



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E**  
**INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DE MEDICAMENTOS - DITM**

**LAIS FARIAS MASULLO**

**AVALIAÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELÓIDE CRÔNICA EM TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA  
QUINASE: ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ANGIOGÊNESE E  
COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO.**

**FORTALEZA**  
**2022**

LAIS FARIAS MASULLO

AVALIAÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELÓIDE CRÔNICA EM TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA  
QUINASE: ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ANGIOGÊNESE E COM  
A RESPOSTA AO TRATAMENTO.

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos (DITM) da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Farmácia.

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

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins.

FORTALEZA  
2022

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)

---

- M358 Masullo, Laís Farias.  
Avaliação do hipotireoidismo em pacientes com leucemia mielóide crônica em tratamento com inibidores de tirosina quinase: associação com biomarcadores de angiogênese e com a resposta ao tratamento. / Laís Farias Masullo. – 2022.  
105 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes..  
Coorientação: Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins.
1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Tireoide. 3. Inibidores De Tirosina Quinase. 4. Hormônio Tireoidiano. 5. Hipotireoidismo. I. Título.
-

LAIS FARIAS MASULLO

AVALIAÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO EM PACIENTES COM LEUCEMIA  
MIELÓIDE CRÔNICA EM TRATAMENTO COM INIBIDORES DE TIROSINA  
QUINASE: ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ANGIOGÊNESE E COM  
A RESPOSTA AO TRATAMENTO.

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos (DITM) da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Farmácia.

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

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Geraldo Bezerra da Silva Júnior  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico esse trabalho a Deus, que com sua infinita bondade me deu forças durante todo o caminho. A minha família, em especial ao meu esposo, meus pais, meus avós, minha irmã e meus sobrinhos, que sempre acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos dessa jornada, principalmente nos momentos de maior angústia, A Nossa Senhora, por ter segurado a minha mão, me dando forças para chegar até aqui ao lado do seu filho, pois sem Ele nada era possível.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

A minha orientadora Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, pela orientação, pelo tempo dedicado ao meu trabalho e por ter sido um papel-chave nesse processo de construção da minha vida profissional e pessoal por meio de ensinamentos diários.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins, pela coorientação, pelo tempo dedicado ao meu trabalho, por sua contribuição em todo o meu processo de formação profissional e pessoal, me inspirando a ser um ser humano melhor.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Deysi Wong, Dr. Geraldo Bezerra, Dra Rosângela Pinheiro e Dr<sup>a</sup>. Arlândia Morais pela compreensão, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores do programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos - DITM, incluindo os professores da UFC, UFPB, UFRN e UFRPE que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do DITM-UFC, em especial à Jéssica, por sua dedicação e humanismo, fazendo de tudo para nos ajudar.

Aos médicos do ambulatório de hematologia do HUWC, em especial à Dra. Acy, pela colaboração com a pesquisa.

Aos colegas do grupo de pesquisa da hematologia, em especial ao Tarcísio Paulo, Pedro Áureo e Anna Thawanny, pela ajuda na realização dos experimentos, pelas reflexões sobre os resultados, pelo apoio e pela disposição.

Aos amigos do grupo de pesquisa da Endocrinologia, pelas críticas e sugestões e pela ajuda constante durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da turma de doutorado, em especial a minha amiga Malu, pela sua amizade, pelas viagens para disciplinas do doutorado, reflexões, críticas, sugestões e orações recebidas.

Aos meus familiares, em especial ao meu esposo Renato Thales, por todo o apoio, pela confiança no meu potencial e, acima de tudo, pelo incentivo diário durante toda essa jornada.

Aos meus pais, Francisco Masullo e Eliania Farias por acreditarem em mim a todo momento, me incentivando em cada etapa vivida nestes 5 anos de doutorado.

A minha irmã Larissa Masullo, ao meu cunhado Daniel e aos meus sobrinhos Gabriella e Arthur que me transmitiram força, paz e conforto, principalmente quando eu mais precisava.

E a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para essa etapa de minha vida, foram muitos, pois “quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

“A verdadeira viagem de descobrimento  
não consiste em procurar novas  
paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

## Resumo

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal das células tronco hematopoiéticas. A doença decorre, na maioria dos casos, da translocação entre os cromossomos 9:22, formando o gene BCR-ABL que codifica uma oncoproteína BCR-ABL com atividade tirosino-quinase constitutiva. O tratamento de primeira linha da LMC é com os Inibidores de Tirosino-quinase (ITK), o qual tem se mostrado seguro, eficaz e com aumento da sobrevida livre de eventos. O hipotireoidismo tem sido reportado como uma complicação com potencial impacto clínico, uma vez que está associado ao aumento da mortalidade. Assim, é importante o rastreamento do hipotireoidismo em pacientes com LMC em uso crônico de ITK, bem como a investigação dos fatores associados a esse efeito. O presente estudo objetivou avaliar a presença de hipotireoidismo em pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosino quinase e associar com marcadores de angiogênese e com a sobrevida livre de eventos. Trata-se de um estudo de coorte prospectivo incluindo 60 pacientes com diagnóstico de LMC cadastrados no ambulatório de hematologia HUWC. O grupo controle foi composto de 20 indivíduos saudáveis. A análise do metabolismo do hormônio tireoidiano ocorreu por meio da dosagem de TSH, T4L, T3T e a angiogênese pela dosagem sérica de VEGF e expressão dos genes: *HIF-1a* e *VEGF*. As análises de expressão gênica foram realizadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados clínicos e laboratoriais, bem como as informações sobre a utilização do ITK, foram obtidos dos prontuários médicos. A análise estatística foi realizada através do Programa GraphPad Prism 6.0 e os testes realizados foram determinados de acordo com a normalidade dos dados. Considerou-se o valor  $p < 0,05$  para resultados estatisticamente significantes. Observou-se presença de hipotireoidismo subclínico em 20% (12/60) dos pacientes diagnosticados com LMC. Os pacientes apresentaram média de idade de  $49 \pm 21,33$  anos e a maioria (67%;  $n=8$ ) pertence ao sexo masculino. Observou-se correlação moderada entre TSH e tempo de tratamento em pacientes com hipotireoidismo ( $R=0,620$ ;  $p=0,036$ ). Ao avaliar a curva de sobrevida livre de eventos, observou-se que o hipotireoidismo ocorreu em maior frequência em pacientes que faziam uso de ITK há mais de 12 meses ( $p=0,0014$ ). Observamos maiores níveis de VEGF sérico ( $p=0,016$ ) e expressão de *HIF-1a* ( $p=0,0068$ ) nos pacientes com LMC quando comparamos os pacientes do grupo controle. No entanto, não se observou diferença na expressão de VEGF-A entre os grupos ( $p=0,20$ ). Ao compararmos os marcadores de angiogênese entre o grupo com LMC e hipotireoidismo e o grupo com LMC eutireoideu, não se observou diferença entre eles: VEGF sérico ( $p=0,23$ ); HIF-alfa ( $p=0,14$ ) e VEGF-A ( $p=0,52$ ). Ademais, não se observou associação entre as variáveis clínicas da LMC e a presença de hipotireoidismo quando se analisou a sobrevida livre de eventos. Conclusão: O hipotireoidismo subclínico foi presente em pacientes com LMC em uso de ITK, porém, o mesmo não pode ser atribuído ao tratamento. Além disso, os marcadores de angiogênese não apresentaram associação com o hipotireoidismo. Destaca-se, ainda, que o achado de hipotireoidismo não foi associado a um pior prognóstico.

**Palavras-chave:** Leucemia Mieloide Crônica; Tireoide; Inibidores De Tirosina Quinase; Hormônio Tireoidiano; Hipotireoidismo.

## Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative neoplasm of hematopoietic stem cells. The disease results, in most cases, from the translocation between chromosomes 9:22, forming the *BCR-ABL* gene that encodes a BCR-ABL oncoprotein with constitutive tyrosine kinase activity. The first-line treatment of CML is with Tyrosine kinase Inhibitors (TKI), which has been shown to be safe, effective and with increased event-free survival. Hypothyroidism has been reported as a complication with potential clinical impact, as it is associated with increased mortality. Thus, it is important to screen for hypothyroidism in patients with CML on chronic TKI use, as well as to investigate the factors associated with this effect. The present study aimed to evaluate the presence of hypothyroidism in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors and to associate it with angiogenesis markers and event-free survival. This is a prospective cohort study including 60 patients diagnosed with CML registered at the HUWC hematology outpatient clinic. The control group included 20 healthy subjects. The analysis of thyroid hormone metabolism was performed by measuring TSH, T4L, T3T and angiogenesis by measuring serum VEGF and expression of the genes: *HIF-1a* and *VEGF*. Gene expression analysis were performed by real-time polymerase chain reaction. Clinical and laboratory data, as well as information on the use of the TKI, were obtained from medical records. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 program and the tests performed were determined according to the normality of the data. A p-value <0.05 was considered for statistically significant results. Subclinical hypothyroidism was observed in 20% (12/60) of patients diagnosed with CML. Patients had a mean age of  $49 \pm 21.33$  years and the majority (67%; n=8) were male. A moderate correlation was observed between TSH and treatment time in patients with hypothyroidism ( $R=0.620$ ;  $p=0.036$ ). When evaluating the event-free survival curve, it was observed that hypothyroidism occurred more frequently in patients using TKI for more than 12 months ( $p=0.0014$ ). We observed higher levels of serum VEGF ( $p=0.016$ ) and HIF-1a expression ( $p=0.0068$ ) in patients with CML when we compared patients in the control group. However, there was no difference in VEGF-A expression between the groups ( $p=0.20$ ). When comparing the angiogenesis markers between the group with CML and hypothyroidism and the group with euthyroid CML, there was no difference between them: serum VEGF ( $p=0.23$ ); HIF-alpha ( $p=0.14$ ) and VEGF-A ( $p=0.52$ ). Furthermore, no association was observed between the clinical variables of CML and the presence of hypothyroidism when the event-free survival was analyzed. Conclusion: Subclinical hypothyroidism was present in patients with CML using TKI, however, the same cannot be attributed to the treatment. In addition, angiogenesis markers were not associated with hypothyroidism. It is also noteworthy that the finding of hypothyroidism was not associated with a worse prognosis.

