.82%)	
Hipoplasia	4 (23.5%)	5 (29.5%)		3 (21.43%)	6 (31.58%)		3 (27.27%)	6 (27.27%)	
Displasia	1 (6.3%)	4 (23.5%)		2 (14.29%)	3 (15.79%)		2 (18.18%)	3 (13.64%)	
<b>Granulopoeese</b>									
Normal	3 (18.75%)	8 (47.06%)	0,209	3 (21.43%)	8 (42.11%)	0,502	0 (0.0%)	11 (50%)	0,015*

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
Hiperplasia	3 (18.75%)	4 (23.53%)	0,431	3 (21.43%)	4 (21.05%)	0,367	4 (36.36%)	3 (13.64%)	0,8584
Hipoplasia	6 (37.5%)	2 (11.76%)		5 (35.71%)	3 (15.79%)		5 (45.45%)	3 (13.64%)	
Displasia	4 (25%)	3 (17.64%)		3 (21.43%)	4 (21.05%)		2 (18.18%)	5 (22.73%)	
<b>Plaquetopese</b>									
Normal	4 (25.0%)	2 (11.76%)	0,431	2 (14.29%)	4 (21.05%)	0,367	2 (18.18%)	4 (18.18%)	0,8584
Hiperplasia	2 (15.50%)	6 (35.29%)		4 (28.57%)	4 (21.05%)		3 (27.27%)	5 (22.73%)	
Hipoplasia	5 (31.25%)	5 (29.41%)		6 (42.86%)	4 (21.05%)		4 (36.36%)	6 (27.27%)	
Displasia	5 (31.25%)	4 (23.53%)		2 (14.29%)	7 (36.85%)		2 (18.18%)	7 (31.82%)	
<b>Sidedroblastos em anel</b>			0,805			0,618			0,794
Não	11 (68.8%)	11 (64.7%)		10 (71.4%)	12 (63.2%)		7 (63.6%)	15 (68.2%)	
Sim	5 (31.3%)	6 (35.3%)		4 (28.6%)	7 (36.8%)		4 (36.4%)	7 (31.8%)	
<b>Cariotipo</b>			0,169			0,843			0,619
Bom	14 (82.4%)	15 (88.2%)		12 (85.7%)	17 (85.0%)		10 (90.9%)	19 (82.6%)	
Intermediário	0 (0.0%)	2 (11.8%)		1 (7.1%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	2 (8.7%)	
Ruim	1 (5.9%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	1 (4.3%)	
Muito ruim	2 (11.8%)	0 (0.0%)		1 (7.1%)	1 (5.0%)		1 (9.1%)	1 (4.3%)	
<b>Alterações moleculares</b>			0,907			0,888			0,864
Não	10 (66.7%)	11 (64.7%)		9 (64.3%)	12 (66.7%)		7 (63.6%)	14 (66.7%)	

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
Sim	5 (33.3%)	6 (35.3%)	0,038*	5 (35.7%)	6 (33.3%)	0,744	4 (36.4%)	7 (33.3%)	0,706
<b>Mielofibrose</b>									
Não	16 (100.0%)	13 (76.5%)		12 (85.7%)	17 (89.5%)		10 (90.9%)	19 (86.4%)	
Sim	0 (0.0%)	4 (23.5%)		2 (14.3%)	2 (10.5%)		1 (9.1%)	3 (13.6%)	
<b>Dependência Transfusional</b>									
Não	14 (82.4%)	12 (70.6%)	0,419	12 (85.7%)	14 (70.0%)	0,288	9 (81.8%)	17 (73.9%)	0,129
Sim	3 (17.6%)	5 (29.4%)		2 (14.3%)	6 (30.0%)		2 (18.2%)	6 (26.1%)	
<b>Classificação OMS 2022</b>									
SMD com anomalias genéticas definidores	3 (17.6%)	6 (35.3%)	0,244	3 (21.4%)	6 (30.0%)	0,577	1 (9.1%)	8 (34.8%)	0,611
SMD definida por morfologia	14 (82.4%)	11 (64.7%)		11 (78.6%)	14 (70.0%)		10 (90.9%)	15 (65.2%)	
<b>Sub Classificação OMS 2022</b>									
SMD-5q	0 (0.0%)	1 (5.9%)	0,433	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0,439	0 (0.0%)	1 (4.3%)	0,613
SMDF3BI 1	(5.9%)	2 (11.8%)		1 (7.1%)	2 (10.0%)		0 (0.0%)	3 (13.0%)	
MDS com inativação bialélica de TP53	0 (0.0%)	1 (5.9%)		0 (0.0%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	1 (4.3%)	
MDS com blastos baixos e MDS-RS	4 (23.5%)	2 (11.8%)		4 (28.6%)	2 (10.0%)		2 (18.2%)	4 (17.4%)	
SMD com blastos baixos (SMD-LB)	3 (17.6%)	4 (23.5%)		2 (14.3%)	5 (25.0%)		2 (18.2%)	5 (21.7%)	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB1)	5 (29.4%)	1 (5.9%)		2 (14.3%)	4 (20.0%)		3 (27.3%)	3 (13.0%)	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB2)	1 (5.9%)	0 (0.0%)		1 (7.1%)	0 (0.0%)		1 (9.1%)	0 (0.0%)	∞

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
SMD com fibrose (SMD-f)	1 (5.9%)	3 (17.6%)		3 (21.4%)	1 (5.0%)		2 (18.2%)	2 (8.7%)	
SMD hipoplásicab SMD-h	2 (11.8%)	3 (17.6%)		1 (7.1%)	4 (20.0%)		1 (9.1%)	4 (17.4%)	
<b>Classificação OMS 2016</b>									
SMD DUL	2 (11.8%)	3 (17.6%)	0,303	3 (21.4%)	2 (10.0%)	0,64	2 (18.2%)	3 (13.0%)	0,484
SMD DML	4 (23.5%)	8 (47.1%)		4 (28.6%)	8 (40.0%)		2 (18.2%)	10 (43.5%)	
SMD SA SML	4 (23.5%)	4 (23.5%)		4 (28.6%)	4 (20.0%)		3 (27.3%)	5 (21.7%)	
SMD com excesso de Blasto 1	5 (29.4%)	1 (5.9%)		2 (14.3%)	4 (20.0%)		3 (27.3%)	3 (13.0%)	
SMD com excesso de blasto 2	1 (5.9%)	0 (0.0%)		1 (7.1%)	0 (0.0%)		1 (9.1%)	0 (0.0%)	
SMD DEL 5Q	0 (0.0%)	1 (5.9%)		0 (0.0%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	1 (4.3%)	
SMD inclassicavel	1 (5.9%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	1 (4.3%)	
<b>Risco IPRSS R</b>									
Muito baixo	3 (17.6%)	5 (29.4%)	0,127	3 (21.4%)	5 (25.0%)	0,904	2 (18.2%)	6 (26.1%)	0,677
Baixo	5 (29.4%)	10 (58.8%)		7 (50.0%)	8 (40.0%)		4 (36.4%)	11 (47.8%)	
Intermediário	6 (35.3%)	2 (11.8%)		3 (21.4%)	5 (25.0%)		4 (36.4%)	4 (17.4%)	
Alto	1 (5.9%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	1 (5.0%)		0 (0.0%)	1 (4.3%)	
Muito alto	2 (11.8%)	0 (0.0%)		1 (7.1%)	1 (5.0%)		1 (9.1%)	1 (4.3%)	
<b>Obito</b>									
Não	10 (58.8%)	9 (52.9%)	0,73	10 (71.4%)	9 (45.0%)	0,127	7 (63.6%)	12 (52.2%)	0,529

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Progressão</b>									
Sim	7 (41.2%)	8 (47.1%)		4 (28.6%)	11 (55.0%)		4 (36.4%)	11 (47.8%)	
Não	10 (58.8%)	10 (58.8%)	1	10 (71.4%)	10 (50.0%)	0,211	7 (63.6%)	13 (56.5%)	0,693
<b>TCTH</b>									
Sim	7 (41.2%)	7 (41.2%)		4 (28.6%)	10 (50.0%)		4 (36.4%)	10 (43.5%)	
Não	15 (88.2%)	16 (94.1%)	0,545	13 (92.9%)	18 (90.0%)	0,773	10 (90.9%)	21 (91.3%)	0,97
<b>PD1</b>									
Sim	2 (11.8%)	1 (5.9%)		1 (7.1%)	2 (10.0%)		1 (9.1%)	2 (8.7%)	
Não	-	-	-	9 (64.3%)	8 (40.0%)	0,163	9 (81.8%)	8 (34.8%)	0,010*
<b>PD-L1</b>									
Sim	-	-		5 (35.7%)	12 (60.0%)		2 (18.2%)	15 (65.2%)	
Não	9 (52.9%)	5 (29.4%)	0,163	-	-	-	9 (81.8%)	5 (21.7%)	0,001*
<b>CTLA4</b>									
Sim	8 (47.1%)	12 (70.6%)		-	-		2 (18.2%)	18 (78.3%)	
Não	9 (52.9%)	2 (11.8%)	0,010*	9 (64.3%)	2 (10.0%)	0,001*	-	-	-

Continuação da tabela 12 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
Sim	8 (47.1%)	15 (88.2%)		5 (35.7%)	18 (90.0%)		-	-	

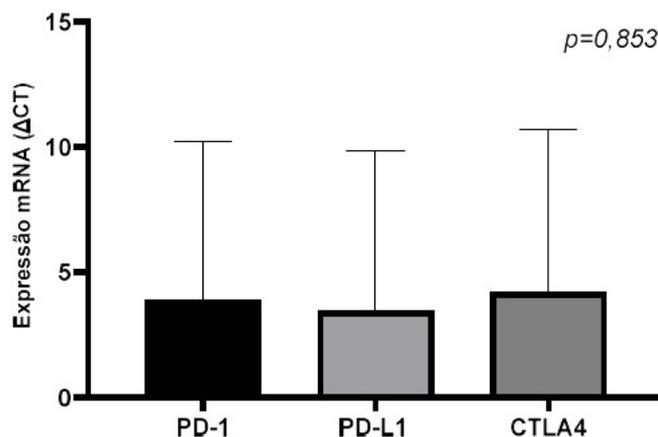
Nota: Abreviações: OMS: Organização Mundial da Saúde. SMD: Síndrome Mielodisplásica Hb: hemoglobina; HT: hematocrito; SMD-DUL: SMD com displasia em única linhagem; SMDDML: SMD com displasia em múltiplas linhagens; SMD-SA-DMI: SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens; IPSS-R: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; \*Teste exato de Fischer. \*\*Teste chi-quadrado de Pearson. \*\*\* Teste chi-quadrado de Pearson com correção de Yates, considerado estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

End of Table

### 5.3 Expressão de PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD utilizando PCR em tempo real

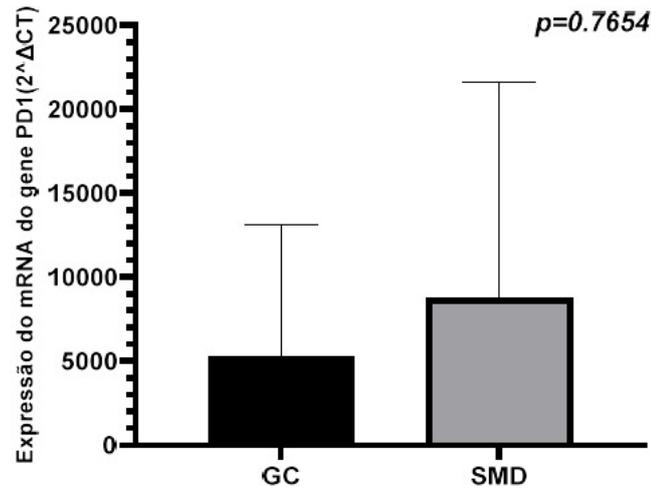
A frequência da expressão gênica para os genes PD1, PDL1 e CTLA4, estão descritos no Gráfico 3. Para o gene PD1, observou-se a amplificação desse gene em 28,57% dos pacientes com SMD. O gene PD-L1, apresentou uma frequência de expressão positiva em 23,81% dos pacientes. A frequência de amplificação do gene CTLA4 foi de 33,33% dos pacientes com SMD. Um total de 14,28% dos pacientes apresentou amplificação dos três genes PD1, PDL1 e CTLA4 concomitantes. Na comparação entre os perfis de expressão gênica dos transcritos não se observa diferença significativa entre as frequências dos transcritos expressos ( $p=0,853$ ) (Gráfico 3).

**Gráfico 3:** Comparação da frequência de expressão dos genes PD1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD (n = 21).



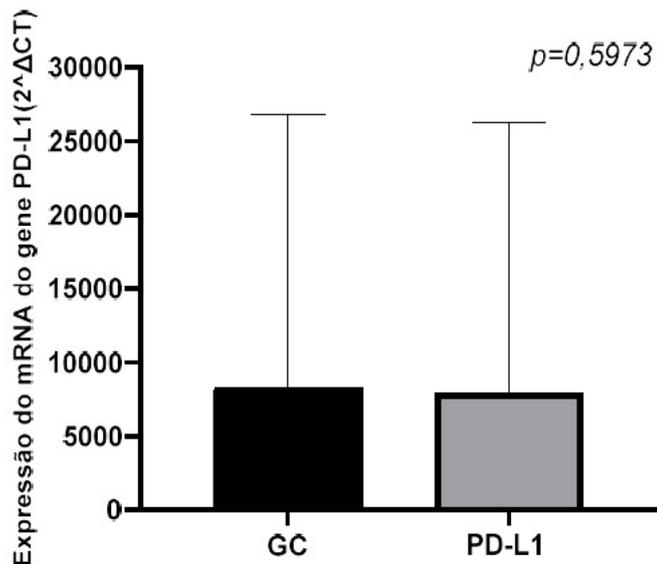
Nota: Comparação de médias  $\pm$  desvio padrão da expressão do mRNA dos genes PD1, PD-L1 e CTLA4 ( $2\Delta C_q$ ) de pacientes com SMD (n=21). Valor de p obtido através do teste de Mann-Whitney. \* $p=0,853$ . Fonte: Do próprio autor.

A Expressão dos genes check-point imune em pacientes com SMD foram comparadas com o grupo controle (GC) utilizando qPCR. As comparações da expressão dos genes relacionados ao check-point imune PD-1, PD-L1 e CTLA4 em pacientes com SMD e GC estão descritas nos gráficos 4 a 6. No Gráfico 4, observou-se que os pacientes com SMD apresentaram níveis mais elevados da expressão do gene PD1 em comparação ao grupo controle (GC), no entanto, não houve diferença estatística ( $p= 0,7654$ ), as médias  $\pm$  desvio padrão foram  $7542 \pm 16760$ (n = 21) e  $4664 \pm 9618$ (n = 15), respectivamente (Gráfico 4).