**Keywords:** Chronic Myeloid Leukemia; Thyroid; Tyrosine Kinase Inhibitors; Thyroid Hormone; hypothyroidism.

## Lista de Figuras

Figura 1	Eventos moleculares na patogênese da LMC.....	25
Figura 2	Diferentes fases clínicas da LMC.....	27
Figura 3	Mecanismos de resistência ao imatinibe.....	30
Figura 4	Mecanismo de regulação da produção de hormônios tireoidianos.....	32
Figura 5	Mecanismos sugestivos de hipotireoidismo induzido por ITK .....	37
Figura 6	Delineamento do estudo .....	47

## Lista de Gráficos

Gráfico 1	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo dos pacientes submetidos a ITK.....	61
Gráfico 2	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo de acordo com a resposta molecular .....	63
Gráfico 3	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo de acordo com o escore de risco Sokal.....	65
Gráfico 4	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em uso de ITK de acordo com o escore de risco Hasford.....	66
Gráfico 5	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco Eutos.....	67
Gráfico 6	Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco ELTS.....	68
Gráfico 7	Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase e grupo controle.....	69
Gráfico 8	Avaliação dos níveis séricos de VEGF entre os grupos LMC com hipotireoidismo, LMC eutireoideu e grupo controle.....	70
Gráfico 9	Níveis séricos de VEGF na LMC dividido de acordo com o perfil tireoidiano.....	70
Gráfico 10	Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC de acordo com o inibidor de tirosino quinase utilizado.....	71
Gráfico 11	Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC de acordo com a geração do inibidor de tirosino quinase utilizado.....	71
Gráfico 12	Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular aos uso dos ITKs e controle.....	72

Gráfico 13	Expressão de <i>VEGF-A</i> em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase e grupo controle.....	73
Gráfico 14	Expressão de <i>VEGF-A</i> em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.....	73
Gráfico 15	Expressão de <i>VEGF-A</i> em pacientes com LMC de acordo com a geração do inibidor de tirosino quinase utilizado.....	74
Gráfico 16	Expressão de <i>VEGF-A</i> em pacientes com LMC de acordo com o tipo de inibidor de tirosino quinase utilizado.....	74
Gráfico 17	Expressão do gene <i>VEGF-A</i> em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular.....	75
Gráfico 18	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase e grupo controle.....	76
Gráfico 19	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.....	76
Gráfico 20	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC de acordo com o inibidor de tirosino quinase utilizado.....	77
Gráfico 21	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC de acordo com o inibidor de tirosino quinase utilizado.....	77
Gráfico 22	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC de acordo com o tipo de inibidor de tirosino quinase utilizado.....	78
Gráfico 23	Expressão de <i>HIF-1<math>\alpha</math></i> em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular.....	79

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Características sociodemográficas e laboratoriais ao diagnóstico.....	51
Tabela 2	Características bioquímicas e hormonais dos pacientes com LMC no diagnóstico.....	54
Tabela 3	Hormônios tireoidianos no Hipotireoidismo e em Eutireoidismo em pacientes com LMC em uso de ITK.....	55
Tabela 4	Características clínicas e laboratoriais da LMC ao diagnóstico de acordo com o perfil tireoidiano.....	56
Tabela 5	Escore de risco para LMC calculados no diagnóstico em pacientes com LMC com e sem hipotireoidismo.....	57
Tabela 6	Hormônios tireoidianos de acordo com o tempo de tratamento.....	58
Tabela 7	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes submetidos a ITK.....	59
Tabela 8	Comparação entre o perfil de resposta molecular em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.....	60
Tabela 9	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com a resposta molecular.....	61
Tabela 10	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco Sokal.....	63
Tabela 11	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o risco Hasford.....	64

Tabela 12	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o risco Eutos.....	66
Tabela 13	Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco ELTS.....	67
Tabela 14	Avaliação dos marcadores de angiogênese em pacientes com LMC e grupo controle.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Associação Americana de Tireoide
ABL1	Gene de leucemia Abelson 1
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase ou transaminase oxalacética
ATP	Adenosina trifosfato
BCR	Região de ponto de quebra
b3a2	Transcritos de fusão b3a2
b2a2	Transcritos de fusão b2a2
cDNA	DNA complementar
CT	Colesterol total
CB	Crise blástica
Dasa	Dasatinibe
dNTPs	Dinucleotídeos
DIO1	Desiodase tipo 1
DIO2	Desiodase tipo 2
DIO3	Desiodase tipo 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática

FA	Fase acelerada
FAL	Fosfatase alcalina
FC	Fase crônica
GGT	Gama glutamil transferase
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HC	Hipotireoidismo clínico
HIF	Factor de indução de hipóxia
HIF- $\alpha$	Factor de indução de hipóxia tipo alfa
HIF- $\beta$	Factor de indução de hipóxia tipo beta
HIF-1	Factor de indução de hipóxia tipo 1
HIF-2	Factor de indução de hipóxia tipo 2
HRE	Elementos de resposta à hipóxia
HS	Hipotireoidismo Subclínico
HSCs	Células tronco hematopoiéticas
HT	Hormônio Tireoidiano
HU	Hidroxiureia
HUWC	Hospital universitário Walter Cantídio

IC	Intervalo de confiança
IIQ	Intervalo interquartil
IFN- $\alpha$	Interferon tipo alfa
ITK	Inibidor de tirosino quinase
K	Potássio
LACT	Laboratório de análises clínicas e toxicológicas
LHGDH	Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Doenças Hematológicas
LLA	Leucemia linfóide aguda
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDH	Lactato desidrogenase
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
L-T4	Levotiroxina
MI	Mesilato de Imatinibe
Na	Sódio
Nilo	Nilotinibe
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação de cadeia polimerase
PDGFR $\alpha$	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta

PHDs	Prolil-hidroxilases
Ph	Philadelphia
PIGF	Fator de crescimento placentário
Ph+	Philadelphia positivo
p210	Proteína 210 kDa
p190	Proteína 190 kDa
qPCR	PCR quantitativa
RMC	Resposta molecular completa
RMM	Resposta molecular maior
RNA	Ácido ribonucléico
SRM	Sem resposta molecular
SCR	Tirosino quinase Scr
SG	Sobrevida global
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TR $\alpha$	Receptor de hormônio tireoidiano tipo alfa
TR $\beta$	Receptor de hormônio tireoidiano tipo beta
T3T	Triiodotironina Total

T3r	Triiodotironina reverso
T3SO4	Sulfato de triiodotironina
T4	Tiroxina
T4L	Tiroxina livre
t(9:22)	Translocação entre os cromossomos 9 e 22
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH	Tireotrofina
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular tipo A
VEGF-B	Fator de crescimento endotelial vascular tipo B
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular tipo C
VEGF-D	Fator de crescimento endotelial vascular tipo D
VEGF-E	Fator de crescimento endotelial vascular tipo E
VEGF-F	Fator de crescimento endotelial vascular tipo F
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR1	Receptor tipo 1 do fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento endotelial vascular

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

p Significância

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>51.1</b>	<b>Leucemia Mieloide Crônica .....</b>	<b>25</b>
<i>1.1.1</i>	<i>Patogênese da LMC .....</i>	<i>25</i>
<i>1.1.2</i>	<i>Mecanismos fisiopatológicos.....</i>	<i>26</i>
<i>1.1.3</i>	<i>Manifestações Clínicas e Laboratoriais da LMC.....</i>	<i>27</i>
<i>1.1.4</i>	<i>Tratamento da LMC.....</i>	<i>28</i>
<b>1.2</b>	<b>Disfunção Tireoidiana.....</b>	<b>33</b>
<b>1.3</b>	<b>Hipotireoidismo e Inibidores de Tirosino Quinase.....</b>	<b>35</b>
<b>1.4</b>	<b>Angiogênese.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Considerações éticas.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Desenho do estudo .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>População de estudo .....</b>	<b>46</b>
<i>3.3.1</i>	<i>Crêterios de inclusã.....</i>	<i>46</i>
<i>3.3.2</i>	<i>Crêterios de exclusã.....</i>	<i>46</i>
<b>3.4</b>	<b>Local do estudo .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Delineamento do estudo .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Variáveis dos pacientes com LMC.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Coleta das amostras biológicas.....</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Armazenamento e uso das amostras.....</b>	<b>49</b>
<b>3.9</b>	<b>Testes realizados.....</b>	<b>49</b>
<i>3.9.1</i>	<i>VEGF-A sérico.....</i>	<i>49</i>

3.9.2	<i>Análise de expressão gênica.....</i>	49
3.9.2.1	<i>Extração de RNA.....</i>	49
3.9.2.2	<i>Síntese de cDNA.....</i>	50
3.9.2.3	<i>qPCR (PCR quantitativa em tempo real) .....</i>	50
3.9.2.4	<i>Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos pacientes.....</i>	50
3.9.3	<i>Dosagens hormonais.....</i>	50
3.9.4	<i>Perfil hematológico .....</i>	50
3.10	<b>Descarte do material biológico .....</b>	50
3.11	<b>Análise estatística .....</b>	50
4	<b>RESULTADOS .....</b>	51
4.1	<b>Características Clínicas, Bioquímicas e Hematológicas dos pacientes com LMC.....</b>	51
4.2	<b>Avaliação da função tireoidiana.....</b>	54
4.3	<b>Angiogênese.....</b>	68
4.3.1	<i>Dosagem de VEGF sérico.....</i>	68
4.3.2	<i>Expressão gênica de VEGF-A.....</i>	72
4.3.3	<i>Expressão gênica de HIF-1<math>\alpha</math>.....</i>	74
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	79
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	86
	<b>APÊNDICE A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>	87
	<b>APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	88
	<b>ANEXO A – Artigo submetido à publicação .....</b>	89
	<b>ANEXO B – Artigo publicado.....</b>	90
7	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	92

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leucemia Mieloide Crônica

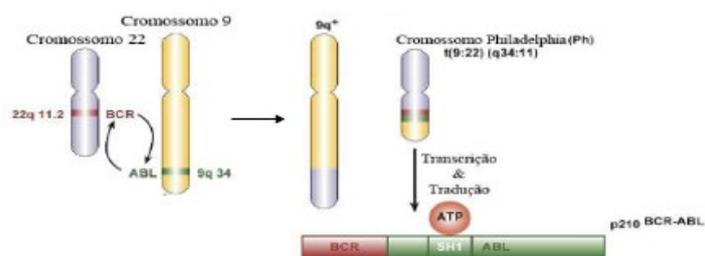
A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal das células tronco hematopoiéticas. Com incidência de 1-2 casos por 100.000 habitantes, a LMC representa 15% dos casos de leucemia recém diagnosticado em adultos, sem diferenças geográficas e étnicas. A doença se apresenta de forma assintomática em 50% dos casos, assim, muitas vezes o diagnóstico é ocasional por exames de rotina (JABBOUR; KANTARJIAN, 2018).