**Gráfico 4:** Nível de expressão do gene PD1 em pacientes com SMD e GC ( $p=0,7654$ )

Nota: Comparação de médias  $\pm$  desvio padrão da expressão do mRNA do gene PD1 ( $2\Delta C_q$ ) de pacientes com SMD ( $n=21$ ) e grupo controle (GC) ( $n=15$ ). Valor de  $p$  obtido através do teste de Mann-Whitney.  $p=0,4972$ . Fonte: Do próprio autor.

A comparação da expressão do gene PD-L1 nos pacientes com SMD e GC, não se apresentou estatisticamente significativa ( $p=0,5973$ ), com média  $\pm$  desvio padrão no grupo de pacientes com SMD ( $7937 \pm 18344$ ;  $n = 21$ ) em relação ao GC ( $8328 \pm 18483$ )  $n = 15$ ) (Gráfico 5).

**Gráfico 5:** Nível de expressão do gene PD-L1 em pacientes com SMD e GC ( $p=0,5973$ )

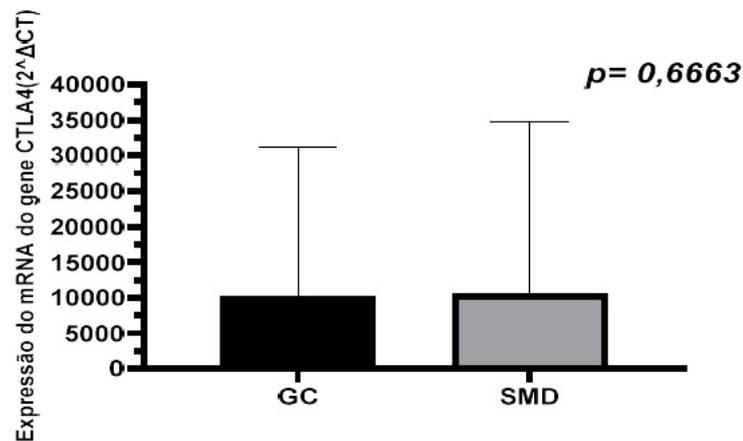
Nota: Comparação de médias  $\pm$  desvio padrão da expressão do mRNA do gene PD-L1 ( $2\Delta C_q$ ) de pacientes com SMD ( $n=21$ ) e grupo controle (GC) ( $n=15$ ). Valor de  $p$  obtido através do teste de Mann-Whitney.  $p=0,5973$ . Fonte: Do próprio autor.

A comparação dos níveis de expressão do gene CTLA4 em pacientes com SMD e

GC não apresentou diferença estatisticamente significativas ( $p = 0,6663$ ), as médias  $\pm$  desvio padrão foram  $10407 \pm 24365$  ( $n = 21$ ) SMD e  $10122 \pm 21146$  ( $n = 15$ ) GC, respectivamente (Gráfico 6).

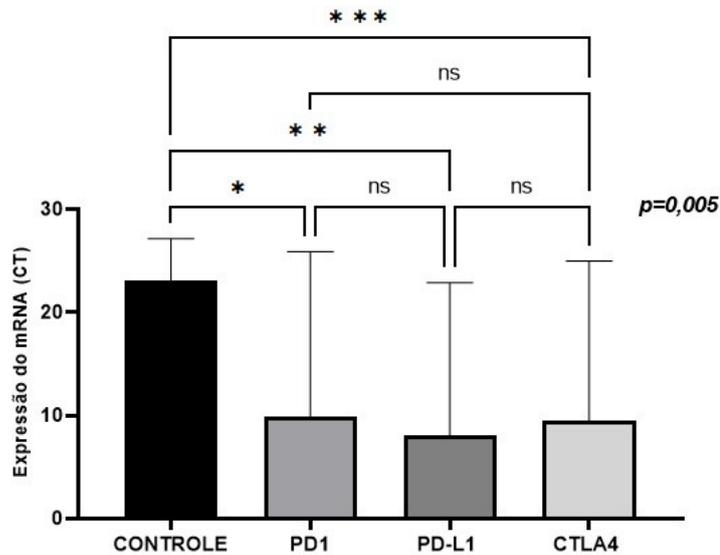
Ao comparar a expressão ( $2\Delta C_q$ ) dos três genes PD1, PD-L1 e CTLA4 com o controle, o gene GAPDH, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão do grupo controle comparado aos genes PD1, PD-L1 e CTLA4 ( $p=0,04^*$ ,  $p=0,01^{**}$  e  $p=0,03^{***}$ ), respectivamente (Gráfico 7).

**Gráfico 6:** Nível de expressão do gene CTLA4 em pacientes com SMD e GC ( $p=0,6663$ )



Nota: Comparação de médias  $\pm$  desvio padrão da expressão do mRNA do gene CTLA4 ( $2\Delta C_q$ ) de pacientes com SMD ( $n=21$ ) e grupo controle (GC) ( $n=15$ ). Valor de  $p$  obtido através do teste de Mann-Whitney.  $p=0,6663$ . Fonte: Do próprio autor.

**Gráfico 7:** Comparação das expressões dos genes PD1, PD-L1, CTLA4 e o gene Controle GAPDH ( $p=0,005$ )



Nota: Comparação do CT da expressão do mRNA dos genes PD1, PD-L1 E CTLA4 e gene controle GAPDH em pacientes com SMD (n=21). Valor de p obtido através do teste de Kruskal Wallis.  $p=0,005$ . Comparação entre GAPDH vs. PD1  $p=0,04^*$ , GAPD vs. PD-L1  $p=0,01^{**}$ , GAPD vc. CTLA4  $p=0,03^{***}$ . Ns = não estatisticamente significativo. CT=cycle threshold ou ciclo de quantificação. Fonte: Do próprio autor.

A análise multivariada da expressão gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 com as variáveis sociodemográficas e clínicas estão descritas na Tabela 13. Para o gene PD-1 observou-se associação estatisticamente significativa com idade  $\leq 70$  anos ( $p=0,006$ ). A expressão positiva do gene PD1 também apresentou associação estatisticamente significativa em relação a expressão positiva dos genes PDL1 ( $p=0,003$ ) e CTLA4 ( $p=0,040$ ). A análise multivariada, o gene PD-L1, apresentou associação estatisticamente significativa com a dependência transfusional ( $p = 0,029$ ) e com a classificação da SMD 2022, SMD hipoplásica ( $p=0,044$ ). O gene PD-L1, também apresentou associação com a expressão dos genes PD-1 ( $p=0,003$ ) e CTLA4 ( $p=0,011$ ). O gene CTLA4 não apresentou associação estatisticamente significativa com as variáveis clínicas, associando-se apenas, com a expressão positiva de PD-1 ( $p=0,040$ ) e PDL1 ( $p=0,011$ ) (Tabela 13).

Tabela 13 – Análise multivariada da associação das características sociodemográficas e clínico-laboratoriais com a expressão gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 dos pacientes com SMD (n=21)

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Sexo</b>									
Masculino	9 (60.00%)	2 (33.33%)	0,269	9 (56.25%)	2 (40.00%)	0,523	8 (57.14%)	3 (42.86%)	0,536
Feminino	6 (40.00%)	4 (66.67%)		7 (43.75%)	3 (60.00%)		6 (42.86%)	4 (57.14%)	
<b>Idade</b>									
Até 70	3 (20.00%)	5 (83.33%)	0,006*	5 (31.25%)	2 (40.00%)	0,717	5 (35.71%)	4 (57.14%)	0,349
> 70	12 (80.00%)	1 (16.67%)		11 (68.75%)	3 (60.00%)		9 (64.29%)	3 (42.86%)	
<b>Procedência</b>									
Interior	6 (40%)	1 (16.67%)	0,1028	6 (37.50%)	0 (0.0%)	0,245	6 (42.86%)	0 (0.0%)	0,113
Fortaleza	5 (33.33%)	5 (83.33%)		7 (43.75%)	3 (60.00%)		5 (35.71%)	5 (71.83%)	
Não Informado	4 (26.67%)	0 (0.0%)		3 (18.75%)	2 (40.00%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
<b>Procedência</b>									
Não informado	6 (40%)	2 (33.33%)	0,4042	6 (37.50%)	2 (40.00%)	0,177	4 (28.57%)	4 (57.14%)	0,533
Agricultor	4 (26.67%)	1 (16.67%)		5 (31.25%)	0 (0.0%)		4 (28.57%)	1 (14.29%)	
Doméstica	3 (20%)	0 (0.0%)		3 (18.75%)	0 (0.0%)		3 (21.43%)	0 (0.0%)	
Autônomo	1 (6.67%)	1 (16.67%)		1 (6.25%)	1 (20.00%)		1 (7.14%)	1 (14.29%)	
Outros	1 (6.67%)	2 (33.33%)		1 (6.25%)	2 (40.00%)		2 (14.29%)	1 (14.29%)	

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Hemácias</b>									
Baixo	14 (93.33%)	6 (100.0%)	0,5169	12 (75.00%)	5 (100.0%)	0,214	13 (92.86%)	5 (71.43%)	0,1859
Normal	1 (6.67%)	0 (0.0%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		7 (7.14%)	2 (28.57%)	
<b>Hemácias</b>									
Baixo	11 (73.33%)	4 (66.67%)	0,76	10 (62.50%)	5 (100.0%)	0,105	10 (71.43%)	5 (71.43%)	0,608
Normal	4 (26.67%)	2 (33.33%)		6 (37.50%)	0 (0.0%)		4 (28.57%)	2 (28.57%)	
<b>Hematócrito</b>									
Baixo	13 (86.67%)	4 (66.67%)	0,2917	14 (87.50%)	5 (100.0%)	0,405	12 (85.71%)	7 (100.0%)	0,2931
Normal	2 (13.33%)	2 (33.33%)		2 (12.50%)	0 (0.0%)		2 (14.29%)	0 (0.0%)	
<b>Leucócito</b>									
Baixo	11 (73.33%)	3 (50%)	0,3055	6 (37.50%)	2 (40.00%)	0,92	11 (78.57%)	5 (71.43%)	0,7171
Normal	4 (26.67%)	3 (50%)		10 (62.50%)	3 (60.00%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
<b>Neutrófilo</b>									
Baixo	8 (53.33%)	4 (66.67%)	0,577	7 (43.75%)	2 (40.00%)	0,882	9 (64.29%)	2 (28.57%)	0,1224
Normal	7 (46.67%)	2 (33.33%)		9 (56.25%)	3 (60.00%)		5 (35.71%)	5 (71.43%)	
<b>Eosinofilo</b>									
Baixo	2 (13.33%)	2 (33.33%)	0,4966	3 (18.75%)	0 (0.0%)	0,426	3 (21.43%)	3 (42.86%)	0,4984
Normal	12 (80%)	4 (66.67%)		12 (75.00%)	4 (80.00%)		10 (71.43%)	4 (57.14%)	

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Linfocito</b>									
Alto	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	1 (20.00%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
Baixo	11 (73.33%)	5 (83.33%)	0,6269	9 (60.00%)	4 (80.00%)	0,416	11 (78.57%)	4 (57.14%)	0,3055
Normal	4 (26.67%)	1 (16.67%)		6 (40.00%)	1 (20.00%)		3 (21.43%)	3 (42.86%)	
<b>Basofilo</b>									
Normal	15 (100.0%)	6 (100.0%)	1	16 (100.0%)	5 (100.0%)	1	14 (100.0%)	7 (100.0%)	1
<b>Monocito</b>									
Baixo	1 (6.67%)	1 (16.67%)	0,727	1 (6.25%)	2 (40.00%)	0,17	1 (7.14%)	2 (28.57%)	0,3679
Normal	7 (46.67%)	2 (33.33%)		10 (62.50%)	2 (40.00%)		7 (50.0%)	2 (28.57%)	
Alto	7 (46.67%)	3 (50%)		5 (31.25%)	1 (20.0%)		6 (42.86%)	3 (42.86%)	
<b>Plaqueta</b>									
Baixo	11 (73.33%)	4 (66.67%)	0,6884	13 (81.25%)	2 (40.00%)	0,089	10 (71.43%)	5 (71.43%)	0,7408
Normal	3 (20%)	2 (33.33%)		2 (12.50%)	3 (60.00%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
Alto	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
<b>Citopenia</b>									
1 Linhagem afetada	1 (6.67%)	1 (16.67%)	0,5106	1 (6.25%)	1 (20.0%)	0,62	0 (0.0%)	1 (14.29%)	0,2956
2 Linhagens afetadas	9 (60%)	2 (33.33%)		9 (56.25%)	2 (40.00%)		9 (64.29%)	3 (42.86%)	
3 Linhagens afetadas	5 (33.33%)	3 (50%)		6 (37.50%)	2 (40.00%)		5(35.71%)	3 (42.86%)	78

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Displasias</b>									
1 Linhagem afetada	1 (6.67%)	1 (16.67%)	0,7691	1 (6.25%)	1 (20.0%)	0,554	1 (7.14%)	1 (14.29%)	0,8515
2 Linhagens afetadas	9 (60%)	3 (50%)		10 (62.50%)	2 (40.00%)		8 (57.14%)	4 (57.14%)	
3 Linhagens afetadas	5 (33.33%)	2 (33.33%)		5 (31.25%)	2 (40.00%)		5(35.71%)	2 (28.57%)	
<b>Celularidade da MO</b>									
Normocelular	2 (13.33%)	1 (16.67%)	0,5181	3 (18.75%)	0 (0.0%)	0,282	2 (14.29%)	1 (14.29%)	0,7251
Hipocelular	4 (26.67%)	2 (33.33%)		4 (25.00%)	3 (60.00%)		2 (14.29%)	2 (28.57%)	
Hiper celular	9 (60%)	3 (50%)		9 (56.25%)	2 (40.00%)		10 (71.43%)	4 (57.14%)	
<b>Eritropoese</b>									
Normal	3 (20%)	1 (16.67%)	0,9335	3 (18.75%)	1 (20.0%)	0,8834	3 (21.43%)	1 (14.29%)	0,2713
Hiperplasia	5 (33.33%)	2 (33.33%)		6 (37.50%)	1 (20.0%)		3 (21.43%)	4 (57.14%)	
Hipoplasia	4 (26.67%)	2 (33.33%)		4 (25.00%)	2 (40.00%)		4 (28.57%)	2 (28.57%)	
Displasias	3 (20%)	1 (16.67%)		3 (18.75%)	1 (20.0%)		4 (28.57%)	0 (0.0%)	
<b>Granulopese</b>									
Normal	3 (20%)	4 (66.67%)	0,1714	4 (25.00%)	3 (60.00%)	0,4352	3 (21.43%)	4 (57.14%)	0,2113
Hiperplasia	3 (20%)	1 (16.67%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		3 (21.43%)	1 (14.29%)	
Hipoplasia	5 (33.33%)	0 (0.0%)		4 (25.00%)	1 (20.0%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
Displasias	4 (26.67%)	1 (16.67%)		4 (25.00%)	1 (20.0%)		5 (35.71%)	0 (0.0%)	79