### 1.1.1 Patogênese da LMC

A LMC decorre da translocação entre os cromossomos 9 e 22, com a fusão do gene ABL1, no cromossomo 9 com a região do gene BCR no cromossomo 22, gerando o gene híbrido BCR-ABL, no cromossomo 22 q- (cromossomo Filadélfia) (DRUKER *et al.*, 2001).

Essa translocação t(9:22) resulta na expressão da oncoproteína BCR-ABL 1, a qual possui uma elevada atividade tirosina-quinase (Figura 1). Essa atividade está relacionada com a leucemogênese ao estimular mecanismos de crescimento e replicação celular, ao mesmo tempo que tem sinais apoptóticos aberrantes. Assim, ocorre estímulo medular ósseo pela proliferação constante de células mieloides malignas, responsáveis pela patogênese da LMC (DRUKER *et al.*, 2001; JABBOUR; KANTARJIAN, 2018; ROWLEY, 1973). No entanto, embora a patogênese molecular da doença seja bem entendida, o mecanismo que leva à translocação genética é desconhecido.

**Figura 01.** Eventos moleculares na patogênese da LMC



Fonte: FRAZER, IRVINE, MCMULLIN, 2007.

Os aspectos moleculares da LMC podem ocorrer de diferentes tipos, assim, a translocação genética que origina a doença pode ser diferente. Na maioria dos casos (90%), a LMC cursa de maneira típica, com a translocação simples t(9;22). No entanto, em 5% dos casos pode haver translocação variante, a qual pode ser simples, envolvendo o cromossomo 22 e outro cromossomo, ou complexa, envolvendo um ou mais cromossomos em adição ao 9 e 22. Pode ocorrer ainda, em 2-5% dos casos, a não detecção do cromossomo Philadelphia por exames citogenéticos, apesar de o rearranjo BCR-ABL encontrar-se presente, podendo ser detectado por FISH ou PCR (ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, ET AL, 2016; JABBOUR; KANTARJIAN, 2018).

O transcrito BCR-ABL formado pode se apresentar de diferentes tamanhos, resultando em diferentes isoformas de RNA mensageiro: b3a2 e b2a2, as quais são traduzidas em proteínas com atividade tirosino quinase aumentada. Essa diferença de tamanho existe porque o ponto de quebra cromossômico pode ocorrer em diferentes locais do gene BCR, assim, essa translocação pode resultar na tradução de uma proteína de maior peso molecular, a p210 (210 kDa), ou em uma proteína de menor peso molecular, a p190 (190 kDa). A LMC normalmente está associada à p210(ADNAN-AWAD *et al.*, 2021; YU *et al.*, 2017).

### ***1.1.2 Mecanismos fisiopatológicos***

Quanto aos mecanismos fisiopatológicos da LMC, acredita-se que a translocação entre os cromossomos 9 e 22 ocorre em uma única célula tronco hematopoiética, o que gera vantagem proliferativa, perda de adesão ao estroma e capacidade de diferenciação aberrante, com consequente expansão do compartimento mielóide. Assim, as características clínicas e laboratoriais da LMC serão decorrentes desses aspectos (SAMAD; MAHBOOB; MANSOOR, 2022).

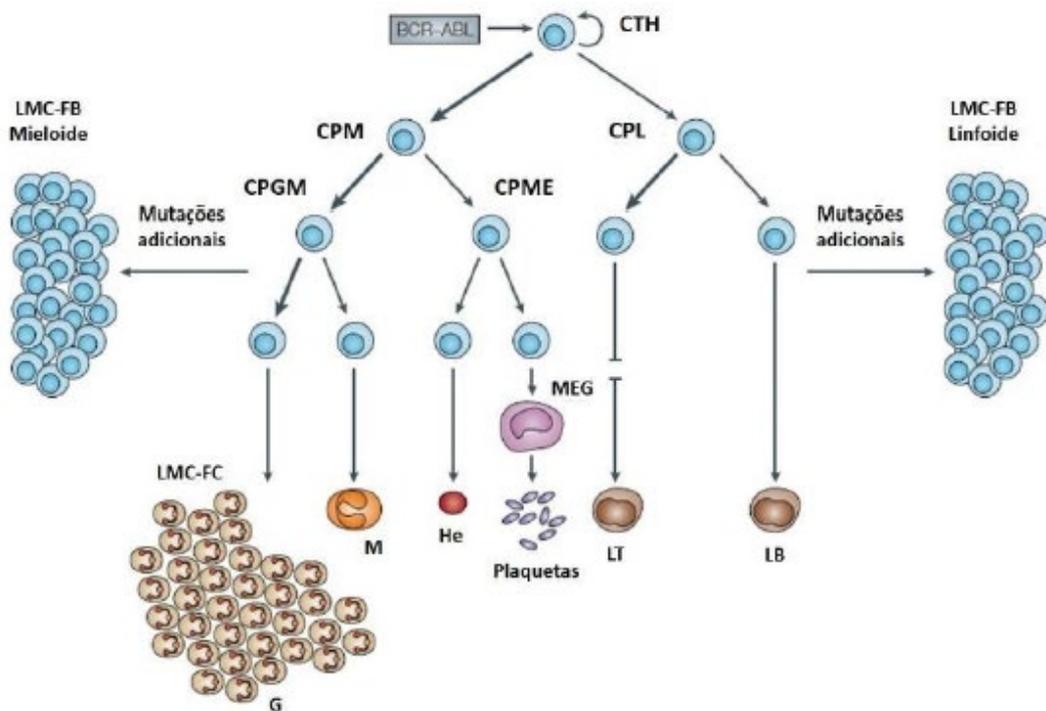
O quadro clínico da LMC é denominado trifásico. Assim, a doença cursa com um quadro de apresentação clínica e evolução heterogênea, podendo ser considerada em fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e crise blástica (CB) (SHIMODA *et al.*, 2020).

A maioria dos pacientes encontra-se na fase crônica da doença. Na FC ocorre proliferação clonal maciça das células granulocíticas, as quais possuem capacidade de diferenciação, sendo a doença facilmente controlada. Quando o clone leucêmico perde a capacidade de diferenciação, a doença passa a ser considerada em FA, a qual apresenta

um quadro de evolução clonal com difícil controle. Nessa fase ocorre um maior um percentual de blastos, basófilos e plaquetas. Caso a situação progrida para mais de 20% de blastos, a CB passa a ser instaurada (JABBOUR *et al.*, 2007).

Uma das principais evidências de que a LMC decorre de uma mutação na célula tronco pluripotente é a característica da fase acelerada da doença. Isso porque a CB da LMC pode ocorrer tanto às custas de blastos mielóides (50% dos casos), como de blastos linfóides (25% dos casos) e de fenótipos mistos ou indiferenciados (25% dos casos) (Figura 2) (APPERLEY, 2015).

**Figura 02.** Diferentes fases clínica da LMC



Diferentes apresentações das fases clínicas da LMC: LMC-FC: Fase crônica da LMC. LMC- FB: Fase blástica da LMC; LMC- FB linfóide : Fase blástica da LMC linfóide; LMC- FB mielóide: Fase blástica da LMC mielóide. CTH: Célula tronco hematopoética; CPM: Célula progenitora mielóide; CPGM: célula progenitora de granulócitos e monócitos; CPME: Célula progenitora de megacariócito e eritrócito; M: monócito; He: hemácia; MEG: megacariócito; G: granulócito; CPL: Célula progenitora linfóide; LT: Célula T; LB: célula B; Fonte: (TAKAHASHI ET AL. 1998) modificado.

### 1.1.3 Manifestações clínicas e laboratoriais da LMC

Apesar de cerca de 50% dos pacientes serem assintomáticos ao diagnóstico, a LMC possui sinais de apresentação clássicos: esplenomegalia volumosa, hepatomegalia

e leucocitose com desvio à esquerda. Com relação aos sintomas da doença, quando presentes, resultam principalmente de anemia e esplenomegalia. Isso inclui fadiga, perda de peso, mal-estar, empachamento ou dor. Também podem ocorrer sintomas raros, como sangramento, trombose, artrite, priapismo, hemorragias retinianas, ulceração e sangramento gastrointestinal superior. Os sintomas estão relacionados com a fase de apresentação da doença, ocorrendo de maneira mais expressiva nas fases acelerada e blástica (APPERLEY, 2015).

Quanto ao diagnóstico e acompanhamento laboratoriais, os principais testes utilizados são hemograma, mielograma, citogenética e PCR em tempo real. Normalmente o primeiro achado ocorre no hemograma, o qual é caracterizado por elevada leucocitose, podendo exceder  $100 \times 10^9/L$ , desvio à esquerda com predomínio de mielócitos e metamielócitos, além de basofilia, eosinofilia e trombocitose. A contagem diferencial dos leucócitos correta é importante, uma vez que é utilizada para a classificação prognóstica da LMC (APPERLEY, 2015).

O mielograma cursa com hiper celularidade com hiperplasia da série granulocítica. A citogenética é normalmente o teste utilizado para definir o diagnóstico da LMC. Isso porque permite a identificação do cromossomo Philadelphia (Ph). Caso seja realizada a citogenética convencional, esse exame também é útil na detecção de outras translocações ou anormalidades presentes. O PCR em tempo real também pode ser utilizado para o diagnóstico pela identificação do gene *BCR-ABL1*. Além disso, é importante na identificação e quantificação dos transcritos de RNA mensageiro (APPERLEY, 2015).

#### ***1.1.4 Tratamento da LMC***

Uma vez que a LMC foi a primeira leucemia a ser identificada, o histórico de como tratá-la passou por diversos esquemas terapêuticos. O tratamento da LMC foi feito inicialmente com radioterapia direcionada ao baço. Essa opção terapêutica foi utilizada por cerca de 50 anos, quando agentes alquilantes começaram a ser desenvolvidos após a segunda guerra mundial (1960s) como bulssufano e dibromomanitol (GOLDMAN; MELO, 2003).

Posteriormente, os Estados Unidos desenvolveram a hidroxiureia, a qual passou a ser a primeira opção terapêutica, uma vez que estava relacionada com maior sobrevida

dos pacientes quando comparada ao bulssufano. No entanto, nenhum desses tratamentos promoviam remissão molecular e citogenética da LMC (HEHLMANN *et al.*, 1994).

No início dos anos 80, o INF-alfa passou a ser a nova recomendação terapêutica para o tratamento da LMC, a qual demonstrou reverter alguns casos de Ph<sup>+</sup> (TALPAZ *et al.*, 1986). Posteriormente, em 1990, surgiu o transplante de medula óssea (TMO) alogênico, o qual passou a ser o tratamento de escolha em pacientes até 50 anos de idade que estivessem em fase crônica devido à grande possibilidade de cura da LMC (ARORA, Mukta; HOROWITZ, 2006; TALPAZ *et al.*, 1983).