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Plaquetopose</b>									
Normal	3 (20%)	0 (0.0%)	0,5519	2 (12.50%)	1 (20.0%)	0,2683	1 (7.14%)	2 (28.57%)	0,3834
Hiperplasia	5 (33.33%)	2 (33.33%)		7 (43.75%)	0 (0.0%)		6 (42.86%)	1 (14.29%)	
Hipoplasia	5 (33.33%)	2 (33.33%)		5 (31.25%)	2 (40.00%)		4 (28.57%)	3 (42.86%)	
Displasias	2 (13.33%)	2 (33.33%)		2 (12.50%)	2 (40.00%)		3 (21.43%)	1 (14.29%)	
<b>% Blatos na MO</b>									
≤ 2%	9 (60%)	6 (100.0%)	0,0668	10 (62.50%)	4 (80.0%)	0,4687	9 (64.29%)	6 (85.71%)	0,305
>2%	6 (40%)	0 (0.0%)		6 (37.50%)	1 (20.00%)		5 (35.71%)	1 (14.29%)	
<b>Sideroblastos em anel</b>									
Não	11 (73.33%)	5 (83.33%)	0,6269	12 (75.00%)	4 (80.0%)	0,818	10 (71.43%)	6 (85.71%)	0,4687
Sim	4 (26.67%)	1 (16.67%)		4 (25.00%)	1 (20.00%)		4 (28.57%)	1 (14.29%)	
<b>Cariotipo</b>									
Bom	12 (80%)	6 (100.0%)	0,4966	13 (81.25%)	5 (100.0%)	0,578	11 (78.57%)	7 (100.0%)	0,4169
Intermediário	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
Muito ruim	2 (13.33%)	0 (0.0%)		2 (12.50%)	0 (0.0%)		2 (14.29%)	0 (0.0%)	
<b>Alterações moleculares</b>									
Não	10 (66.67%)	5 (83.33%)	0,445	11 (68.75%)	4 (80.0%)	0,626	10 (71.43%)	5 (71.43%)	0,6084
Sim	5 (33.33%)	1 (16.67%)		5 (31.25%)	1 (20.00%)		4 (28.57%)	2 (28.57%)	g

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>MIELOFIBROSE</b>									
Não	12 (80%)	5 (83.33%)	0,8605	12 (75.00%)	5 (100.0%)	0,214	10 (71.43%)	7 (100.0%)	0,116
Sim	3 (20%)	1 (16.67%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		4 (28.57%)	0 (0.0%)	
<b>Transfusional</b>									
Não	13 (86.67%)	3 (50.0%)	0,074	14 (87.50%)	2 (40.00%)	0,029*	11 (78.57%)	5 (71.43%)	0,7171
Sim	2 (13.33%)	3 (50.0%)		2 (12.50%)	3 (60.00%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
<b>Classificação OMS 2022</b>									
SMD com anomalias genéticas definidores	4 (26.67%)	0 (0.0%)	0,159	4 (25.00%)	0 (0.0%)	0,214	3 (21.43%)	1 (14.29%)	0,6944
SMD definida por morfologia	11(73.33%)	6 (100.0%)		12 (75.00%)	5 (100.0%)		11 (78.57%)	6 (85.71%)	
<b>Sub Classificação OMS 2022</b>									
SMD-5q	1 (6.67%)	0 (0.0%)	0,3171	1 (6.25%)	0 (0.0%)	0,044*	1 (7.14%)	0 (0.0%)	0,19
SMDF3BI	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
MDS com blastos baixos e MDS-RS	2(13.33%)	0 (0.0%)		2 (12.50%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	1 (14.29%)	
SMD com blastos baixos (SMD-LB)	2(13.33%)	3 (50.0%)		3 (18.75%)	2 (40.00%)		3 (21.43%)	2 (28.57%)	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB1)	4 (26.67%)	0 (0.0%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		3 (21.43%)	1 (14.29%)	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB2)	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
SMD com fibrose (SMD-f)	3 (20%)	1 (16.67%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		4 (28.57%)	0 (0.0%)	
SMD hipoplásicab SMD-h	1 (6.67%)	2 (33.33%)		0 (0.0%)	3 (60.0%)		0 (0.0%)	3 (42.86%)	∞

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Classificação OMS 2016</b>									
SMD DUL	1 (6.67%)	2 (33.33%)	0,159	2 (12.50%)	1 (20.00%)	0,1633	2 (14.29%)	1 (14.29%)	0,8136
SMD DML	4 (26.67%)	4(66.67%)		4 (25.00%)	4 (80.00%)		4 (28.57%)	4 (57.14%)	
SMD SA SML	4 (26.67%)	0 (0.0%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		3 (21.43%)	1 (14.29%)	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 1	4 (26.67%)	0 (0.0%)		4 (25.00%)	0 (0.0%)		3 (21.43%)	1 (14.29%)	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 2	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
SMD DEL 5Q	1 (6.67%)	0 (0.0%)		1 (6.25%)	0 (0.0%)		1 (7.14%)	0 (0.0%)	
<b>Risco IPRSS R</b>									
Muito baixo	4 (26.67%)	2 (33.33%)	0,3232	5 (31.25%)	1 (20.00%)	0,25	3 (21.43%)	3 (50.0%)	0,2442
Baixo	6 (40%)	3 (50%)		6 (37.50 %)	2 (60.00%)		7 (50.0%)	2 (33.33%)	
Intermediário	3 (20%)	0 (0.0%)		3 (18.75%)	0 (0.0%)		2 (14.29%)	0 (0.0%)	
Alto	0 (0.0%)	1 (16.67%)		0 (0.0%)	1 (20.00%)		0 (0.0%)	1 (16.67%)	
Muito alto	2 (13.33%)	0 (0.0%)		2 (12.50%)	0 (0.0%)		2 (14.29%)	0 (0.0%)	
<b>Óbito</b>									
Não	8 (53.33%)	4(66.67%)	0,577	9 (56.25%)	3 (60.00%)	0,882	7 (50.0%)	5 (71.43%)	0,349
Sim	7 (46.67%)	2 (33.33%)		7 (43.75%)	2 (40.00%)		7 (50.0%)	2 (28.57%)	
<b>Progressão</b>									
Não	9 (60%)	4(66.67%)	0,7763	10 (62.50%)	3 (60.00%)	0,92	8 (57.14%)	5 (71.43%)	0,5251

Continuação da tabela 13 da página anterior

	PD-1		p-valor	PD-L1		p-valor	CTLA-4		p-valor
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
Sim <b>TCTH</b>	6 (40%)	2 (33.33%)		6 (37.50%)	2 (40.00%)		6 (42.86%)	2 (28.57%)	
Não <b>PD1</b>	15 (100.0%)	6 (100.0%)	1	16 (100.0%)	5 (100.0%)	1	16 (100.0%)	7 (100.0%)	1
Não <b>PDL1</b>				14 (87.50%)	1 (20.00%)	0,003*	12 (85.71%)	3 (42.86%)	0,040*
Sim				2 (12.50%)	4 (80.00%)		2 (14.29%)	4 (57.14%)	
Não <b>CTLA4</b>	14 (93.33%)	2 (33.33%)	0,003*				13 (92.86%)	3 (42.86%)	0,011*
Sim	1 (6.67%)	4(66.67%)					1 (7.14%)	4 (57.14%)	
Não	12 (80.00%)	2 (33.33%)	0,040*	13 (81.25%)	1 (20.0%)	0,011*			
Sim	3 (20.00%)	4(66.67%)		3 (18.75%)	4 (80.0%)				

---

Nota: Abreviações: OMS: Organização Mundial da Saúde. SMD: Síndrome Mielodisplásica Hb: hemoglobina; HT: hematocrito; HPN: Hemoglobinúria paroxística Noturna; SMD-5q: SMD com deleção do braço longo do cromossomo 5; SMDSF3BI: SMD com mutação SF3BI; SMD-DUL: SMD com displasia em única linhagem; SMD DML: SMD com displasia em múltiplas linhagens; SMD-SA-DMI: SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens; IPSS-R: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; Teste chi-quadrado de Pearson. \*\* Teste chi-quadrado de Pearson com correção de Yates. Considerado estatisticamente significante  $p < 0,05$ .

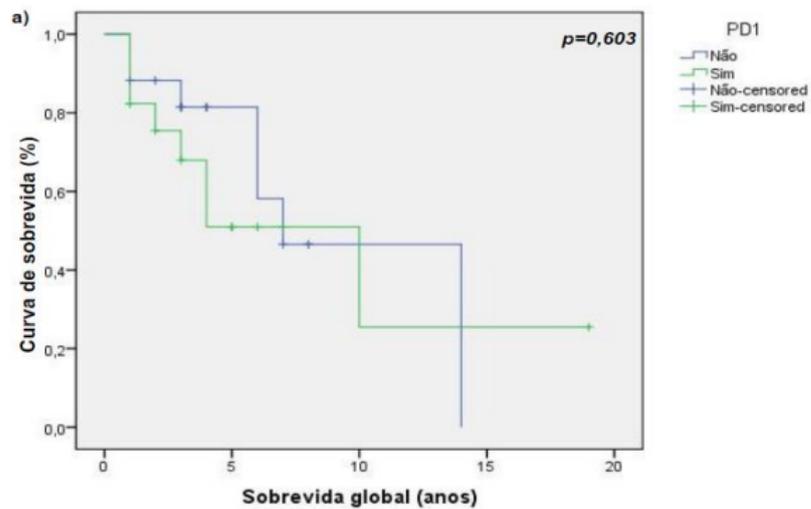
End of Table
--------------

#### 5.4 Análise de Sobrevida

O seguimento médio dos pacientes com SMD foi de  $75.27 \pm 15.04$  (45.79- 104.76) 60 meses (5 anos), variando de 12 a 228 meses. Os pacientes com SMD com expressão positiva de PD-1, apresentaram sobrevida global de 52,9%, com mediana de 10 anos, porém sem significância estatística ( $p=0,603$ ) (Gráfico 8 a). A taxa de SG de PD-L1 positivo associou-se com menor sobrevida ( $p=0,023$ ), com taxa de SG de 45%, com mediana de sobrevida de 6 anos (Gráfico 8 b). Para CTLA4, a sobrevida global apresentou taxa de sobrevida de 52,2% com mediana de 6 anos, porém sem significância estatística ( $p=0,285$ ). (Gráfico 8 c) (Tabela 14). Os pacientes com expressão positiva das três proteínas juntas PD-1, PD-L1 e CTLA4 não apresentaram associação significativa com a menor SG do que aqueles sem expressão ( $p=0,196$ ) (Gráfico 8 d) (Tabela 14). Pacientes que expressavam as duas proteínas PD-L1 e CTLA4, foram associados com menor SG com taxa de 44,4% mediana de 6 anos ( $p=0,044$ ) (Gráfico 8 e). A expressão dupla das outras proteínas não apresentaram associação significativa com a SG ( $p>0,05$ ) (Tabela 14).

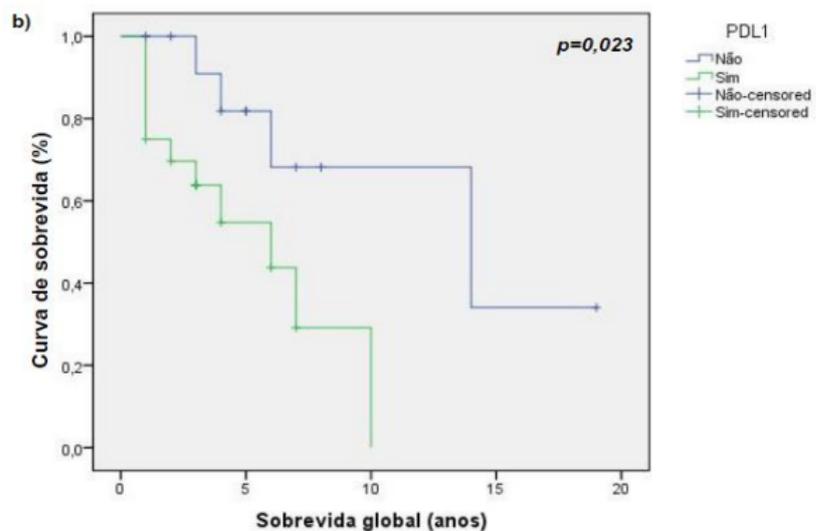
Na análise de associação das variáveis clínicas com SG, observamos que a idade, plaquetas, celularidade, alterações na linhagem megacariocítica e progressão apresentaram menor SG nos pacientes com SMD com expressão positiva das proteínas ( $P<0,05$ ) (Tabela 14). Com relação a idade, os pacientes com SMD com idade acima de 70 anos apresentaram taxa de SG de 36,8% com mediana de 4 anos ( $p=0,025$ ). Os pacientes com baixos níveis de plaquetas apresentaram uma taxa de SG de 60,90% com mediana de sobrevida de 14 anos ( $p=0,037$ ). Pacientes com celularidade da medula óssea hiperclular apresentam taxa de SG de 42.1% com mediana de sobrevida de 4 anos, enquanto pacientes com MO hipocelular tiveram taxa de SG de 77.8% e mediana de 14 anos ( $p=0,037$ ). Quanto as alterações na linhagem megacariocítica, observou-se uma taxa de SG de 57.1% para alterações hiperplásicas com mediana de sobrevida de 10 anos ( $p=0,010$ ). Já a progressão apresentou mediana de sobrevida de 3 anos ( $p=0,0001$ ) (Tabela 14).

**Gráfico 8 a:** Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4



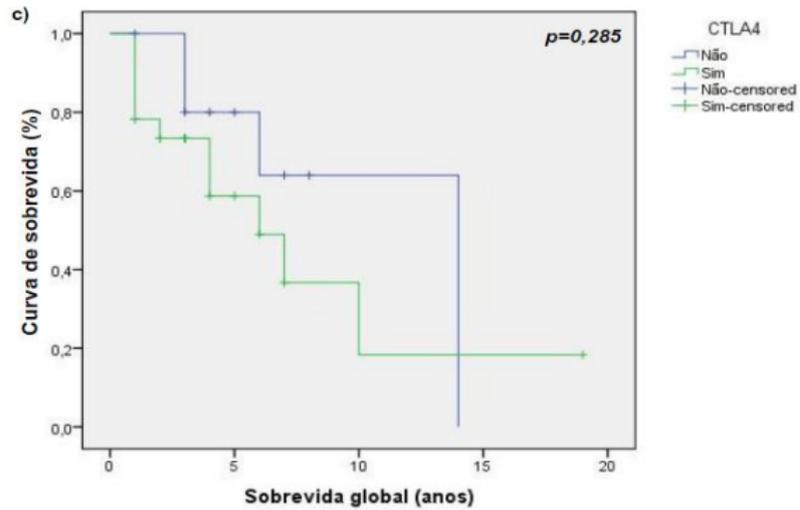
Nota: \* $p < 0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox.