A partir dos anos 2000 foram desenvolvidos os inibidores de tirosino quinase (ITK), a primeira terapia-alvo em casos de leucemia, a qual mudou o curso da LMC, sendo a principal opção terapêutica até os dias atuais (SACHA, 2014). O mecanismo de ação dos ITK consiste no bloqueio da ligação da proteína tirosino quinase ao ATP, no domínio ABL1 quinase. Essa ligação impede a doação do grupamento fosfato pelo ATP, inibindo a ativação da cascata por fosforilação. Assim, ocorre redução da leucemogênese por inibição da proliferação, regulação da diferenciação das células mieloproliferativas e restabelecimento do mecanismo de apoptose (APPERLEY, 2015).

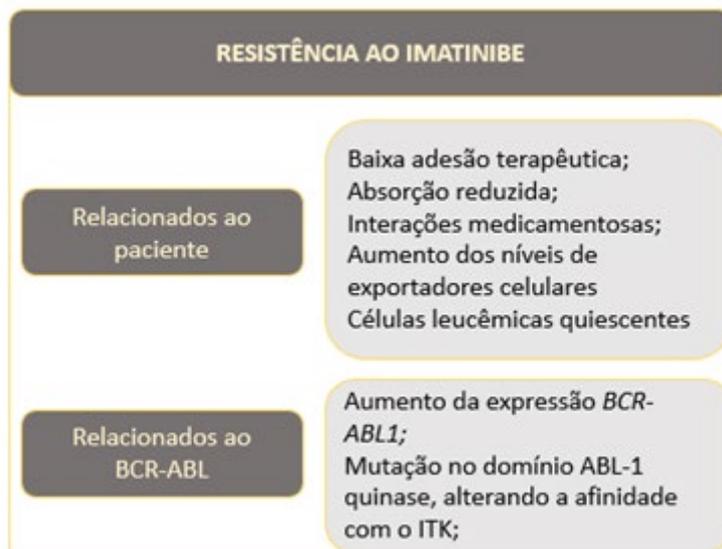
O primeiro medicamento inibidor da tirosino quinase (ITK) Abl usado no tratamento da LMC foi o Mesilato de Imatinibe (MI), descrito em 1996 por Druker e colaboradores como composto CGP 57148. Esse composto age especificamente inibindo a proteína quinase ABL-1, com afinidade superior a outros receptores tirosino quinase. Assim, além de inibir a proliferação e tumorigênese das células BCR-ABL positivas, com elevada especificidade, consolidando a terapia alvo (PASIC; LIPTON, 2017).

Assim, a partir do ano de 1999, foi divulgada a utilização deste medicamento como a primeira linha terapêutica para a LMC. Após essa recomendação, diversos ensaios clínicos foram realizados comparando o tratamento do mesilato de imatinibe com os outros até então disponíveis no mercado, o qual apresentou resultados melhores nas taxas de remissão hematológica, citogenética e molecular (GAMBACORTI-PASSERINI, C. *et al.*, 2005; HOCHHAUS *et al.*, 2009; KANTARJIAN *et al.*, 2003). Além disso, o imatinibe apresentou elevados índices de sobrevida livre de eventos (83%), sobrevida global (95%) e sobrevida livre de progressão (93%) (MUGHAL; SCHRIEBER, 2010).

Esses estudos demonstraram que o tratamento com imatinibe na maioria dos casos apresenta resposta molecular sustentada, no entanto, houve um pequeno número de pacientes que apresentaram progressão da doença durante o tratamento, sugerindo resistência ao imatinibe (PASIC; LIPTON, 2017).

Os casos de resistência ao imatinibe parecem estar relacionados a diversos mecanismos, envolvendo tanto a resistência intrínseca do paciente, como baixa adesão terapêutica, interações medicamentosas, absorção reduzida, aumento dos níveis e exportadores celulares e células leucêmicas quiescentes; como a resistência relacionada ao gene BCR-ABL1, como aumento da expressão de *BCR-ABL1* e mutação do domínio ABL-1 quinase (figura 1). Nesses casos faz-se necessário diferentes esquemas terapêuticos, que incluem alteração de dose, principalmente quando relacionado à resistência intrínseca do paciente, e uso de outras classes de inibidores de tirosino quinase e/ou combinações terapêuticas (CORBIN *et al.*, 2003; MILOJKOVIC; APPERLEY, 2009; PASIC; LIPTON, 2017).

**Figura 3.** Mecanismos de resistência ao imatinibe



ITK: Inibidor de tirosino quinase. Fonte: Próprio autor

Com relação ao uso de imatinibe, em um estudo clínico avaliando 832 pacientes com LMC, 19,3% apresentaram efeitos adversos relacionados ao tratamento com MI, sendo que os mais comuns foram, respectivamente, efeitos gastrointestinais, cardiovasculares, infecciosos, musculoesqueléticos e rash cutâneo. ((GAMBACORTI-PASSERINI, Carlo *et al.*, 2011; MUGHAL; SCHRIEBER, 2010)). A maior parte desses efeitos aparentou ser temporária e reversível com redução da dose, no entanto também

houve relato de toxicidade a longo prazo em <1% dos casos, que inclui neoplasias secundária, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência hepática fulminante e doença pulmonar intersticial (GAMBACORTI-PASSERINI, Carlo *et al.*, 2011; MUGHAL; SCHRIEBER, 2010).

Como inibidores de tirosino quinase de segunda geração, incluem o Nilotinibe e o Dasatinibe, os quais já são utilizados como opções terapêuticas da LMC nos casos de estágios avançados da LMC ou de resistência ao Imatinibe (JABBOUR; CORTES; KANTARJIAN, 2008). O mecanismo de ação desses medicamentos é baseado na inibição competitiva ao ATP. Os inibidores competitivos ATP podem ser divididos em duas subclasses, inibidores Src-Abl e compostos baseados em 2-fenil-aminopirimidina, sendo que o nilotinibe é classificado como composto baseado em 2-fenil-aminopirimidina (MAEKAWA; ASHIHARA; KIMURA, 2007; WEISBERG *et al.*, 2005).

O dasatinibe é um ITK de segunda geração com atividade contra BCR-ABL e sarcoma, sendo classificado como inibidor da Src/Abl. O medicamento foi aprovado para os casos de pacientes com LMC e LLA philadélfia positivos (Ph+) resistentes ao tratamento com mesilato de imatinibe ((KIM *et al.*, 2010; TOKARSKI *et al.*, 2006)). Em um estudo retrospectivo observou-se que 50% dos pacientes em uso de Dasatinibe desenvolveram hipotireoidismo, no entanto, em nenhum dos casos foi necessário tratamento (KIM *et al.*, 2010; TOKARSKI *et al.*, 2006).

O bosutinibe é um ITK de segunda geração que atua como inibidor da quinase BCR-ABL1/SRC. Seu uso foi inicialmente recomendado como terapia de quarta linha, em casos de resistência à terapia com imatinibe, dasatinibe e/ou nilotinibe, mas também foi aprovado como terapia de primeira linha. No entanto, devido a apresentar toxicidades de longo prazo como diarreia e anormalidades da função hepática, o medicamento foi descontinuado (CORTES *et al.*, 2018; GARCÍA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

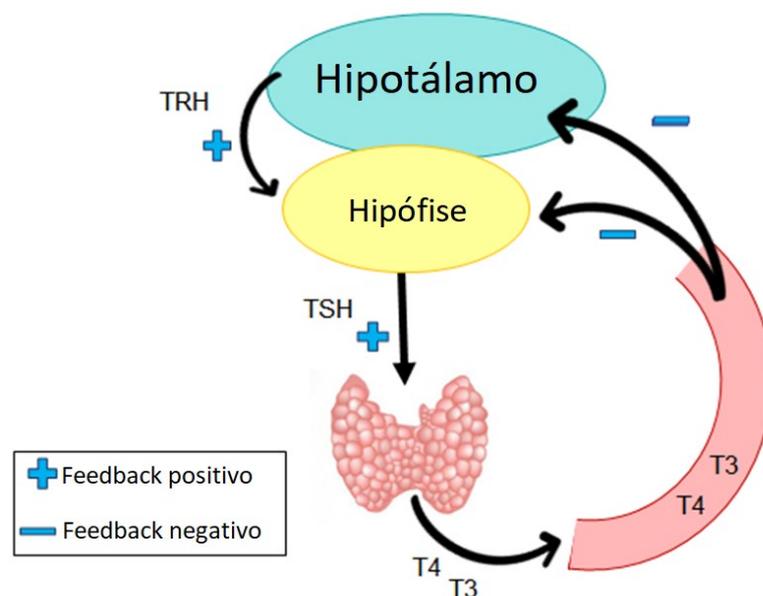
O ponatinibe é um novo inibidor ABL-1 de terceira geração usado em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) refratários ou intolerantes a inibidores alternativos de tirosina quinase e para aqueles portadores da mutação do domínio T315I Abl quinase (ZHOU, 2009). Os ITKs têm efeitos colaterais característicos por causa de sua atividade fora do alvo *BCR-ABL1* contra outras quinases, como KIT e PDGFR $\alpha$ . No entanto, além desses efeitos, o ponatinib tem atividade adicional contra FLT-3 e VEGFR2, assim, este

pode ter atividade antiangiogênica. Quanto aos efeitos colaterais, o ponatinibe está relacionado a um risco cardiovascular aumentado, sendo necessário manejo terapêutico. Além disso, observa-se que os medicamentos com efeitos antiangiogênicos são relacionados a causas de hipotireoidismo em até 36% dos casos (SAUSSELE *et al.*, 2020).

## 1.2 Disfunção Tireoidiana

A disfunção tireoidiana é definida por uma alteração funcional da glândula tireoide, a qual é responsável pelo controle do metabolismo corporal através da secreção dos hormônios tireoidianos: T4 (tiroxina) e T3 (triiodotironina). O principal regulador do estado morfológico e funcional da tireoide é o hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH) produzido pela hipófise. O TRH aumenta a secreção do TSH. Assim, em situações fisiologicamente normais, o TSH estimula a tireoide a produzir os hormônios tireoidianos (HT), os quais possuem uma relação de retroalimentação negativa (Figura 01)(BRENT, 2012).

**Figura 4.** Mecanismo de regulação da produção de hormônios tireoidianos.



TRH estimula a secreção de TSH pela hipófise anterior, o qual induz a síntese e secreção de T4 e T3 pela tireoide. Os hormônios tireoidianos T4 e T3 inibem a secreção de TRH e TSH por retroalimentação negativa. TRH: Hormônio liberador de tireotrofina. TSH: Hormônio tireotrófico. T4: Tiroxina. T3: Triiodotironina (BRENT, 2012).

Fonte: próprio autor.

A disfunção tireoidiana pode ocorrer tanto pela hiperfunção da tireoide, com produção aumentada de hormônios tireoidianos (hipertireoidismo), como pela diminuição da função e produção de HT (hipotireoidismo), que podem ser classificados como subclínico ou clínico (BASKIN *et al.*, 2002).

Como o hormônio tireoidiano (HT) regula vários tecidos e órgãos, seu excesso leva a sinais e sintomas de metabolismo mais elevado como perda de peso, osteoporose, fraqueza muscular, tremores, eventos neuropsiquiátricos e consequências cardiovasculares que podem levar ao óbito (ROSS *et al.*, 2016).

Em caso de redução do HT, há sintomas comuns de diminuição do metabolismo, como fadiga, fraqueza muscular, ganho de peso, intolerância ao frio, constipação, função cognitiva e memória reduzidas, depressão e má qualidade de vida (BALDINI *et al.*, 1997; JORDE *et al.*, 2006; RAZVI *et al.*, 2007; ROSARIO, 2017).

No entanto, esses sinais e sintomas tanto de aumento como de redução dos HT são inespecíficos. Assim, a medida dos níveis de TSH é o método mais sensível para diagnosticar a disfunção tireoidiana. Existe uma relação log-linear entre HT (FT4 e/ou T3) e TSH, assim, alterações no HT influenciam diretamente no nível de TSH. A medição do TSH é considerada como uma triagem inicial, portanto, a repetição do exame é recomendada para definir a disfunção tireoidiana como transitória ou não (BASKIN *et al.*, 2002; BIONDI; CAPPOLA; COOPER, 2019; ROSARIO, 2017).

A disfunção tireoidiana evidente ou clínica é observada quando os níveis de HT estão aumentados (tireotoxicose) ou diminuídos (hipotireoidismo). Os casos subclínicos são definidos por níveis normais de HT juntamente com níveis de TSH diminuídos ou aumentados (tireotoxicose e hipotireoidismo, respectivamente) (DE LEO; LEE; BRAVERMAN, 2016). O hipotireoidismo clínico é uma das doenças endócrinas mais comuns, com prevalência na população geral variando entre 0,2 e 5,3% na Europa, enquanto o hipertireoidismo clínico apresenta prevalência de 0,7% (TAYLOR *et al.*, 2018). A presença de hipotireoidismo subclínico foi relatada em 9% da população geral nos Estados Unidos (CANARIS *et al.*, 2000) e um estudo de meta-análise relatou frequência de hipotireoidismo subclínico em 3,7% da população na Europa (MADARIAGA *et al.*, 2014).

O hipotireoidismo não tratado pode desencadear dislipidemia e doenças cardiovasculares, além de estar relacionado a maiores taxas de mortalidade. Isso alerta para a importância de um diagnóstico precoce. O diagnóstico do hipotireoidismo é sobretudo laboratorial, definido por concentração de TSH acima do valor de referência, podendo ocorrer com T4L abaixo do valor de referência (hipotireoidismo clínico) ou com T4L dentro dos valores normais (Hipotireoidismo subclínico). O hipotireoidismo subclínico (HSC) é considerado leve se os níveis de TSH forem  $<10\text{mU/L}$  ou grave, se o TSH  $\geq 10\text{mU/L}$  (ROSARIO, 2017). A maioria dos casos de HSC são leves (CANARIS *et al.*, 2000).

Os sinais e sintomas do hipotireoidismo são inespecíficos. Como o TSH é considerado como triagem inicial, recomenda-se pelo menos uma nova dosagem, além de fT4 e anticorpos para peroxidase tireoidiana. Em caso de TSH  $> 10\text{ mU/L}$ , recomenda-se repetir por pelo menos 2 semanas. Em casos de TSH  $< 10\text{ mU/L}$ , o reteste de 1 a 3 meses define se o HSC foi transitório ou não (BASKIN *et al.*, 2002; BIONDI; CAPPOLA; COOPER, 2019; ROSARIO, 2017).

Alguns fatores estão relacionados com o desenvolvimento de hipotireoidismo, como sexo feminino, idade avançada ( $>65$  anos), doenças autoimunes, além de alguns medicamentos, como amiodarona, INF-alfa e corticosteroides (CHARTER, 2017).

O objetivo do tratamento do hipotireoidismo é reduzir os sinais e sintomas e prevenir complicações a longo prazo (BIONDI; WARTOFSKY, 2014; CHIOVATO; MAGRI; CARLÉ, 2019). O tratamento padrão para o hipotireoidismo clínico é realizado com levotiroxina (LT4), com dosagem variando de 1,5-1,8  $\mu\text{g/kg}$ . No hipotireoidismo subclínico, o tratamento é indicado para pacientes mais jovens, especialmente em mulheres em idade fértil, pacientes sintomáticos e pacientes com TSH  $> 10\text{ mU/L}$  (ROSARIO, 2017). Para os casos de HC em adultos jovens e saudáveis, o tratamento geralmente é iniciado com a dosagem total. Em casos de HSC leve, recomenda-se tratar os pacientes idosos, com risco aumentado de doença cardiovascular ou com doença cardiovascular estabelecida. Nesse caso é recomendado tratamento com dose inicial baixa (12–25  $\mu\text{g}$ ) uma vez ao dia (ROSARIO, 2017); (DE CARVALHO *et al.*, 2018).

A levotiroxina sintética (LT4) está disponível na forma de comprimidos, cápsulas de softgel, formas líquidas e intravenosas. A forma mais prescrita é por comprimido, que

deve ser ingerido com o estômago vazio para melhor absorção. Assim, recomenda-se o uso do medicamento 60 minutos antes do café da manhã ou pelo menos 3 horas após o jantar (CHIOVATO; MAGRI; CARLÉ, 2019)(JONKLAAS *et al.*, 2014). A Associação Americana de Tireoide (AAT) recomenda não alternar entre diferentes apresentações e marcas de LT4, a fim de evitar variações na eficácia clínica (JONKLAAS *et al.*, 2014).

Uma vez iniciado o tratamento com LT4, os níveis de TSH devem ser monitorados de 6 a 8 semanas até o intervalo normal, ajustando as doses, se necessário (ROSARIO, 2017). Uma vez estabilizado, a dosagem de TSH passa a ser indicada a cada 6 meses (CHARTER, 2017).

### **1.3 Hipotireoidismo e Inibidores de Tirosino Quinase**

Os inibidores de tirosino quinase são utilizados para tratar diversas neoplasias, como câncer de cólon, melanoma, câncer medular de tireoide e LMC. A ocorrência de disfunção tireoidiana associada ao uso de ITK é conhecida na literatura, sobretudo em tumores sólidos (BAILEY *et al.*, 2015; DE GROOT, Jan Willem B. *et al.*, 2005; ROSARIO, 2017; SHAH; SHAH; MORGANROTH, 2013; TORINO *et al.*, 2009).

Na LMC, a disfunção tireoidiana ocorreu entre 53% a 85% dos casos em estudos retrospectivos e 36% a 71% dos casos em estudos prospectivos (FALLAHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2010). Na maioria dos casos, a disfunção presente foi o hipotireoidismo, sendo muitas vezes transitório ou subclínico e, embora não haja necessidade inicial de tratamento, esses pacientes precisam ser acompanhados para garantir o melhor manejo terapêutico (BILEN *et al.*, 2016). Quanto ao tipo de medicamento, observou-se a ocorrência de hipotireoidismo tanto nos casos de LMC tratados com ITK de primeira geração (imatinibe) (FALLAHI *et al.*, 2014; LECHNER *et al.*, 2018b), como de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe) (FALLAHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2010; LECHNER *et al.*, 2018b).

O hipotireoidismo induzido por ITK foi demonstrado em tratamento de tumores sólidos principalmente por inibidores de VEGF (DESAI *et al.*, 2006; VETTER; KAUL; IQBAL, 2008). O desenvolvimento de hipotireoidismo durante a terapia com sunitinibe variou de 12 a 55 semanas e foi associado à melhora da sobrevida (BADRAN *et al.*, 2020; BAILEY *et al.*, 2015; DE GROOT, J. W. B.; LINKS; VAN DER GRAAF, 2006).

Além disso, o uso de imatinibe e sunitinibe em um paciente após tireoidectomia aumentou os níveis de hormônio tireoidiano sem alterar a dosagem de LT4. Quando o ITK foi descontinuado, os níveis de HT diminuíram (LECHNER *et al.*, 2018b).

Um estudo de coorte retrospectivo mostrou disfunção tireoidiana em 40% dos pacientes submetidos ao tratamento com ITK em diferentes tumores. O hipotireoidismo foi a principal disfunção tireoidiana, com casos de hipotireoidismo subclínico em 13,2% (71/538) dos casos e de hipotireoidismo clínico ocorreu em 26,8% (144/538) dos casos. A mediana para desenvolver hipotireoidismo foi de 21 semanas após o início do tratamento (LECHNER *et al.*, 2018b). Em relação ao tipo de ITK, o hipotireoidismo ocorreu em diferentes terapias, a maioria com ponatinib (1/2; 50%), tivozanib (1/2; 50%) e cediranib (2/4; 50%) (LECHNER *et al.*, 2018b)

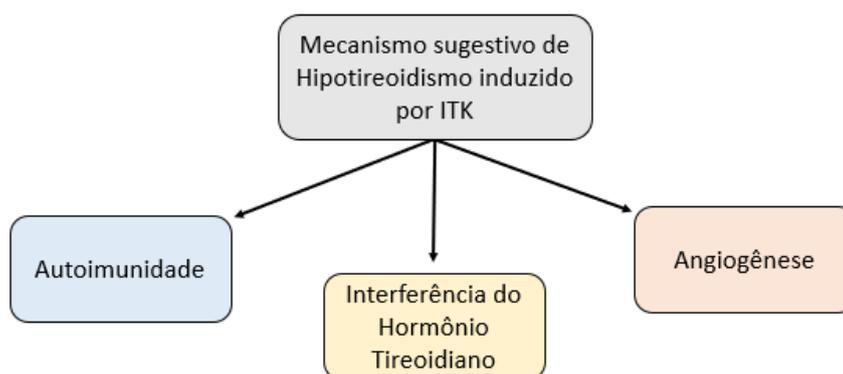
Em pacientes com LMC, a disfunção da tireoide foi relatada em 36-85% dos pacientes (KIM *et al.*, 2010). A disfunção tireoidiana mais prevalente foi o hipotireoidismo, sendo geralmente transitório ou subclínico. A maioria dos pacientes diagnosticados não requerem tratamento, mas é de suma importância manter o acompanhamento a longo prazo (BILEN *et al.*, 2016). Observou-se o desenvolvimento de hipotireoidismo tanto após o uso de ITK de primeira geração (PATEL *et al.*, 2020) como de segunda geração (FALLAHI *et al.*, 2014; LECHNER *et al.*, 2018a; PATEL *et al.*, 2020).