**Gráfico 8 b:** Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4



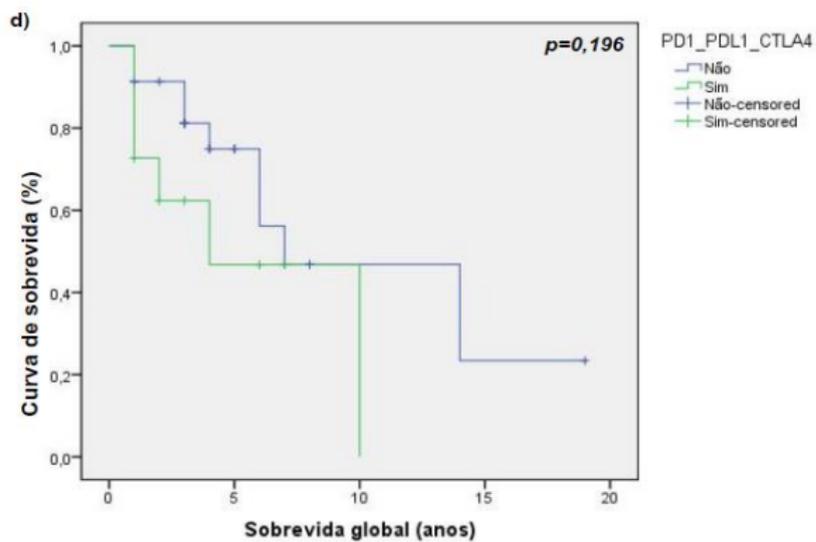
Nota: \* $p < 0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox.

**Gráfico 8 c:** Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4



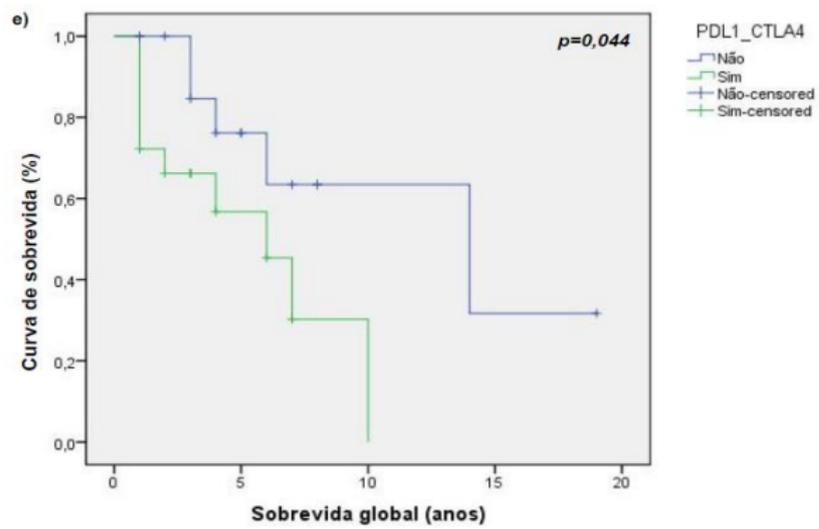
Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox.

**Gráfico 8 d:** Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4



Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox.

**Gráfico 8 e:** Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4



Nota: \* $p < 0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox.

Tabela 14 – Associação da Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD com as variáveis clínicas e sociodemográficas com a expressão de PD-1, PD-L1 E CTLA4.

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Overall</b>	19 (55.9%)	8.75±1.52 (5.78-11.73)	7 (3.17-10.83)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	7 (43.8%)	7.61±1.55 (4.57-10.65)	6 (1.52-10.48)	0,357
Feminino	12 (66.7%)	10.21±2.55 (5.20-15.21)	10 (4.09-15.91)	
<b>Idade</b>				
Até 70	10 (76.9%)	13.77±2.45 (8.97-18.57)	-	0,025*
>70	7 (36.8%)	6.08±1.34 (3.45-8.70)	4 (2.50-5.50)	
<b>Procedência</b>				
Interior	3 (37.5%)	6.25±1.51 (3.28-9.22)	4 (0.12-7.88)	0,699
Fortaleza	9 (60.0%)	10.99±2.34 (6.40-15.58)	6 (-.)	
Não Informado	7 (63.6%)	8.77±2.66 (3.55-13.99)	7 (0.00-15.48)	
<b>Profissão</b>				
Não Informado	12 (70.6%)	11.30±2.38 (6.64-15.97)	14 (3.24-24.76)	0,310
Agricultor	3 (60.0%)	5.20±1.01 (3.22-7.18)	6 (0.19-11.81)	
Doméstica	1 (16.7%)	4.83±1.68 (1.55-8.12)	3 (0.00-7.80)	
Autônomo	1 (33.3%)	4.33±1.66 (1.09-7.58)	4 (0.00-8.80)	

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Outros	2 (66.7%)	5.67±1.09 (3.53-7.80)	-	
<b>Hemácias</b>				
Baixo	15 (51.7%)	8.22±1.81 (4.68-11.76)	6 (2.65-9.35)	0,460
Normal	1 (50.0%)	14.00±0.00 (14.00-14.00)	14 (-.)	
<b>Hemoglobina</b>				
Baixo	15 (50.0%)	-	-	0,470
Normal	2 (100.0%)	-	-	
<b>Hematócrito</b>				
Baixo	13 (50.0%)	7.38±1.19 (5.06-9.71)	7 (3.74-10.26)	0,214
Normal	4 (80.0%)	15.40±3.22 (9.09-21.71)	-	
<b>Leucócito</b>				
Baixo	7 (63.6%)	-	-	0,460
Normal	9 (45.0%)	-	-	
Alto	1 (100.0%)	-	-	
<b>Neutrófilo</b>				
Baixo	6 (60.0%)	-	-	0,344
Normal	10 (47.6%)	-	-	
Alto	1 (100.0%)	-	-	

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Segmentado</b>				
Baixo	4 (57.1%)	12.32±2.68 (7.08-17.56)	14 (1.78-26.22)	0,178
Normal	9 (45.0%)	5.68±0.93 (3.86-7.50)	6 (2.84-9.16)	
Alto	4 (80.0%)	6.60±1.25 (4.15-9.05)	-	
<b>Eosinofilo</b>				
Baixo	8 (66.7%)	6.13±0.79 (4.57-7.68)	-	0,731
Normal	7 (41.2%)	8.05±1.77 (4.58-11.51)	7 (1.53-12.47)	
Alto	2 (66.7%)	4.00±0.00 (4.00-4.00)	4 (-.)	
<b>Linfocito</b>				
Baixo	11 (52.4%)	7.91±1.34 (5.29-10.54)	7 (3.83-10.17)	0,848
Normal	6 (54.5%)	9.53±2.96 (3.73-15.32)	6 (0.31-11.69)	
<b>Linfocito percentual</b>				
Baixo	1 (25.0%)	4.38±1.54 (1.36-7.39)	4 (0.00-8.49)	0,338
Normal	11 (61.1%)	6.91±1.06 (4.82-8.99)	10	
Alto	5 (50.0%)	10.68±2.44 (5.90-15.46)	14 (1.93-26.07)	
<b>Monocito</b>				
Baixo	3 (60.0%)	8.20±2.28 (3.74-12.66)	10	0,468
Normal	11 (57.9%)	10.22±2.06 (6.17-14.26)	14 (3.42-24.58)	

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Alto	3 (37.5%)	4.85±0.91 (3.06-6.64)	6 (2.68-9.32)	0,037*
<b>Plaqueta</b>				
Baixo	14 (60.9%)	10.69±1.84 (7.08-14.30)	14 (5.20-22.80)	
Normal	3 (42.9%)	2.25±0.39 (1.49-3.01)	3 (1.12-4.88)	
Alto	0 (0.0%)	8.00±2.00 (4.08-11.92)	6 (-.)	
<b>Citopenia</b>				
1 Linhagem afetada	1 (50.0%)	4.50±2.47 (0.00-9.35)	1	0,515
2 Linhagens afetadas	10 (62.5%)	10.76±2.16 (6.53-14.98)	10 (0.43-19.57)	
3 Linhagens afetadas	6 (42.9%)	5.09±0.62 (3.87-6.31)	6 (3.47-8.53)	
<b>Displasias</b>				
1 Linhagem afetada	3 (75.0%)	5.67±1.09 (3.53-7.80)	-	0,877
2 Linhagens afetadas	11 (55.0%)	8.48±2.11 (4.34-12.62)	6 (3.25-8.75)	
3 Linhagens afetadas	4 (44.4%)	8.56±2.11 (4.42-12.69)	10 (0.00-20.23)	
<b>Afetadas</b>				
1 Linhagem afetada	1 (100.0%)	-	-	0,420
2 Linhagens afetadas	10 (52.6%)	-	-	
3 Linhagens afetadas	7 (53.8%)	-	-	
<b>Da medula</b>				

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Normo	4 (66.7%)	12.38±3.01 (6.47-18.28)	10 (4.01-15.99)	0,001*
Hipo	7 (77.8%)	12.67±1.72 (9.29-16.04)	14 (-.)	
Hiper	8 (42.1%)	3.88±0.65 (2.62-5.15)	4 (2.50-5.50)	
<b>Eritopoese</b>				
Normal	1 (33.3%)	3.50±0.50 (2.52-4.48)	3 (-.)	0,334
Hiperplasia	6 (60.0%)	11.40±2.74 (6.03-16.77)	7 (-.)	
Hipoplasia	7 (77.8%)	9.00±1.33 (6.39-11.61)	10	
Displasia	1 (20.0%)	6.80±3.05 (0.82-12.78)	3 (0.85-5.15)	
Outros	0 (0.0%)	6.00±0.00 (6.00-6.00)	6 (-.)	
<b>Granulopoese</b>				
Normal	3 (50.0%)	9.65±3.40 (2.99-16.30)	10 (0.00-22.31)	0,733
Hiperplasia	4 (57.1%)	4.71±0.91 (2.94-6.49)	6 (-.)	
Hipoplasia	6 (75.0%)	6.50±0.94 (4.67-8.33)	-	
Displasia	2 (33.3%)	7.35±2.73 (2.01-12.70)	7 (0.84-13.16)	
Outros	0 (0.0%)	6.00±0.00 (6.00-6.00)	6 (-.)	
<b>Plaquetopoese</b>				
Normal	2 (50.0%)	5.00±1.15 (2.74-7.26)	6 (-.)	0,010*
Hiperplasia	4 (57.1%)	11.00±2.93 (5.26-16.74)	10 (1.02-18.98)	

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Hipoplasia	9 (90.0%)	7.80±0.18 (7.45-8.15)	-	
Displasia	1 (12.5%)	3.94±2.08 (0.00-8.01)	1	
Outros	1 (50.0%)	6.00±0.00 (6.00-6.00)	6 (-.)	
<b>Em anel</b>				
Não	13 (59.1%)	9.71±1.92 (5.96-13.47)	7 (0.19-13.81)	0,438
Sim	5 (45.5%)	6.22±1.34 (3.59-8.85)	6 (2.08-9.92)	
<b>Cariotipo</b>				
Bom	17 (58.6%)	-	-	0,827
Intermediário	1 (50.0%)	-	-	
Ruim	1 (100.0%)	-	-	
Muito ruim	0 (0.0%)	-	-	
<b>Alterações moleculares</b>				
Não	11 (52.4%)	9.56±1.98 (5.68-13.45)	6 (1.74-10.26)	0,522
Sim	7 (63.6%)	10.00±1.99 (6.10-13.90)	10 (0.00-22.72)	
<b>SE</b>				
Não	17 (58.6%)	9.76±1.71 (6.42-13.10)	7 (1.64-12.36)	0,453
Sim	1 (25.0%)	6.50±2.19 (2.21-10.79)	4 (0.00-9.23)	
<b>HPN</b>				

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	15 (53.6%)	-	-	0,319
Sim	1 (100.0%)	-	-	
<b>Transfusional</b>				
Não	16 (61.5%)	9.69±1.86 (6.04-13.35)	7 (0.33-13.67)	0,516
Sim	3 (37.5%)	6.25±1.55 (3.22-9.28)	6 (1.91-10.09)	
<b>Classificação OMS 2022</b>				
SMD com anomalias genéticas definidores	5 (55.6%)	6.96±1.57 (3.89-10.04)	10	0,793
SMD definida por morfologia	14 (56.0%)	9.62±1.77 (6.15-13.10)	7 (0.66-13.34)	
<b>Sub Classificação OMS 2022</b>				
SMD-5q	0 (0.0%)	-	-	0,855
SMDF3BI	2 (66.7%)	-	-	
MDS com inativação bialélica de TP53 (MDS-bi TP53)	1 (100.0%)	-	-	
MDS com blastos baixos e sideroblastos em anel	4 (66.7%)	-	-	
SMD com blastos baixos (SMD-LB)	3 (42.9%)	-	-	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB1)	2 (33.3%)	-	-	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB2)	0 (0.0%)	-	-	
SMD com fibrose (SMD-f)	2 (50.0%)	-	-	
SMD hipoplásicab SMD-h	5 (100.0%)	-	-	

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Classificação OMS 2016</b>				
SMD DUL	5 (100.0%)	-	-	0,453
SMD DML	7 (58.3%)	-	-	
SMD SA SML	4 (50.0%)	-	-	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 1	2 (33.3%)	-	-	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 2	0 (0.0%)	-	-	
SMD DEL 5Q	0 (0.0%)	-	-	
SMD INCLASSIFICAVEL	1 (100.0%)	-	-	
<b>Risco IPRSS R</b>				
Muito baixo	5 (62.5%)	11.95±3.19 (5.69-18.21)	) -	0,093
Baixo	11 (73.3%)	7.81±1.20 (5.46-10.15)	10	
Intermediário	3 (37.5%)	4.79±0.94 (2.94-6.64)	6 (3.47-8.53)	
Alto	0 (0.0%)	1.00±0.00 (1.00-1.00)	1	
Muito alto	0 (0.0%)	10.50±3.50 (3.64-17.36)	7 (-.)	
<b>Progressão</b>				
	19 (95.0%)	14.50±3.18 (8.26-20.74)	10	0,000*
Sim	0 (0.0%)	3.86±0.96 (1.98-5.74)	3 (1.19-4.81)	
<b>TCTH</b>				

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	17 (54.8%)	8.67±1.58 (5.57-11.76)	7 (3.11-10.89)	0,627
Sim	2 (66.7%)	7.00±0.71 (5.61-8.39)	6 (-.)	
<b>PD1</b>				
Não	10 (58.8%)	9.05±1.58 (5.96-12.14)	7 (2.63-11.37)	0,603
Sim	9 (52.9%)	8.61±2.30 (4.09-13.12)	10 (3.77-16.23)	
<b>PDL1</b>				
Não	10 (71.4%)	12.70±2.21 (8.38-17.03)	14 (2.33-25.67)	0,023*
Sim	9 (45.0%)	5.49±0.96 (3.61-7.37)	6 (1.87-10.13)	
<b>CTLA4</b>				
Não	7 (63.6%)	10.52±1.91 (6.78-14.26)	14 (-.)	0,285
Sim	12 (52.2%)	7.66±1.87 (3.99-11.34)	6 (2.43-9.57)	
<b>PD1-PDL1</b>				
Não	14 (63.6%)	10.54±1.89 (6.82-14.25)	7 (0.29-13.71)	0,087
Sim	5 (41.7%)	5.41±1.36 (2.75-8.08)	4 (1.37-6.63)	
<b>PD1-CTLA4</b>				
Não	11 (57.9%)	8.77±1.51 (5.82-11.72)	7 (4.24-9.76)	0,733
Sim	8 (53.3%)	8.64±2.42 (3.90-13.38)	10 (3.34-16.66)	
<b>PDL1-CTLA4</b>				

Continuação da tabela 14 da página anterior

	Sobrevida Global			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	11 (68.8%)	12.03±2.15 (7.82-16.25)	14 (2.28-25.72)	0,044*
Sim	8 (44.4%)	5.54±1.02 (3.55-7.54)	6 (2.77-9.23)	
<b>PD1-PDL1-CTLA4</b>				
Não	14 (60.9%)	10.15±1.84 (6.54-13.75)	7 (0.19-13.81)	0,196
Sim	5 (45.5%)	5.78±1.48 (2.88-8.68)	4 (0.00-8.42)	

Nota:\*p<0,05, teste Log-Rank Mantel-Cox. EPM = erro padrão da média; IC95% = intervalo confiança 95%.