Observou-se, ainda, que a disfunção tireoidiana foi mais prevalente durante o tratamento de LMC com ITK de segunda geração, com 55% dos casos de uso de Nilotinibe e 70% dos casos de tratamento com Dasatinibe, enquanto observou-se disfunção tireoidiana em 25% dos casos de terapia com imatinibe (ITK de primeira geração). A disfunção da tireoide foi transitória na maioria dos pacientes (74%), e apenas três pacientes precisaram de tratamento (KIM *et al.*, 2010).

Outros estudos demonstraram maior frequência de hipotireoidismo durante o tratamento de LMC com nilotinibe (14/28; 50%), imatinibe (37/89; 41,6%) e dasatinibe (4/12; 33,3%). O mesmo estudo demonstrou que o hipotireoidismo estava relacionado à maior sobrevida geral (SG), com mediana de SG mais alta no hipotireoidismo (LECHNER *et al.*, 2018a).

Embora se observe a associação entre o uso de ITK e o hipotireoidismo, o mecanismo associado a esse efeito ainda não está claro. No entanto, existem algumas hipóteses, como autoimunidade, alteração no metabolismo do hormônio tireoidiano e comprometimento vascular da tireoide.

**Figura 5.** Mecanismos sugestivos de hipotireoidismo induzido por ITK.



Fonte: Próprio autor.

A autoimunidade é considerada um possível mecanismo de disfunção tireoidiana relacionada ao uso de ITK, embora existam poucos estudos demonstrando anticorpos tireoidianos nesses casos (BAKERYWALA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2010).

Durante a terapia com ITK, observou-se casos de tireoidite destrutiva e de inibição da atividade da tireoide peroxidase (BAKERYWALA *et al.*, 2015; LOEFFLER *et al.*, 1988; TORINO *et al.*, 2009). Além disso, um caso de hipertireoidismo com anticorpos anti-receptor de TSH positivos foi demonstrado após 18 semanas de terapia com sunitinibe (EROUKHMANNOFF *et al.*, 2016). Durante o tratamento com nilotinibe, um caso de tireoidite destrutiva com anticorpos positivos foi relatado, sendo que após a descontinuação do tratamento, houve recuperação do caso (BAKERYWALA *et al.*, 2015).

Outro achado relevante foi a ocorrência de tireoidite com reduzida vascularização da tireoide, a qual foi recuperada após a descontinuação do sunitinibe, sugerindo um processo secundário à hipóxia (MAKITA *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram que o uso de ITK induz alterações nos níveis de HT em pacientes pós tireoidectomia total, como demonstrado em pacientes que faziam uso de imatinibe (DE GROOT, Jan Willem B. *et al.*, 2005) e em pacientes sem alteração

morfológica na tireoide. Esse fato sugere que o mecanismo associado à disfunção tireoidiana pode não ser por efeito direto na glândula tireoide.

Assim, a alteração nos hormônios tireoidianos poderia ser secundária aos efeitos no metabolismo dos HT. O TSH estimula a glândula tireoide a produzir os HT: T4 (tiroxina) e T3 (triiodotironina). Apesar da maior parte de HT formado pela tireoide (80%) ser o T4, o hormônio tireoidiano considerado ativo é o T3, o qual se liga a receptores específicos TR $\alpha$  e TR $\beta$ .

O processo de metabolização dos HT ocorre a nível celular por um processo denominado deiodinação, o qual ocorre por iodotironina deiodinases específicas, que podem ser do tipo 1, 2 ou 3 (DIO1, DIO2, DIO3). Esse processo pode resultar em ativação dos HT, com metabolização de T4 a T3 por DIO1 e DIO2, como em inativação de ambos por DIO3.

A DIO1 está localizada na membrana plasmática celular. Apesar de ativar T4 em T3, essa enzima possui baixa atividade pelo T4, o que gera pouco T3 ativo. A principal atividade da DIO1 está na degradação dos HT inativos, pela formação de T3r e T3SO4 (SPEK *et al.*, 2017).

A maior parte de conversão periférica em T3 ocorre pela DIO2, a qual está localizada no retículo endoplasmático celular. Sua proximidade nuclear gera vantagens na utilização do T3 gerado. O processo de inativação dos HT ocorre majoritariamente pela DIO3, a qual age convertendo T3 em T4 e T4 em T3 reverso.

Assim, uma alteração no processo de formação dessas enzimas estaria diretamente relacionada à redução na quantidade de HT ativo, como demonstrado em um estudo *in vitro* com tratamento de ITK, o qual demonstrou um aumento na atividade de DIO3, com redução da atividade de DIO1. Assim, ocorreria um aumento do metabolismo dos HT, com diminuição da forma ativa (KAPPERS *et al.*, 2011). Além disso, observou-se hipotireoidismo acompanhado da redução da relação T3/T4 e T3/RT3 em pacientes que faziam uso de sunitinibe ou sorafenibe para tratar tumores sólidos, sugerindo atividade aumentada de DIO3 (ABDULRAHMAN *et al.*, 2010; KAPPERS *et al.*, 2011).

Outro mecanismo periférico para o aumento de TSH induzido por ITK, foi sugerido, onde observou-se a inibição do transportador MCT8 mediado por iodotironina

em pacientes em uso de imatinibe, dasatinibe, bosutinibe e sunitinibe. O MCT8 é um transportador transmembranar de HT, de modo que sua inibição provoca menor quantidade de T3 disponível nos tecidos e órgãos (BRAUN *et al.*, 2012).

Alguns inibidores de tirosino quinase utilizados em tumores sólidos agem especificamente inibindo a angiogênese por meio da inibição direta de receptores VEGF, como ponatinibe. Nesses casos, observa-se elevação do TSH em aproximadamente 36% dos (ARORA, Amit; SCHOLAR, 2005; KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). Além disso, os ITK podem inibir VEGFR e/ou PDGFR por toxicidade celular direta.

O fluxo sanguíneo da tireoide é regulado principalmente pela via VEGFR. As células foliculares da tireoide expressam VEGF e VEGFR, sendo regulada pelo TSH. Assim, o TSH, ao se ligar ao seu receptor nas células foliculares de tireoide, estimula a produção de mediadores químicos e de VEGF-A (MAKITA; IIRI, 2013; RAMSDEN, 2000).

O VEGF-A secretado estimula VEGFR nas células endoteliais de maneira parácrina, como consequência, as células endoteliais proliferam-se e fundem-se, com aumento dos níveis de VEGFR 1 e 2 e do o lúmen vascular (MAKITA; IIRI, 2013; RAMSDEN, 2000).

O hipotireoidismo pode estar relacionado à supressão vascular da tireoide (CORTES *et al.*, 2018; GILES *et al.*, 2013; LARSON *et al.*, 2014; MAKITA; IIRI, 2013; WEISBERG *et al.*, 2005). Isso sugere que o TSH desempenhe um efeito pró-angiogênico, provocando aumento do fluxo sanguíneo da tireoide. Nesse caso, o aumento do TSH seria secundário à supressão da angiogênese, como um mecanismo de feedback positivo para reverter ou minimizar esse quadro.

Os HT parecem ter um efeito pró angiogênico, sendo estimulados em situação de hipóxia para manter a vascularização dos vasos e induzir mecanismos que atenuem esse efeito (LUIDENS *et al.*, 2010).

#### **1.4 Angiogênese**

A angiogênese é definida como o processo biológico de crescimento e remodelação do sistema vascular. O objetivo é aumentar o aporte de oxigênio e de nutrientes, podendo ser estimulada tanto em situações fisiológicas, como em algumas patologias(COSTA;

INCIO; SOARES, 2007). No período embrionário, a formação de novos vasos é essencial para a sustentação dos órgãos em formação. No entanto, existe uma ampla variedade de situações em que há estímulo da angiogênese, como a reprodução, o reparo e a cicatrização de feridas e até mesmo o processo de crescimento tumoral (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; DANESE *et al.*, 2006; FONG, 2008). Trata-se de um processo integrado envolvendo processo de proliferação e migração de células endoteliais, degradação e remodelação da matriz extracelular e maturação de ductos vasculares recém-formados, sendo um processo estimulado por sinalizadores (KIMURA *et al.*, 2000; LEE; SHIN; SIMONS, 2022).

### **Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)**

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) são reguladores cruciais do desenvolvimento vascular durante a embriogênese (vasculogênese), bem como durante a formação do vaso sanguíneo (angiogênese) no adulto. Apesar do VEGF ter função principalmente diante de células endoteliais, essa citocina apresenta efeitos em diversos tipos celulares (KOCH; CLAEISSON-WELSH, 2012).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F. O VEGF-A é a isoforma mais estudada devido a seu papel-chave no processo de proliferação do endotélio, além de ser um dos principais mediadores de angiogênese e de indução da permeabilidade vascular em situações patológicas e de homeostasia (YAMAZAKI; MORITA, 2006).

O VEGF é regulado principalmente pela transcrição do *HIF-1 $\alpha$*  (fator de indução de hipóxia tipo alfa), o qual é expresso em condições de supressão de oxigênio. Assim, a hipóxia tem sido reconhecida como um importante estímulo da produção do VEGF (JENSEN *et al.*, 2006).

A expressão do VEGF também pode ser estimulada por diversos fatores externos, como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, hormônios, estresse celular, oncogenes e biodisponibilidade de óxido nítrico (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; JENSEN *et al.*, 2006) (EMING; KRIEG, 2006).

O VEGF liga-se a dois receptores de tirosina-quinase, VEGF-R1 (flt-1) e VEGF-R2 (KDR/flk-1), que são expressos em diversos tipos de células, incluindo células endoteliais vasculares e várias células hematopoiéticas (SHIBUYA, 2011). Uma vez ligado aos seus receptores, o VEGF estimula as células endoteliais a produzirem metaloproteinases de matriz, as quais degradam a membrana basal e a matriz extracelular circundante. Como resultado, as células endoteliais proliferam e migram para o interstício, onde começam a brotar. Posteriormente, os pericitos proliferam e migram para os brotos recém-formados, revestindo os novos vasos. Ademais, o gene VEGF também é o principal fator envolvido na mobilização de células progenitoras endoteliais da medula óssea para a circulação periférica e para os locais angiogênicos, onde se diferenciam e se integram à neovasculatura (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; NILLESEN *et al.*, 2007; SEMENZA, 2012).