End of Table

A análise de Regressão de Cox, é um teste de sobrevivência que foi realizado para avaliar a relação entre fatores de risco e a incidência de uma determinada doença, no caso a SMD. Diante disso, na regressão de Cox da SG, a variável progressão demonstrou ser um preditor com 6,48 vezes mais chances de influenciar na sobrevida independentemente dos fatores como idade, neutrófilos, plaquetas, celularidade, plaquetopose, risco, e a expressão de apenas PDL1+, PD1+PDL1+, PDL1+CTLA4+ e PD1+PDL1+CTLA4+ juntos (HR, 6,48;  $p=0,024^*$ ). (Tabela 15).

Tabela 15 – Regressão de Cox da Análise de Sobrevida Global

	<b>p-Valor</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	
Idade CAT	0,159	2,17	0,05	9,59
Segmentado CAT	0,092	1,76	0,43	7,27
Plaqueta CAT	0,124	1,14	0,51	2,54
Da medula	0,420	2,67	0,25	29,17
Plaquetopose	0,364	0,65	0,25	1,66
Risco IPRSS R	0,600	1,70	0,23	12,33
Progressão	0,024*	6,48	3,12	13,46
PDL1	0,998	1,37	0,00	5,75
PD1-PDL1	0,978	1,60	0,16	2,30
PDL1-CTLA4	0,984	2,21	0,55	8,90
PD1-PDL1-CTLA4	0,964	1,09	0,28	4,23

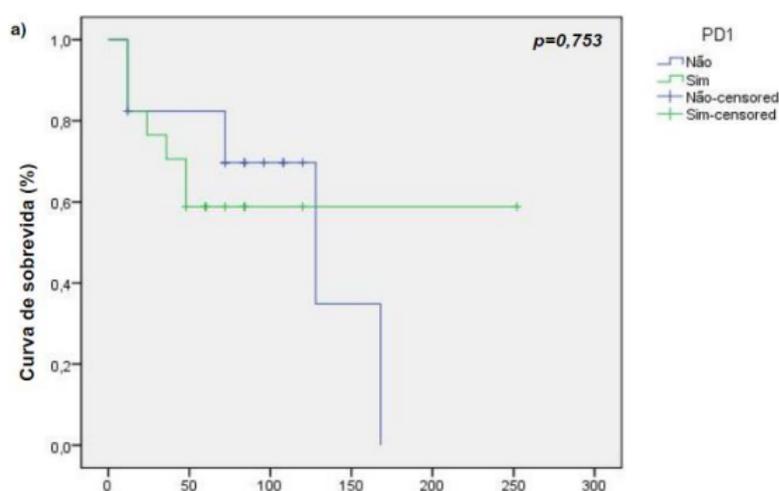
Nota: \* $p<0,05$ , regressão de Cox; HR = hazard risk; IC95% = Intervalo de confiança 95%.

Na análise de sobrevida livre de progressão (SLP), a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4 não apresentaram associação estatisticamente significativa com a sobrevida livre de progressão ( $p>0,05$ ) (Gráfico 9 a - d)(Tabela 16). A expressão de PD-1, apresentou uma taxa de SLP de 58,8%, porém sem significância estatística com a progressão ( $p=0,753$ ). A expressão de PD-L1 apresentou taxa de SLP de 50% com mediana de progressão de 128 meses mas sem significância estatisticamente significativa ( $p=0,083$ ). O CTLA4 teve uma taxa de SLP de 56,5% com mediana de progressão de 128 meses, porém sem significância estatística ( $p=0,625$ ). A expressão de PD1+PDL1+CTLA4+ juntos apresentou taxa (SLP) de 54,5%, sem associação significativa com a progressão ( $p=0,310$ ) (Tabela 16).

Na análise de sobrevida livre de progressão (SLP), as variáveis idade, celularidade da MO e alterações na linhagem megacariocítica foram associadas com menor sobrevida livre de progressão ( $p<0,05$ ) (Tabela 16). Com relação a idade, pacientes com idade acima de 70 anos foram associados com uma menor taxa de sobrevida livre de progressão 42,1% com mediana de 72 meses, enquanto paciente com idade abaixo de 70 anos apresentaram maior SLP com 76,9%

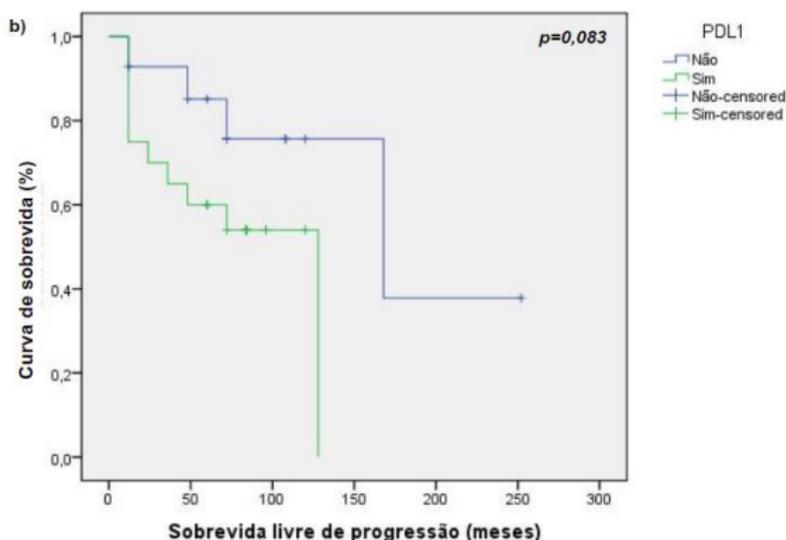
dos casos e mediana de 128 meses ( $p=0,037$ ). A variável celularidade da MO, em pacientes com MO hipercelular também apresentaram menor SLP 42,1% com mediana de 48 meses de sobrevida. Enquanto, os pacientes hipocelulares foram associados com maior SLP com taxa de 77,8% dos casos e mediana de sobrevida de 168 meses ( $p=0,009$ ). A variável de alterações na linhagem megacariocítica com hipoplasia da MO associou-se com maior sobrevida com taxa SLP de 90% dos casos com mediana de 128 meses (Tabela 16).

**Gráfico 9 a:** Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.



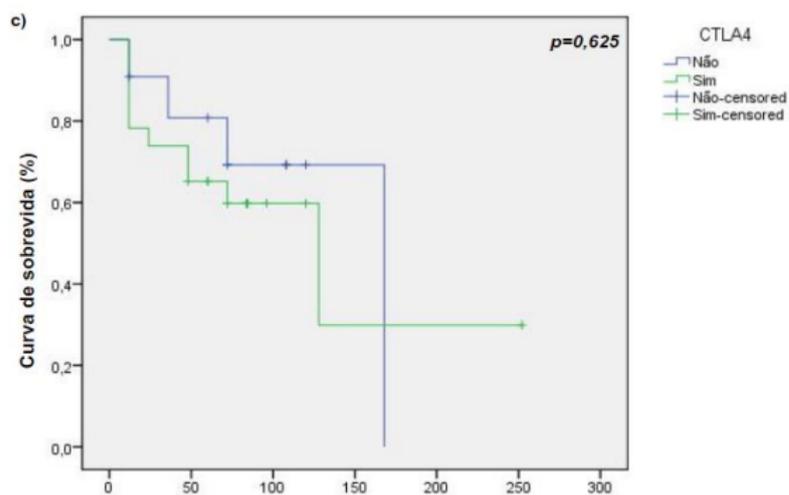
Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox

**Gráfico 9 b:** Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.



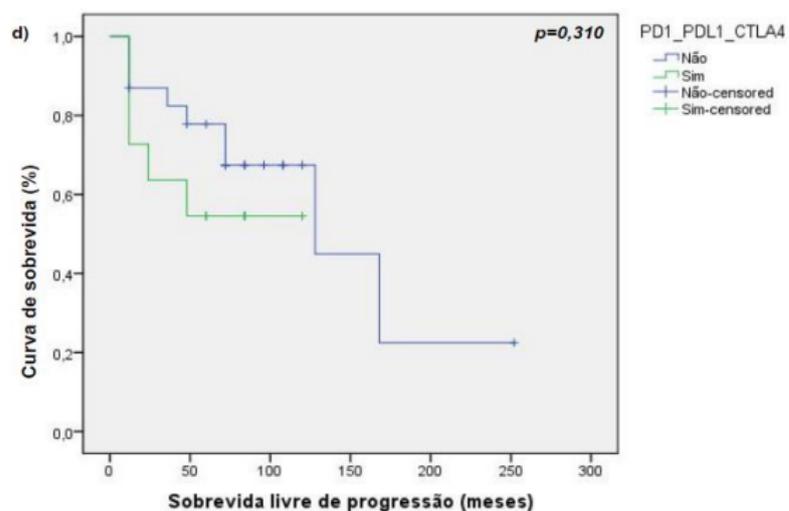
Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox

**Gráfico 9 c:** Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.



Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox

**Gráfico 9 d:** Sobrevida Livre de Progressão (SLP) dos pacientes com SMD e a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA4.



Nota: \* $p<0,05$ , teste Log-Rank Mantel-Cox

Tabela 16 – Associação da Sobrevida Global (SG) dos pacientes com SMD com as variáveis clínicas e sociodemográficas com a expressão de PD-1, PD-L1 E CTLA4.

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Total</b>	20 (58.8%)	126.85±22.79 (82.18-171.51)	128 (33.43-222.57)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	7 (43.8%)	95.90±17.56 (61.49-130.31)	128 (36.66-219.34)	0,188
Feminino	13 (72.2%)	185.94±25.05 (136.84-235.04)	-	
<b>Idade</b>				
Até 70	10 (76.9%)	164.21±39.66 (86.48-241.93)	128 (48.83-207.17)	0,037*
>70	8 (42.1%)	91.58±17.39 (57.50-125.66)	72 (24.67-119.33)	
<b>Procedência</b>				
Interior	4 (50.0%)	72.00±17.36 (37.97-106.03)	48	0,563
Fortaleza	9 (60.0%)	157.17±29.14 (100.05-214.29)	-	
Não Informado	7 (63.6%)	123.27±22.63 (78.92-167.62)	128 (0.00-291.98)	
<b>Profissão</b>				
Não Informado	12 (70.6%)	154.10±28.68 (97.88-210.32)	168 (71.02-264.98)	0,198
Agricultor	3 (60.0%)	68.80±10.35 (48.51-89.09)	-	
Doméstica	2 (33.3%)	58.00±19.88 (19.03-96.97)	12	
Autônomo	1 (33.3%)	56.00±22.86 (11.19-100.81)	48 (0.00-105.61)	

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Outros	2 (66.7%)	92.00±22.86 (47.19-136.81)	-	
<b>Hemácias</b>				
Baixo	16 (55.2%)	121.83±29.11 (64.76-178.89)	128 (48.24-207.76)	0,481
Normal	1 (50.0%)	168.00±0.00 (168.00-168.00)	168	
<b>Hemoglobina</b>				
Baixo	16 (53.3%)	-	-	0,323
Normal	2 (100.0%)	-	-	
<b>Hematócrito</b>				
Baixo	14 (53.8%)	102.57±14.80 (73.56-131.57)	128 (48.21-207.79)	0,228
Normal	4 (80.0%)	204.00±42.93 (119.85-288.15)	-	
<b>Leucócito</b>				
Baixo	7 (63.6%)	-	-	0,431
Normal	10 (50.0%)	-	-	
Alto	1 (100.0%)	-	-	
<b>Neutrófilo</b>				
Baixo	6 (60.0%)	-	-	0,507
Normal	11 (52.4%)	-	-	
Alto	1 (100.0%)	-	-	

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Segmentado</b>				
Baixo	4 (57.1%)	165.43±34.25 (98.31-232.55)	168 (27.55-308.45)	0,281
Normal	10 (50.0%)	81.19±12.39 (56.91-105.47)	128	
Alto	4 (80.0%)	88.80±17.17 (55.14-122.46)	-	
<b>Eosinofilo</b>				
Baixo	8 (66.7%)	90.86±12.36 (66.63-115.09)	-	0,899
Normal	8 (47.1%)	117.39±25.82 (66.78-168.00)	128 (27.44-228.56)	
Alto	2 (66.7%)	66.00±12.73 (41.05-90.95)	48	
<b>Linfocito</b>				
Baixo	12 (57.1%)	110.11±16.03 (78.69-141.53)	128 (48.44-207.56)	0,745
Normal	6 (54.5%)	141.82±35.99 (71.28-212.36)	-	
<b>Linfocito percentual</b>				
Baixo	1 (25.0%)	79.00±31.00 (18.24-139.76)	48 (0.00-123.79)	0,601
Normal	12 (66.7%)	87.86±10.91 (66.48-109.25)	-	
Alto	5 (50.0%)	140.40±32.62 (76.46-204.34)	168 (26.36-309.64)	
<b>Monocito</b>				
Baixo	4 (80.0%)	98.40±19.32 (60.53-136.27)	-	0,343
Normal	11 (57.9%)	143.39±27.44 (89.60-197.19)	168 (30.78-305.22)	

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Alto</b>	3 (37.5%)	75.80±20.03 (36.54-115.06)	72 (24.18-119.82)	0,238
<b>Plaqueta</b>				
Baixo	14 (60.9%)	135.43±25.39 (85.66-185.20)	128 (46.52-209.48)	
Normal	3 (42.9%)	44.14±12.42 (19.79-68.49)	36 (9.93-62.07)	
<b>Alto</b>	1 (50.0%)	96.00±16.97 (62.74-129.26)	72	0,301
<b>Citopenia</b>				
1 Linhagem afetada	1 (50.0%)	60.00±33.94 (0.00-126.52)	12	
2 Linhagens afetadas	11 (68.8%)	161.02±30.50 (101.23-220.81)	168 (0.00-355.09)	
3 Linhagens afetadas	6 (42.9%)	82.71±13.70 (55.87-109.56)	72 (38.46-105.54)	
<b>Displasias</b>				
1 Linhagem afetada	3 (75.0%)	66.00±15.59 (35.45-96.55)	-	0,874
2 Linhagens afetadas	11 (55.0%)	123.10±30.21 (63.88-182.31)	128 (46.73-209.27)	
3 Linhagens afetadas	5 (55.6%)	118.67±26.97 (65.80-171.53)	168	
<b>Afetadas</b>				
1 Linhagem afetada	1 (100.0%)	-	-	0,496
2 Linhagens afetadas	10 (52.6%)	-	-	
3 Linhagens afetadas	8 (61.5%)	-	-	
<b>Da medula</b>				

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Normo	5 (83.3%)	222.00±27.39 (168.32-275.68)	-	0,009*
Hipo	7 (77.8%)	156.00±15.87 (124.89-187.11)	168	
Hiper	8 (42.1%)	71.07±13.05 (45.50-96.64)	48 (10.95-85.05)	
<b>Eritopoese</b>				
Normal	1 (33.3%)	36.00±13.86 (8.84-63.16)	48	0,128 (45.99-210.01)
Hiperplasia	6 (60.0%)	138.67±38.23 (63.73-213.60)	128	
Hipoplasia	8 (88.9%)	108.00±11.31 (85.83-130.17)	-	
Displasia	1 (20.0%)	81.60±36.64 (9.79-153.41)	36 (10.24-61.76)	
Outros	0 (0.0%)	72.00±0.00 (72.00-72.00)	72	
<b>Granulopoese</b>				
Normal	4 (66.7%)	174.00±45.06 (85.69-262.31)	-	0,755
Hiperplasia	4 (57.1%)	59.31±10.01 (39.69-78.94)	72 (36.37-107.63)	
Hipoplasia	6 (75.0%)	93.00±16.53 (60.59-125.41)	-	
Displasia	2 (33.3%)	106.67±29.81 (48.24-165.09)	128 (0.00-265.72)	
Outros	0 (0.0%)	72.00±0.00 (72.00-72.00)	72	
<b>Plaquetopoese</b>				
Normal	2 (50.0%)	61.50±14.64 (32.81-90.19)	72 (0.00-161.82)	0,023*
Hiperplasia	5 (71.4%)	184.00±39.26 (107.05-260.95)	-	

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Hipoplasia	9 (90.0%)	128.00±0.00 (128.00-128.00)	) 128	
Displasia	1 (12.5%)	55.50±24.99 (6.52-104.48)	12	
Outros	1 (50.0%)	72.00±0.00 (72.00-72.00)	72	
<b>Em anel</b>				
Não	13 (59.1%)	132.02±25.30 (82.42-181.61)	128 (31.76-224.24)	0,483
Sim	6 (54.5%)	78.91±14.11 (51.25-106.56)	-	
<b>Cariotipo</b>				
Bom	18 (62.1%)	-	-	0,861
Intermediário	1 (50.0%)	-	-	
Ruim	1 (100.0%)	-	-	
Muito ruim	0 (0.0%)	-	-	
<b>Alterações moleculares</b>				
Não	11 (52.4%)	120.69±30.31 (61.29-180.10)	128 (47.46-208.54)	0,332
Sim	8 (72.7%)	139.64±22.22 (96.09-183.18)	168	
<b>SE</b>				
Não	17 (58.6%)	127.83±23.63 (81.51-174.14)	128 (32.81-223.19)	0,540
Sim	2 (50.0%)	78.00±21.42 (36.01-119.99)	48	
<b>HPN</b>				

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	15 (53.6%)	-	-	0,457
Sim	1 (100.0%)	-	-	
<b>Transfusional</b>				
Não	16 (61.5%)	133.43±24.77 (84.87-181.99)	128 (33.05-222.95)	0,385
Sim	4 (50.0%)	76.50±16.56 (44.04-108.96)	72	
<b>Classificação OMS 2022</b>				
SMD com anomalias genéticas definidores	6 (66.7%)	88.53±15.18 (58.77-118.29)	-	0,889
SMD definida por morfologia	14 (56.0%)	125.91±24.01 (78.86-172.97)	128 (31.74-224.26)	
<b>Sub Classificação OMS 2022</b>				
SMD-5q	1 (100.0%)	-	-	0,709
SMDF3BI	2 (66.7%)	-	-	
MDS com inativação bialélica de TP53 (MDS-bi TP53)	1 (100.0%)	-	-	
MDS com blastos baixos e sideroblastos em anel	4 (66.7%)	-	-	
SMD com blastos baixos (SMD-LB)	3 (42.9%)	-	-	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB1)	2 (33.3%)	-	-	
SMD com aumento de blastos (SMD-IB2)	0 (0.0%)	-	-	
SMD com fibrose (SMD-f)	2 (50.0%)	-	-	
SMD hipoplásicab SMD-h	5 (100.0%)	-	-	

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
<b>Classificação OMS 2016</b>				
SMD DUL	5 (100.0%)	-	-	0,458
SMD DML	7 (58.3%)	-	-	
SMD SA SML	4 (50.0%)	-	-	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 1	2 (33.3%)	-	-	
SMD COM EXCESSO DE BLASTO 2	0 (0.0%)	-	-	
SMD DEL 5Q	1 (100.0%)	-	-	
SMD INCLASSIFICAVEL	1 (100.0%)	-	-	
<b>Risco IPRSS R</b>				
Muito baixo	5 (62.5%)	163.50±40.41 (84.29-242.71)	-	0,085
Baixo	12 (80.0%)	103.71±8.36 (87.32-120.11)	-	
Intermediário	3 (37.5%)	63.00±14.81 (33.97-92.03)	72 (0.00-152.52)	
Alto	0 (0.0%)	12.00±0.00 (12.00-12.00)	12	
Muito alto	0 (0.0%)	148.00±20.00 (108.80-187.20)	128	
<b>TCTH</b>				
Não	18 (58.1%)	125.68±23.33 (79.94-171.41)	128 (33.10-222.90)	0,763
Sim	2 (66.7%)	96.00±9.80 (76.80-115.20)	-	
<b>PD1</b>				

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	10 (58.8%)	114.37±17.70 (79.69-149.06)	128 (48.35-207.65)	0,753
Sim				
<b>PDL1</b>				
Não	10 (71.4%)	170.27±30.20 (111.08-229.46)	168 (31.41-304.59)	0,083
Sim	10 (50.0%)	81.84±12.34 (57.66-106.02)	128	
<b>CTLA4</b>				
Não	7 (63.6%)	129.40±21.83 (86.61-172.19)	168	0,625
Sim	13 (56.5%)	125.33±31.20 (64.18-186.47)	128 (48.04-207.96)	
<b>PD1 PDL1</b>				
Não	14 (63.6%)	140.90±25.65 (90.62-191.18)	128 (46.55-209.45)	0,136
Sim	6 (50.0%)	72.00±14.14 (44.28-99.72)	48	
<b>PD1 CTLA4</b>				
Não	11 (57.9%)	111.05±16.92 (77.88-144.22)	128 (48.20-207.80)	0,936
Sim	9 (60.0%)	161.60±28.71 (105.33-217.87)	-	
<b>PDL1 CTLA4</b>				
Não	11 (68.8%)	164.04±29.18 (106.84-221.23)	168 (31.38-304.62)	0,124
Sim	9 (50.0%)	81.75±13.25 (55.78-107.73)	128	
<b>PD1 PDL1 CTLA4</b>				

Continuação da tabela 16 da página anterior

	Sobrevida livre de progressão			
	%	Média±EPM (IC95%)	Mediana (IC95%)	p-Valor
Não	14 (60.9%)	136.05±24.93 (87.18-184.92)	128 (32.40-223.60)	0,310
Sim	6 (54.5%)	75.27±15.04 (45.79-104.76)	-	

Nota: \*p<0,05, teste Log-Rank Mantel-Cox. EPM = erro padrão da média; IC95% confiança 95%. TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas, SMD: síndrome Mielodisplásica, Hemoglobinúria Paroxística Noturna, PD-1: Receptor de Morte Programada-1, PD-L1: Ligante do Morte Programada -1, CTLA4

End of Table

Na análise de regressão de Cox da Sobrevida Livre de Progressão, observou-se que os pacientes com expressão positiva de PDL1+CTLA4+ é um fator preditivo com 5.99 vezes mais chances de progressão independentemente de sexo, idade, profissão, medula, eritropoese, plaquetopese, risco, PDL1+, PD1+PDL1+ apenas (HR, 5,99; p=0,013). Ou seja, a expressão de PD-L1 e CTLA4 juntos correspondem a um preditor de progressão independente de outros fatores.

Tabela 17 – Regressão de Cox da Análise de Sobrevida Livre de Progressão

<b>Sobrevida livre de progressão</b>				
	<b>p-Valor</b>	<b>HR</b>	<b>IC95%</b>	
Sexo	0,193	0,28	0,04	1,89
Idade	0,060	5,93	0,85	41,58
Profissão	0,057	5,69	0,40	23,17
Da medula	0,059	5,57	0,94	33,10
Eritopoese	0,677	0,82	0,32	2,08
Plaquetopese	0,364	1,49	0,63	3,56
Risco IPRSS R	0,938	0,97	0,42	2,23
PDL1	0,087	0,02	0,00	1,73
PD1 PDL1	0,265	0,23	0,02	3,03
PDL1 CTLA4	0,013*	<b>5,99</b>	<b>1,96</b>	<b>90,61</b>

Nota: \*p<0,05, regressão de Cox; HR = hazard risk; IC95% = Intervalo de confiança 95%.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo observamos nos pacientes com SMD, uma média de idade de 69,91 anos ao diagnóstico, próxima da média mundial de 71 anos (SALLMAN; PADRON, 2017). No Brasil em 2010, a média de idade da SMD foi de 68,3 anos (MAGALHAES *et al.*, 2010). Em 2019, um estudo de pacientes com SMD no estado do Ceará, reportou uma mediana de 75 anos de idade (MOURA *et al.*, 2019). A SMD é uma doença que está associada com aumento da idade e esse fato deve-se as alterações biológicas do envelhecimento que são um pré-requisito para o desenvolvimento da SMD, dentre elas instabilidade genômica, alterações epigenéticas, alterações no splicing de RNA, disfunção mitocondrial, esgotamento das células tronco, microambiente da medula óssea alterado, senescência celular e inflamação sistêmica que contribuem para o surgimento de eventos clonais da hematopoiese. Diante disso, acredita-se que a incidência da SMD aumente nas próximas décadas (HEIBL *et al.*, 2021).

Observamos uma maior frequência de SMD na população feminina e uma maior procedência de pacientes oriundos do interior do estado do Ceará. O presente estudo corrobora com o estudo de Moura *et al.* (2019) onde os pacientes com SMD do serviço de hematologia do Ceará, também apresentou maior frequência do sexo feminino, no entanto, alguns estudos têm reportado uma maior prevalência no sexo masculino (MAGGIONI *et al.*, 2023). O aumento de casos no sexo feminino deve-se aos comportamentos de saúde com a maior procura de serviços de saúde além de representarem a maioria da população brasileira de acordo o último Censo demográfico brasileiro divulgado pelo (IBGE DO, 2022; BELON *et al.*, 2014). Destaca-se ainda, que estudos tem demonstrado uma associação entre o sexo masculino e as mutações nos genes ASXL1, DDX41, IDH2, SRSF2, TET2, U2AF1 e ZRSR2 são mais propensas de aparecer, e o sexo feminino com as mutações nos genes DNMT3A e TP53.(MAGGIONI *et al.*, 2023; TINSLEPY-VANCE *et al.*, 2023).

Em relação ao subtipo de SMD ao diagnóstico, observamos uma maior frequência do tipo SMD com blastos baixos (SMD-LB). Esse resultado corrobora com o estudo de Zhang *et al.* (2022), que analisaram 852 pacientes com SMD ao diagnóstico e identificaram uma maior frequência de pacientes do subtipo SMD-LB, SMD-EB1, SMD-EB2 e SMD-h de acordo com a classificação da OMS 2022. Quanto ao IPSS-R, a maioria dos pacientes com SMD apresentou-se como sendo de baixo risco. Esse resultado também corrobora com os dados demonstrados em 2019, em um estudo realizado na mesma região (MOURA *et al.*, 2019). Esses resultados reforçam que a maioria dos pacientes com SMD ao diagnóstico são de baixo risco.

No presente estudo, observamos uma elevada taxa de positividade da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em biópsias de medula óssea, com maior positividade de marcação de CTLA4 seguida da positividade de PD-L1 nos pacientes com SMD. O grupo de YANG *et al.* (2014) demonstrou uma maior positividade da expressão da proteína PD-L1. Outros estudos, no entanto, não observaram diferenças no padrão de expressão entre pacientes com SMD e o grupo controle (GENG *et al.*, 2022). Deve-se destacar que a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 se apresenta constitutivamente em baixas concentrações em condições normais. No entanto, em neoplasias, a expressão dessas proteínas se desregula e aumenta significativamente. Estudos têm demonstrado aumento da expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com SMD, quando comparados ao grupo controle (SAMPAIO *et al.*, 2023; CHENG *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2014)). A expressão das proteínas de *checkpoint* imune é heterogênea em células-tronco hematopoiéticas e subconjuntos de células imunes na SMD, variando em cada indivíduo (SALLMAN; PADRON, 2017). O aumento expressivo de CTLA4 no presente estudo pode ser justificado pela expressão constitutiva em Linfócitos T reguladores (Treg), que estão aumentadas no microambiente imunossupressor da SMD. Dessa forma, o CTLA4 em células Treg pode sequestrar ou internalizar o ligante B7 das Células Apresentadoras de Antígeno (APCs), resultando na falta de coestimulação de CD28:B7, levando à redução da proliferação das células T e à redução de células efetoras (BUCHBINDER *et al.*, 2016).