Mais recentemente, o VEGF foi descrito como um sinalizador autócrino do crescimento de células-tronco hematopoiéticas (FLORENTIN *et al.*, 2022; KOCH; CLAESSION-WELSH, 2012). Na medula óssea humana normal, o VEGF é expresso principalmente em megacariócitos e progenitores mielóides. À medida que ocorre diferenciação e maturação dos granulócitos, os níveis de VEGF citoplasmáticos diminuem (FÜREDER *et al.*, 2006).

Além da função fisiológica do VEGF, também foi demonstrado que o VEGF desempenha um papel importante na patogênese de crescimento de tumor, metástase e em casos de retinopatia diabética (APTE; CHEN; FERRARA, 2019; FÜREDER *et al.*, 2006; SHIELDS, 2006).

Observou-se que pacientes com LMC apresentavam elevados níveis de VEGF tanto em células tronco hematopoiéticas, como em níveis detectados no soro (AGUAYO *et al.*, 2000; LUNDBERG *et al.*, 2000). Ademais, observou-se que células Ph<sup>+</sup> expressavam mRNA de VEGF. Essa expressão foi mais acentuada em casos de fase acelerada, enquanto baixos níveis séricos de VEGF foram correlacionados com remissão citogenética (CHEN *et al.*, 2015; GODOY *et al.*, 2015). Ademais, a elevada expressão de VEGF estava correlacionada a uma menor sobrevida global (VERSTOVSEK *et al.*, 2002).

Na LMC, as células leucêmicas expressam VEGF-R1 e VEGF-R2 (DIAS *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2010), sendo que pacientes na fase crônica da doença com elevada expressão de VEGF-R apresentaram sobrevida significativamente menor. Já os níveis do receptor VEGFR-R1 não apresentaram correlação com os critérios clínicos da LMC (VERSTOVSEK *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado um envolvimento da revascularização na progressão da doença em neoplasias hematológicas, caracterizada pela elevação dos níveis de VEGF-A e pela elevada expressão do fator induzido por HIF-1 $\alpha$  (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; PENACK; SOCIÉ; VAN DEN BRINK, 2011).

### **Sistema HIF**

Fatores induzíveis de hipóxia (HIFs) são fatores de transcrição que regulam a expressão de uma grande variedade de genes-alvo envolvidos na proliferação, sobrevivência, quimio-resistência e metabolismo celular (HIROTA, 2021). O HIF é um complexo heterodimérico composto por 2 subunidades: um HIF- $\alpha$  sensível ao oxigênio e um HIF- $\beta$  estável a oxigênio imutável (transportador nuclear receptor de hidrocarbonetos aryl)(WANG *et al.*, 1995). Ambas as subunidades são membros da família básica helix-loop-helix (bHLH) PAS de fatores de transcrição. Até o momento, foram descobertos três tipos de HIF- $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e o HIF-3 $\alpha$  (YANG *et al.*, 2015).

O principal estímulo de resposta molecular à hipóxia é a ativação e estabilização do fator induzido por hipóxia tipo 1 (*HIF-1*) que é responsável pela regulação de muitos genes efetores, os quais são coletivamente conhecidos como genes responsivos à hipóxia. Esses genes são responsáveis por mecanismos de proliferação, metabolismo energético, invasão e metástase; assim, as vias mediadas pelo HIF-1 sinalizam tanto processos fisiológicos, como processos patológicos (BOUTHELIER; ARAGONÉS, 2020; HIROTA, 2021; SZYMCZAK; DYBKO; KULICZKOWSKI, 2018).

Em situações de concentração normal de oxigênio (normóxia), a subunidade HIF-1 $\alpha$  é hidroxilada por proli-hidroxilases (PHDs) iniciando a ubiquitinação e a degradação proteossomal do HIF- $\alpha$ . Em condições de hipóxia, a atividade das PHDs diminui, e a subunidade  $\alpha$  (HIF 1- $\alpha$  e HIF 2- $\alpha$ ) estabilizada se heterodimeriza com HIF-1 $\beta$  e se liga a elementos de resposta à hipóxia (HRE) nos genes alvos promotores (DOWNES *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2021).

A hipóxia tumoral correlaciona-se fortemente com o prognóstico ruim em cânceres sólidos (PEZZUTO; CARICO, 2018), e nos últimos 10 anos, também foi demonstrado o envolvimento das HIFs na leucemia. No entanto, a contribuição do *HIF-1* e *HIF-2* no contexto da leucemogênese ainda é controversa, uma vez que estes já foram descritos como agentes supressores de tumores e como agentes oncogênicos (FORRISTAL *et al.*, 2015; PEZZUTO; CARICO, 2018; ZHANG *et al.*, 2012).

A medula óssea normal é caracterizada por elevada celularidade e baixas concentrações de oxigênio, apesar de apresentar um complexo microambiente vascularizado (TABE; KONOPLEVA, 2014). Neste contexto, as células-tronco hematopoiéticas e progenitoras residem em vários microambientes mal caracterizados, onde os níveis de oxigênio são particularmente baixos, e fatores extrínsecos, como o fator célula-tronco, promovem ainda mais a expressão das proteínas HIF (GEZER *et al.*, 2014; PARMAR *et al.*, 2007). No entanto, vale ressaltar que os níveis reais de oxigênio dos microambientes da medula óssea e a identidade dos nichos locais onde as células-tronco e/ou progenitoras residem, ainda não foram totalmente caracterizados (SCHEPERS; CAMPBELL; PASSEGUÉ, 2015). Uma análise *in situ* de tecido de medula óssea revelou uma elevada expressão HIF-1 $\alpha$  em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) independentemente de sua localização, indicando uma regulação por mecanismos independentes de oxigênio (NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2013).

Na LMC, foi demonstrado que a presença de células BCR-ABL positivas promoveria a expressão de *HIF-1* e *VEGF* (MAYERHOFER *et al.*, 2002). Ademais, esse aumento de transcrição de HIF-1 parece estar relacionado à sobrevivência de células tronco leucêmicas na LMC (ZHANG *et al.*, 2012).

Embora ainda falte uma caracterização completa das vias dependentes de HIF na LMC, outro estudo demonstrou envolvimento do *HIF-1* com a regulação do metabolismo celular. As células de LMC resistentes a imatinibe, as quais exibem aumento da expressão *BCR-ABL1*, foram caracterizadas tanto pelo aumento da transcrição *HIF-1* como pelo alto consumo de glicose via glicólise. Isso gera uma vulnerabilidade metabólica que pode ser explorada em pacientes com progressão acelerada da doença (ZHAO *et al.*, 2010).

Nesse contexto, a avaliação da presença de hipotireoidismo em pacientes com LMC em uso de ITK e sua associação com biomarcadores de angiogênese na LMC auxilia

no esclarecimento do possível mecanismo associado à disfunção tireoidiana, além do estudo do impacto do hipotireoidismo subclínico no prognóstico da LMC.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a frequência de hipotireoidismo em pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosino-quinase e associar com biomarcadores da angiogênese e com a resposta ao tratamento.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar o perfil dos pacientes com LMC ao diagnóstico;
- Determinar a frequência de hipotireoidismo nos pacientes com LMC e no grupo controle
- Associar o hipotireoidismo com os diferentes tipos de inibidor de tirosino-quinase (Imatinibe, Nilotinibe e Dasatinibe), com o tempo de uso dos inibidores de tirosino quinase e a sobrevida livre de eventos;
- Determinar os níveis séricos de VEGF e expressão gênica de *VEGF-A* e *HIF-1* nos pacientes com LMC e no grupo controle;
- Avaliar a associação dos biomarcadores de angiogênese com a presença de hipotireoidismo;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) com parecer de número: 3.066.346.

#### **3.2 Desenho do Estudo**

O estudo é do tipo transversal, com a finalidade de avaliar o hipotireoidismo em pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica em uso de inibidor de tirosina quinase (Imatinibe, Nilotinibe ou Dasatinibe) acompanhados no ambulatório de Hematologia do HUWC no período de janeiro de 2019 a junho de 2020.

#### **3.3 População de estudo**

##### **3.3.1 Critério de Inclusão**

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes atendidos no ambulatório de hematologia HUWC de ambos os sexos maiores de dezoito (18) anos com o diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica que fazem uso de Inibidor de tirosina quinase, com histórico de uso de hidroxiureia.

Para compor o grupo controle foram incluídos 20 doadores de sangue de ambos os sexos, maiores de 18 anos.

##### **3.3.2 Critério de Exclusão**

Grupo de pacientes com LMC: Gestantes e pacientes que descontinuaram o tratamento com ITK.

Grupo controle: pacientes com histórico de uso de LT4.

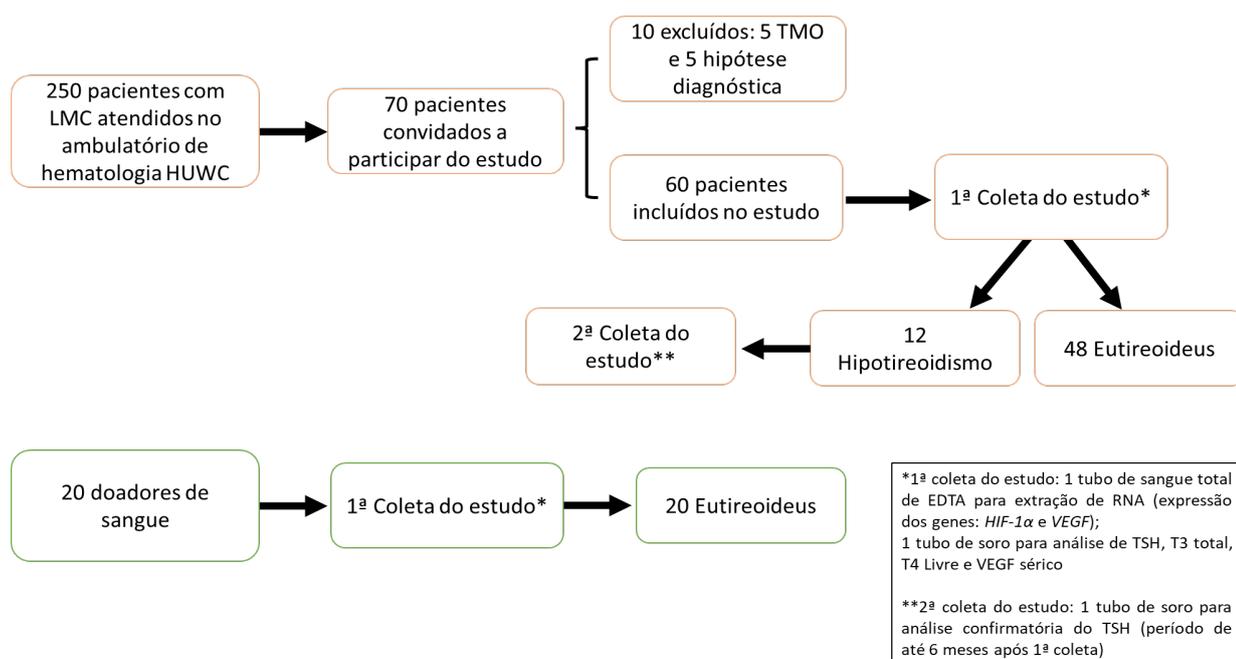
#### **3.4 Local de Estudo**

O estudo clínico foi realizado no ambulatório de Hematologia do HUWC. A coleta sanguínea foi realizada no laboratório de análises clínicas do HUWC. A avaliação da função hormonal foi realizada no laboratório labluz. A análise da expressão gênica e de ELISA dos marcadores da angiogênese foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 3.5 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal composto por 60 pacientes com LMC, escolhidos aleatoriamente, os quais foram divididos de acordo com perfil tireoidiano. Para compor o grupo controle participaram 20 doadores de sangue.