Quando analisamos a intensidade de marcação da expressão proteica do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 no referido estudo, observamos que a proteína PD-L1 apresentou maior intensidade de marcação quando comparada às demais. Yang e colaboradores (2016) demonstraram uma positividade forte de PD-L1 em 20% dos pacientes com SMD. A intensidade de expressão de PD-L1 indica um potencial alvo para o uso de inibidores de checkpoint. No entanto, a expressão de PD-L1 é heterogênea e depende de vários processos biológicos, como a regulação da expressão dessa proteína nos níveis de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução, por numerosos fatores, incluindo estímulos inflamatórios e vias oncogênicas (LEE, 2022). Por exemplo, as células T infiltrantes tumorais induzem a expressão de PD-L1, e a ausência de células T leva à falta de expressão reativa de PD-L1 (LEE, 2022). Essa heterogeneidade do padrão de expressão de PD-L1 pode ter implicações no tratamento, sendo a falta de padronização nacional quanto à forma de analisar a expressão de PD-L1 uma desvantagem da técnica (PERANZONI; AL., 2020). No presente estudo, verificamos uma positividade expressiva de PD-L1 em megacariócitos na medula óssea. Este achado foi inesperado, uma vez que não utilizamos uma marcação específica

para megacariócitos. No entanto, parece ser um achado inovador, uma vez que não encontramos relatos na literatura até o momento sobre isso na SMD. Prestipino e al. (2018) verificaram positividade para PD-L1 em plaquetas, monócitos e em células supressoras mieloides derivadas de monócitos (MDSCs) de pacientes com doenças mieloproliferativas crônicas positivas para JAK2 V617F. O grupo de O'Malley e al. (2019) enfatiza que os megacariócitos na medula óssea são sempre positivos para PD-L1, independentemente da doença. No entanto, este fato não foi comprovado em nossa casuística, onde verificamos um padrão heterogêneo. Este resultado corrobora com o grupo de Lee (2022), onde a expressão de PD-L1 em megacariócitos foi analisada em pacientes com mielofibrose por imuno-histoquímica, considerando a proporção de células coradas positivamente, assim como a intensidade da coloração. Foi observado que pacientes com expressão positiva de PD-L1 em megacariócitos apresentavam mielofibrose evidente e uma sobrevida global menos favorável nesses pacientes (LEE, 2022).

No presente estudo, em relação às análises multivariadas das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com o perfil sociodemográfico e clínico, verificamos associação entre a expressão positiva de PD-1 com o sexo feminino e ausência de mielofibrose, e com a expressão concomitante de CTLA4. A proteína PD-L1 apresentou associação com a positividade de CTLA4. Já na expressão de CTLA4, houve associação com os neutrófilos e a disgranulopoese. No estudo de associação das proteínas PD-1, PD-L1, PD-L2 e CTLA4 com 124 pacientes com SMD, a expressão de PD-1 apresentou associação com a idade, o PD-L2 com o sexo feminino, o PD-L1 com os critérios de classificação da OMS 2016 e o CTLA4 com leucócitos aumentados, IPSS de baixo risco e ausência de terapia prévia (YANG *et al.*, 2014). No estudo de Liu e al. (2019), a positividade de PD-1 e PD-L1 por imunohistoquímica não se associou com as variáveis sexo, idade e classificação em pacientes com SMD. Sallman e Padron (2017) também não observaram associação da expressão de PD-L1 com a porcentagem de blastos, progressão da doença ou categorias de risco IPSS-R. As discrepâncias atribuídas à avaliação por imunohistoquímica podem ser um reflexo da expressão heterogênea desses receptores e dos fatores clínicos que variam em cada paciente. Além disso, falta uma padronização mundial quanto à forma de analisar a marcação de PD-L1 por essa técnica (PERANZONI; AL., 2020).

No presente estudo, ao analisarmos a expressão gênica do PD-1, PD-L1 e CTLA-4, observamos um leve aumento da expressão, mas não identificamos diferenças significativas quando comparado ao grupo controle. O estudo de Geng *et al.* (2022) mostrou uma elevada expressão gênica de PD-1 e PD-L1 em pacientes com SMD. YANG *et al.* (2014) avaliaram

a expressão gênica em células CD34+ do aspirado medular e de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com SMD, comparando com leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), LMA e indivíduos saudáveis. Em relação à expressão gênica do PD-1, PD-L1, PD-L2 e CTLA4 em células CD34+, o grupo demonstrou um aumento da expressão na SMD em comparação com a população normal. Nas células mononucleares, também observou-se um aumento da expressão gênica do PD1 (5,2%), PD-L1 (4,4%), PD-L2 (2,7%) e CTLA4 (1%) em relação à população normal. Nesse contexto, podemos inferir que a expressão gênica do PD-1, PD-L1 e CTLA4 foi maior no presente estudo em relação aos dados obtidos por Yang e colaboradores na população de pacientes adultos com SMD. No entanto, não obtivemos uma diferença estatisticamente significativa com o grupo controle, o que pode ser atribuído principalmente à pequena amostragem de pacientes no presente estudo. Destaca-se ainda as dificuldades na obtenção de amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de SMD, por se tratar de uma doença rara e de difícil diagnóstico, sendo o mesmo realizado na sua maioria por exclusão. Além disso, vários fatores podem controlar a expressão dos genes PD-1, PD-L1 e CTLA4, como fatores de transcrição e componentes epigenéticos, incluindo metilação de DNA e modificações de histonas (BALLY *et al.*, 2016). Dentre eles, o uso dos agentes hipometilantes pode influenciar a expressão gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4. (WONG *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2014).

No presente estudo, nas análises multivariadas dos genes PD1, PD-L1 e CTLA4 com o perfil sociodemográfico e clínico, verificamos associação do PD-1 com a idade <70 anos. O gene PD-L1 associou-se com a dependência transfusional e com o subtipo SMD hipoplásica, enquanto o gene CTLA4 associou-se com a expressão dos outros genes PD-1 e PD-L1. YANG *et al.* (2014) encontraram associação da expressão de PD-1 com a idade. No estudo de Sampaio *et al.* (2023), a expressão de PD-L1 foi avaliada por PCR em tempo real em 53 pacientes com SMD do Ceará, onde foi relatada uma associação entre a expressão de PD-L1 com a classificação OMS 2016 e a diseritropoese. Em pacientes com LMA-M5, a expressão de PD-L1 também foi associada com a classificação e com maior chance de recidiva. Na LMA, a expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 foi associada com a expressão concomitante de CTLA4, dado que corrobora com o resultado do presente estudo, onde a expressão de PD-1 e PD-L1 associaram-se com a expressão de CTLA4 e vice-versa (CHEN; AL., 2020).

Nesta análise, observamos que a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 juntos associaram-se com menor sobrevida global, com uma mediana de sobrevida de 6 meses, cor-

roborando com os dados da literatura que estimam a expressão de PD-L1 como um indicador significativo de uma sobrevida mais curta em vários tipos de câncer (SAMPAIO *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2014). No estudo da expressão de PD-L1 em pacientes com SMD do Ceará, aqueles categorizados com pior prognóstico também apresentaram menor sobrevida global, com uma mediana de 14 meses (SAMPAIO *et al.*, 2023). No estudo de YANG *et al.* (2014), observou-se que a maior expressão de PD-L1 em pacientes com SMD foi correlacionada com pior sobrevida.

As variáveis idade, plaquetas, celularidade, dismegacariopose e progressão também se associaram a menor sobrevida global nos pacientes que expressaram os receptores do checkpoint imune, sendo a progressão um preditor independente que apresenta 6,48 vezes mais chances de influenciar na sobrevida global. A idade é um fator determinante na patogênese da SMD e, conseqüentemente, na expressão desses receptores imunes. As alterações na linhagem megacariocítica condizem com os achados do presente estudo, como a expressão de PD-L1 em megacariócitos. Já a progressão, está intimamente relacionada com as vias PD-1/PD-L1 e CTLA4/B7, pois ambas participam da evasão imune e da exaustão de células T citotóxicas em neoplasias hematológicas (BODDU; AL., 2018). Na meta-análise que avalia a expressão sérica de PD-L1 em mais de seis tipos de câncer, os pacientes com níveis elevados de PD-L1 sérica tiveram um risco 20% maior de progressão da doença e 67% de maior risco de morte (SZÉLES; AL., 2022).

Na avaliação de sobrevida livre de progressão, não observamos associação entre a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4. Contudo, verificamos que a idade, celularidade e disgranulopose foram associadas com menor sobrevida livre de progressão. Além disso, a expressão dupla de PD-L1 e CTLA-4 foi associada como um preditor de progressão independente de outras variáveis. Na LMA, a expressão de PD-1 em células TCD8+ no diagnóstico foi preditiva de menor sobrevida livre de eventos, no entanto, nossos resultados são discrepantes (DAVER *et al.*, 2018). Em outras neoplasias, o valor preditivo da expressão de PD-L1 varia entre os diferentes estudos. Um estudo realizado com pacientes sob tratamento imunoterápico mostrou maior sobrevida livre de progressão, sugerindo um valor preditivo relevante para alta expressão de PD-L1 nesta população. No entanto, para melanoma maligno, carcinoma de células renais e câncer urotelial, o PD-L1 não apresentou associação com a predição da sobrevida livre de progressão (CHAE; AL., 2018).

Diante disso, o presente estudo ressalta a importância de identificar a expressão

dos receptores imunes envolvidos na desregulação imune da SMD, contribuindo assim para o direcionamento da terapia e melhora do prognóstico dos pacientes com SMD (BARREYRO *et al.*, 2012). O estudo da expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 pode ser avaliado por uma variedade de técnicas de diagnóstico disponíveis. Dentre elas, podemos dosar os níveis plasmáticos das proteínas por ensaio imunoenzimático (ELISA) ou por Western Blot, na detecção das proteínas no homogeneizado do tecido tumoral. Além disso, podemos utilizar técnicas moleculares, como painéis de sequenciamento ou PCR em tempo real, para o estudo do mRNA e do microRNA, que fornecem informações valiosas sobre o nível de expressão. No entanto, a técnica de imunohistoquímica é a mais abordada, com diversos testes aprovados pelo Food and drugs administration (FDA). Realizada de forma prática e econômica, tem como objetivo avaliar a expressão das proteínas em células tumorais, células infiltrantes de tumor ou ambas. Todas as técnicas citadas, incluindo as utilizadas no estudo, oferecem vantagens e limitações, mas a combinação das abordagens oferece uma compreensão ampliada do perfil de expressão (AKHTAR *et al.*, 2021).

As limitações deste estudo incluem a dificuldade em obter um número amostral representativo de pacientes, devido à SMD ser uma doença rara. Além disso, as biópsias da medula óssea e do sangue periférico dos pacientes com SMD foram obtidas em dois momentos diferentes, o que pode resultar em viés no perfil de expressão na comparação das duas técnicas. Também observamos muitas marcações inespecíficas, dificultando a padronização e análise por Imunohistoquímica (IHQ). Essas restrições devem ser consideradas ao interpretar os resultados, e futuras pesquisas podem abordar essas limitações para uma melhor compreensão da doença.

Nesse contexto, podemos inferir que a análise da expressão proteica e gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 foi expressiva na SMD ao diagnóstico e associou-se com variáveis sociodemográficas e clínicas, bem como com o prognóstico. Esses resultados consolidam a importância da análise da expressão desses biomarcadores no diagnóstico, bem como no monitoramento da doença.

## 7 CONCLUSÃO

- A expressão proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 revelou-se elevada em pacientes com SMD.
- A expressão proteica aumentada de PD-1 mostrou associação com o sexo feminino e mielofibrose, enquanto a expressão positiva de CTLA4 se associou baixa contagem de neutrófilos e à disgranulopose.
- Não houve diferença significativa entre a expressão gênica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 com grupo controle.
- A expressão gênica positiva de PD1 mostrou associação com a faixa etária  $\leq 70$  anos e a expressão positiva de PD-L1 associou com a dependência transfusional e ao subtipo SMD hipoplásica.
- A expressão positiva de PD-L1, assim como com a expressão conjunta de PD-L1 e CTLA4 associou com menor Sobrevida Global (SG).
- Além disso, a expressão dupla de PD-L1 e CTLA4 conferiu ser um fator preditivo para uma menor sobrevida livre de progressão (SLP).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2015.
- AKHTAR, M.; RASHID, S.; AL-BOZOM, I. Pdl1 immunostaining: what pathologists need to know. **Diagn Pathol**, v. 16, n. 94, 2021.
- ARELLANO-BALLESTERO, H.; SABRY, M.; LOWDELL, M. W. A killer disarmed: Natural killer cell impairment in myelodysplastic syndrome. **Cells**, MDPI, v. 12, n. 4, p. 633, 2023.
- BALLY, A. P. R. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of pd-1 expression. **J Immunol**, v. 196, n. 6, p. 2431–2437, 2016. Disponível em: <^1^>.
- BARREYRO, L. *et al.* Overexpression of il-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in aml and mds. **Blood**, v. 120, p. 1290–1298, 2012.
- BAZINET, A.; BRAVO, G. New approaches to myelodysplastic syndrome treatment. **Curr Treat Options Oncol**, v. 23, n. 5, p. 668–687, May 2022. Epub 2022 Mar 23.
- BELLI, C. *et al.* Myelodysplastic syndromes in south america: a multinational study of 1080 patients. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, 2015.
- BELON, A.; LIMA, G.; BARROS, M. Gender differences in healthy life expectancy among brazilian elderly. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 12, n. 1, p. 88, 2014.
- BENNETT, J. Changes in the updated 2016: WHO classification of the myelodysplastic syndromes and related myeloid neoplasms. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 16, n. 11, p. 607–609, Nov 2016.
- BODDU, P.; AL. *et.* The emerging role of immune checkpoint based approaches in aml and mds. **Leukemia lymphoma**, v. 59, n. 4, p. 790–802, 2018.
- BODDU, P. *et al.* The emerging role of immune checkpoint based approaches in aml and mds. **Leukemia & Lymphoma**, v. 59, n. 4, p. 790–802, 2017.
- BORTOLHEIRO, T. C. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação franco-americana-britânica (fab) à classificação da organização mundial da saúde (oms). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, p. 194–197, 2006.
- BUCHBINDER, E. I. *et al.* Ctl4 and pd-1 pathways. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 1, p. 98–106, 2016.
- BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L. *et al.* **The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments**. [S.l.]: Oxford University Press, 2009.
- CAZZOLA, M.; PORTA, M. G. D.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4021–4034, 2013.
- CHAE, Y.; AL. *et.* Current landscape and future of dual anti-ctla4 and pd-1/pd-11 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (nsclc). **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, may 2018.

- CHEN, C.; AL. *et al.* Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. **Journal of Hematology Oncology**, v. 13, n. 1, apr 2020.
- CHENG, P. *et al.* S100a9-induced overexpression of pd-1/pd-11 contributes to ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 33, n. 8, p. 2034–2046, aug 2019.
- CHOKR, N.; PATEL, R.; WATTAMWAR, K.; CHOKR, S. The rising era of immune checkpoint inhibitors in myelodysplastic syndromes. **Adv Hematol**, v. 2018, p. 2458679, 2018. PMID: 30519261; PMCID: PMC6241340.
- CORPORATION, L. T. **Taq Man Universal Master Mix II Protocol**. [S.l.], 2010. Part Number 4428173 Rev. B 07/2010.
- DARVIN, P. *et al.* Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 1–11, 2018.
- DAVER, N. *et al.* Hypomethylating agents in combination with immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 32, n. 5, p. 1094–1105, 2018.
- DONG, Y.; SUN, Q.; ZHANG, X. Pd-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2171–2186, 2017.
- DUARTE, F. B. **Estudo molecular do gene tp53 e da expressão da proteína p53 nas características prognósticas de pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco**. Tese (Tese (Doutorado em Cirurgia)) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ERAUSO, L. Chocarro de *et al.* Resistance to pd-11/pd-1 blockade immunotherapy. a tumor-intrinsic or tumor-extrinsic phenomenon? **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 441, 2020.
- GANGAT, N. *et al.* Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **Am. J. Hematol**, v. 91, p. 76–89, 2016.
- GARCIA-MANERO, G. *et al.* A phase ii study evaluating the combination of nivolumab (nivo) or ipilimumab (ipi) with azacitidine in pts with previously treated or untreated myelodysplastic syndromes (mds). **Blood**, p. 344, 2016.
- GARCIA-MANERO, G. *et al.* Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. **Am J Hematol**, v. 95, n. 11, p. 1399–1420, 2020.
- GAÑÁN-GÓMEZ, I. *et al.* Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 29, n. 7, p. 1458–1469, 2015.
- GENG, S. *et al.* Dynamics of pd-1 expression are associated with treatment efficacy and prognosis in patients with intermediate/high-risk myelodysplastic syndromes under hypomethylating treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 13, aug 2022.
- GRAVELLE, P. *et al.* Mechanisms of pd-1/pd-11 expression and prognostic relevance in non-hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. **Oncotarget**, v. 4, n. 8(27), p. 44960–44975, 2017.
- GREENBERG, P. Myelodysplastic syndromes, thy name is heterogeneity. **British Journal of Haematology**, v. 201, n. 3, p. 381–382, 2023.

GUPTA, G. *et al.* Myelodysplastic syndromes/neoplasms: recent classification system based on world health organization classification of tumors–international agency for research on cancer for hematopoietic and lymphoid tissues. **Journal of blood medicine**, p. 171–182, 2010.

HAN, Y.; LIU, D.; LI, L. Pd-1/pd-11 pathway: current researches in cancer. **American journal of cancer research**, e-Century Publishing Corporation, v. 10, n. 3, p. 727, 2020.

HASLP, H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. **Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book**, v. 2016, n. 1, p. 598–604, 2016.

HASSERJIAN, R. P. *et al.* Navigating myelodysplastic and myelodysplastic/myeloproliferative overlap syndromes. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, v. 41, p. 328–350, 2021.

HEIBL, S.; STAUDER, R.; PFEILSTÖCKER, M. Is myelodysplasia a consequence of normal aging? **Current Oncology Reports**, v. 23, n. 12, nov 2021.

HONG, M.; HE, G. The 2016 revision to the world health organization classification of myelodysplastic syndromes. **Journal of translational internal medicine**, v. 5, n. 3, p. 139–143, 2017.

HUDSON, K.; CROSS, N.; JORDAN-MAHY, N.; LEYLAND, R. The extrinsic and intrinsic roles of pd-11 and its receptor pd-1: implications for immunotherapy treatment. **Frontiers in immunology**, Frontiers, p. 2362, 2020.

IBGE DO, P. **Panorama do Censo 2022**. 2022. <<https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>>.

JELINEK, T. *et al.* Pd-1/pd-11 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. **Immunology**, v. 152, n. 3, p. 357–371, 2017.

KENNEDY, J. A. *et al.* Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 9, p. 968–974, 2017.

KEWAN, T. *et al.* Validation of the molecular international prognostic scoring system (ipss-m) in patients (pts) with myelodysplastic syndromes/neoplasms (mds) who underwent allogeneic stem cell transplantation (hsct). **Blood**, v. 142, n. Supplement 1, p. 4980–4980, 11 2023.

LEE, S. Pd-11 expression in megakaryocytes and its clinicopathological features in primary myelofibrosis patients. **J Pathol Clin Res**, v. 8, n. 1, p. 78–87, 2022.

LINDER, K.; LULLA, P. Myelodysplastic syndrome and immunotherapy novel to next in-line treatments. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 8, p. 2602–2616, 2021.

LIU, H.; AL. *et.* Epigenetic treatment-mediated modulation of pd-11 predicts potential therapy resistance over response markers in myeloid malignancies: A molecular mechanism involving effectors of pd-11 reverse signaling. **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 2543–2550, 2019.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. **methods**, Elsevier, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MAGALHAES, S. *et al.* Epidemiological and clinicopathological data from the brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. In: **53rd ASH Annual Meeting and Exposition**. [S.l.: s.n.], 2010. Saturday, December 4.

MAGGIONI, G. *et al.* A sex-informed approach to improve the personalised decision making process in myelodysplastic syndromes: a multicentre, observational cohort study. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 2, p. e117–e128, feb 2023.

MARIN-ACEVEDO, J. A. *et al.* Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. **Journal of hematology & oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2018.

MONTALBAN-BRAVO, G. *et al.* Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Annual clinical updates in hematological malignancies**, v. 93, n. 1, p. 129–147, 2018.

MOURA, A. *et al.* Prolonged response to recombinant human erythropoietin treatment in patients with myelodysplastic syndrome at a single referral centre in brazil. **Clinics**, v. 74, 2019.

O'MALLEY, D.; AL. *et.* Immunohistochemical detection of pd-11 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases. **Modern Pathology**, v. 32, n. 7, p. 929–942, jul 2019.

PAPPA, V. *et al.* A retrospective study of azacitidine treatment in patients with intermediate-2 or high risk myelodysplastic syndromes in a real-world clinical setting in greece. **International journal of hematology**, v. 105, p. 184–195, 2017.

PENG, X.; ZHU, X.; DI, T.; TANG, F.; GUO, X.; LIU, Y.; BAI, J.; LI, Y.; LI, L.; ZHANG, L. The yin-yang of immunity: Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome with different risk stratification. **Front Immunol**, v. 23, n. 13, p. 994053, 2022.

PERANZONI, E.; AL. *et.* Myeloid cells as clinical biomarkers for immune checkpoint blockade. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt–pcr. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 29, n. 9, p. e45–e45, 2001.

PINTO, G. Avaliação da expressão do biomarcador pd-11 em tecido tumoral de pacientes portadores de carcinoma de pulmão e correlação com dados clínicos e demográficos [dissertação]. **Barretos: Fundação Pio XII do Hospital de Câncer de Barretos**, 2015.

PLATZBECKER, U. *et al.* Current challenges and unmet medical needs in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 35, n. 8, p. 2182–2198, 2021.

PRESTIPINO, A.; AL. *et.* Oncogenic jak2v617f causes pd-11 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. **Sci Transl Med**, v. 10, n. 429, p. 7729, 2018.

ROEMER, M. G. *et al.* Pd-11 and pd-12 genetic alterations define classical hodgkin lymphoma and predict outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2690, 2016.

SALLMAN, D. A.; PADRON, E. Myelodysplasia in younger adults: outlier or unique molecular entity? **haematologica**, Ferrata Storti Foundation, v. 102, n. 6, p. 967, 2017.

SALMANINEJAD, A.; KHORAMSHAHI, V.; AZANI, A.; SOLTANINEJAD, E.; ASLANI, S.; ZAMANI, M.; ZAL, M.; NESAEI, A.; HOSSEINI, S. Pd-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 70, n. 2, p. 73–86, 2018.

SAMPAIO, L. *et al.* High pd-11 expression is associated with unfavorable clinical features in myelodysplastic neoplasm. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, p. 1–7, 2023.

SANTOS, T. E. D. S. **Estudo da expressão dos genes TP53, VEGFA e HIF1 em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado e Citopenias não Neoplásicas: associação com citocinas e fatores de prognóstico.** Tese (Doutorado) — Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SCHWARTZ, J. R. *et al.* The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1557, 2017.

SHAHJAHANI, M.; HADAD, E.; AZIZIDOOST, S.; NEZHAD, K.; SHAHRABI, S. Complex karyotype in myelodysplastic syndromes: Diagnostic procedure and prognostic susceptibility. **Oncol Rev**, v. 13, n. 1, p. 389, 2019. PMID: 30858933; PMCID: PMC6379782.

SHALLIS, R. M.; AHMAD, R.; ZEIDAN, A. M. The genetic and molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **European Journal of Haematology**, v. 101, n. 3, p. 260–271, 2018.

SPERLING, A.; GIBSON, C.; EBERT, B. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 17, n. 1, p. 5–19, 2017. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27834397; PMCID: PMC5470392.

STRAUB, M. *et al.* Cd274/pd-11 gene amplification and pd-11 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oncotarget**, v. 7, n. 11, p. 12024–12034, 2016.

SUGIMORI, C. *et al.* Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome. **Hematol Rep**, v. 2, n. 1, 2010.

SZÉLES, ; AL. *et.* Pre-treatment soluble pd-11 as a predictor of overall survival for immune checkpoint inhibitor therapy: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 72, n. 5, p. 1061–1073, nov 2022.

TINSLPY-VANCE, S. *et al.* Sex disparities in myelodysplastic syndromes: Genotype, phenotype, and outcomes. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, jan 2023.

TOPALIAN, S. L. *et al.* Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 5, p. 275–287, 2016.

VALENT, P. Icus, idus, chip and ccus: diagnostic criteria, separation from mds and clinical implications. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 30–38, 2019.

VISCONTE, V.; TIU, R. V.; ROGERS, H. J. Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease. **Blood research**, v. 49, n. 4, p. 216–227, 2014.

VOENA, C. *et al.* Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. **Discov Med**, n. 117, 2016.

VOLPE, V. d. O.; GARCIA-MANERO, G.; KOMROKJI, R. S. Myelodysplastic syndromes: A new decade. **Clin Lymphoma Myeloma Leuk**, v. 22, n. 1, p. 1–16, jan. 2022. Epub 2021 Aug 2.

WAKI, K. *et al.* Pd-1 expression on peripheral blood t-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer. **Cancer Sci**, v. 105, n. 10, p. 1229–1135, 2014.

- WANG, C. *et al.* Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome: Clinical features, pathogenesis and therapeutic strategies. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 122, p. 123–132, 2018.
- WARLICK, E. D.; MILLER, J. S. Myelodysplastic syndromes: the role of the immune system in pathogenesis. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. 11, p. 2045–2049, 2011.
- WONG, K.; HASSAN, R.; YAACOB, N. Hypomethylating agents and immunotherapy: Therapeutic synergism in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Frontiers in Oncology**, v. 11, feb 2021.
- WRANGLE, J.; WANG, W.; KOCH, A.; EASWARAN, H.; MOHAMMAD, H. P.; VENDETTI, F.; VANCRIEKINGE, W.; DEMEYER, T.; DU, Z.; PARSANA, P. *et al.* Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with azacytidine. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 4, n. 11, p. 2067, 2013.
- YANG, H. *et al.* Expression of pd-11, pd-12, pd-1 and ctla4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. **Leukemia**, v. 28, n. 6, p. 1280–1288, 2014.
- YANG, X. *et al.* Targeting pd-1/pd-11 pathway in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 11, 2022.
- YAROSH, R. *et al.* Risk factors for de novo and therapy-related myelodysplastic syndromes (mds). **Cancer Causes Control**, v. 32, p. 241–250, 2021.
- ZAHID, M. F. *et al.* Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes: an overview. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 11, n. 3, p. 231, 2017.
- ZHANG, Y. *et al.* Impact of the international consensus classification of myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, 2022.
- ZHANG, Y. *et al.* Comparison of the revised 4th (2016) and 5th (2023) editions of the world health organization classification of myelodysplastic neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 12, p. 2875–2882, 2023.
- ZHOU, X. *et al.* Mechanisms of tumor resistance to immune checkpoint blockade and combination strategies to overcome resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.
- ØRSKOV, A. D. *et al.* Hypomethylation and up-regulation of pd-1 in t cells by azacytidine in mds/aml patients: A rationale for combined targeting of pd-1 and dna methylation. **Oncotarget**, v. 20, n. 6, p. 9612–9626, 2015.

## ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.**

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

O Sr(a) está sendo convidado como participante da pesquisa intitulada: **ESTUDO DA EXPRESSÃO DO PD-1, PD-L1 E CTLA-4 E O POLIMORFISMO DE SEUS GENES EM PACIENTES COM SINDROME MIELODISPLÁSIA 7** sob a responsabilidade da pesquisadora **Yhasmine Delles Oliveira Garcia** a qual pretende acompanhar os pacientes com Síndrome Mielodisplásica em tratamento no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)

**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.**

A síndrome mielodisplásica (SMD), é um grupo de distúrbios do sangue caracterizado pela incapacidade das células tronco da medula óssea de se desenvolverem em células sanguíneas maduras e funcionais. A SMD é comum em idosos e se apresenta clinicamente com anemia e queda no número de glóbulos brancos e plaquetas com um risco aumentado de transformação em leucemia.

O estudo aqui proposto visa analisar variações polimórficas de genes possivelmente associados à SMD, na tentativa de identificar marcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce e prognóstico na população cearense.

Para os exames genéticos será necessária uma amostra de 4mL de sangue periférico, obtida com uma seringa e agulha descartáveis. A coleta será realizada por

um profissional capacitado, contudo o risco da coleta ser difícil é previsto, seja pela veia ser de difícil acesso ou por ser de pequeno calibre. Além da coleta de sangue, será solicitado, o material da biopsia de medula óssea realizado anteriormente no momento da investigação diagnóstica, para análise da expressão dos genes. Também serão colhidas algumas informações clínicas em uma ficha cadastral. Qualquer voluntário estará suscetível aos seguintes riscos: dificuldade na coleta de sangue e constrangimento ao responder algumas perguntas da ficha cadastral. Esses inconvenientes serão minimizados pela desistência em participar do estudo e garantia de atendimento médico e psicológico, caso haja algum dano a sua integridade física e mental.

Os resultados desse estudo serão úteis para avaliarmos quais condições relacionadas SMD são encontradas na população do Ceará. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir se a presença de alguma variação em determinado gene possa ter alguma influência no desenvolvimento desta doença.

Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, com os responsáveis pela pesquisa.

O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

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

<p><b>Nome:</b> YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA <b>Instituição:</b> Universidade Federal Do Ceará <b>Endereço:</b> Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brasil. <b>Telefones para contato:</b> (86) 995966300</p>
--

<p><b>ATENÇÃO:</b> 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.</p>
---

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 voluntário não souber ler)

Nome do profissional

Data

Assinatura que aplicou o TCLE

\_\_\_\_\_