**Figura 6.** Delineamento do estudo.



### 3.6 Variáveis dos pacientes com LMC

Como variáveis clínicas e epidemiológicas utilizamos idade do paciente, sexo, local de procedência, exposição a agentes químicos, hábitos etílicos (atual ou prévio) e tabagistas (atual ou prévio), presença de comorbidades e neoplasia familiar, tempo de doença (contada a partir da data do diagnóstico), tempo de uso de inibidor de tirosina quinase (contada a partir do início do primeiro ITK), histórico de uso de hidroxiureia e tempo de uso de hidroxiureia (meses).

Como dados bioquímicos ao diagnóstico, considerou-se: Glicose, Colesterol total, HDL, Triglicerídeos, Bilirrubina total, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Indireta, Lactato desidrogenase, Ácido Úrico, Ureia, Creatinina, AST/TGO, ALT/TGP, Fosfatase alcalina, Gama Glutamil Transferase (GGT), Sódio (Na), Potássio (K), Cálcio (Ca), os quais foram obtidos de prontuários médico.

Com relação ao perfil tireoidiano, obtivemos através dos dados de prontuários os exames prévios de TSH, T4L e T3T. Sendo considerado como TSH inicial o mais distante do início do tratamento com ITK (0-3 meses do início do tratamento).

Os escores de risco utilizados foram: SOKAL, HASFORD, ELTS, EUTOS, todos calculados a partir das informações clínicas e laboratoriais ao diagnóstico contidas nos prontuários: tamanho do baço e fígado em centímetros (palpados por exame clínico ao diagnóstico); contagem de basófilos, eosinófilos, blastos e plaquetas ao diagnóstico; idade do paciente ao diagnóstico. Os critérios de classificação de acordo com o European LeukemiaNet foram os escores Sokal (Baixo < 0,8; Intermediário: 0,8 – 1,2; Alto > 1,2); Hasford (Baixo < 780; Intermediário: 781 – 1480; Alto > 1480); Eutos (Baixo < 87; Alto > 87); e ELTS (Baixo risco  $\leq$  1.5680; Risco intermediário: 1.5680 - 2.2185; Alto risco: > 2.2185).

Como critério diagnóstico foram utilizados Presença do cromossomo Philadelphia por exame citogenético ou por *fish*; Identificação molecular do gene bcr-abl por RT-PCR em tempo real; ou Mielograma compatível com LMC seguido por início de tratamento que normalmente acontece por hidroxureia e após confirmação posterior por métodos moleculares e/ou citogenéticos, inicia-se o ITK.

Para avaliar a resposta ao tratamento utilizou-se os dados hematológicos, citogenéticos ou moleculares contidos nos prontuários. Como resposta molecular, definiu-se que o valor de escala internacional 1%, 0.1%, 0.01%, 0.0032% e 0.001% corresponde a um decréscimo de 2, 3, 4, 4.5, e 5 logs. Como Resposta Molecular Completa (RMC) considerou-se valores inferiores a 0,01%; como Resposta Molecular Maior (RMM), considerou-se valores entre 0,1-0,01%; como Sem Resposta Molecular (SRM), considerou-se valores superiores a 0,1%.

### **3.7 Coleta das Amostras Biológicas**

A coleta das amostras de sangue periférico foi efetivada após explicação detalhada dos objetivos do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo com gel separador de soro e 5 mL de sangue em tubo contendo EDTA. O paciente apresentava-se em jejum de 12 horas. Os pacientes com hipotireoidismo tiveram TSH confirmado em um período de 6 meses.

### 3.8 Armazenamento e uso das amostras

- As amostras de soro foram aliquotadas e separadas para a dosagem hormonal (TSH, T4L e T3) e para a análise de VEGF sérico. As dosagens hormonais foram realizadas em um prazo de até 24h após a coleta no laboratório de análises clínicas Labluz. As amostras para análise de VEGF sérico foram armazenadas em duplicata a -80°C para posterior análise no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC).
- As amostras de sangue total colhidas em tubo com EDTA foram utilizadas para extração de RNA e síntese em cDNA, sendo então armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC (LACT) para posterior avaliação da expressão dos genes *HIF- $\alpha$*  e *VEGF*.

### 3.9 Testes realizados:

#### 3.9.1 VEGF-A SÉRICO:

A quantificação de VEGF sérica foi realizada por um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) em sanduíche em fase sólida, utilizando o “Invitrogen Human VEGF ELISA Kit®”. O ensaio reconhece VEGF humano natural e recombinante. O teste realizado seguiu as recomendações do fabricante.

#### 3.9.2 Análise de expressão gênica

##### 3.9.2.1 Extração de RNA

Para a separação das células do *pool* celular do sangue periférico, foi realizada a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde as células foram lavadas com solução de lise (25 mL de solução de cloreto de amônio 0,144 M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente por 3 minutos e centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida, desprezada a fase aquosa e acrescentado 250  $\mu$ L de PBS, dependendo do volume do material obtido. Para a extração de RNA total foi utilizado 250  $\mu$ L desse material com guanidina isotiocianato (*Trizol LS Reagent®*) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

### **3.9.2.2 Síntese de cDNA**

A síntese do *cDNA* foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems*® (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems*®). Os procedimentos referentes à síntese do *cDNA* foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Após esse processo, as amostras de *cDNA* foram armazenadas em freezer -80° C até o momento das análises moleculares.

### **3.9.2.3 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)**

A quantificação da expressão dos genes relacionados com a angiogênese (HIF-alfa e VEGF) foi realizada a partir da análise da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no aparelho *CFX96 Real-time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA)* disponível no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Universidade Federal do Ceará. As reações foram preparadas utilizando-se o *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)* otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® e contendo a *AmpliTaq Gold DNA* polimerase, dNTPs e tampão otimizado.

Para normalizar os dados de expressão dos genes que foram avaliados neste estudo, utilizou-se o gene endógeno *β2-microgloblina*.

### **3.9.2.4 Validação da qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras de cDNA dos pacientes**

Para determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliados utilizamos o software *Best Keeper*. Com este aplicativo no Excel, foi possível calcular o desvio padrão de cada amostra para cada gene alvo avaliado com base em valores brutos de *Cq* (PFAFFL, 2004). As amostras de cada gene com os menores desvios padrões foram consideradas mais estáveis e utilizadas para prosseguimento das análises estatísticas.

### **3.9.3 Dosagens hormonais**

Para a verificação do estado hormonal foram dosados T4 livre, T3 total e TSH séricos dos pacientes com LMC.

**T4 livre:** O teste T4 livre foi realizado a partir do ensaio ADVIA Centaur, que se trata de um imunoenensaio competitivo que utiliza tecnologia quimioluminescente direta. Foram

considerados normais (eutireoidismo) para o teste T4 livre os valores entre 0,61-1,48 ng/dL

**T3 total:** O teste de T3 total foi realizado a partir do método de quimioluminescência direta utilizando o ADVIA Centaur®. Foram considerados normais (eutireoidismo) para o teste T3 os valores entre 0,70-2,04 ng/dL.

**TSH:** Foi dosado a partir do método de quimioluminescência utilizando o ensaio ADVIA Centaur XP, que se trata de um imunoenensaio do tipo sanduíche efetuado em dois locais, a qual utiliza quantidades constantes de dois anticorpos. Foram considerados normais (eutireoidismo) para o teste TSH os valores entre 0,34 – 4,70 mUI/L.

#### **3.9.4 Perfil hematológico**

Para a verificação do perfil hematológico foi utilizado o hemograma dos pacientes, realizados no HEMOCE, usando o método de bioimpedância e citometria de fluxo no analisador automático CELL-DYN RUBY.

#### **3.10 Descarte do material biológico**

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

#### **3.11 Análise Estatística**

Foi realizada mediante a utilização do programa estatístico GraphPad Prism 6.0. Para analisar diferenças entre variáveis quantitativas contínuas nos dois tempos foi utilizado o teste t de Student não pareado ou Mann-Whitney, para analisar diferenças entre 3 ou mais grupos utilizou-se ANOVA ou Kruskal-Wallis, conforme apropriado. Para teste de correlação entre as variáveis utilizou-se correlação de Pearson ou Spearman, conforme apropriado. Para analisar a sobrevida livre de eventos, utilizou-se o método de Kaplan-Meier. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características Clínicas, Bioquímicas e hematológicas dos pacientes com LMC

O presente estudo incluiu 60 pacientes diagnosticados com Leucemia Mieloide Crônica em uso de inibidores de tirosino quinase. A média de idade foi  $49,4 \pm 14,94$  anos, com 56,7% pertencentes ao sexo masculino (N=34). Quanto às características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico, observou-se que os pacientes apresentavam anemia, leucocitose e trombocitose, além de hepatomegalia e esplenomegalia. A classificação prognóstica ao diagnóstico pela maioria dos escores de risco foi intermediária e o tempo de doença médio 71,5 meses (tabela 1).

**Tabela 1.** Características sociodemográficas e laboratoriais ao diagnóstico.

Variáveis	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
IDADE (anos)	57	44,43	16,65	12	92
Fígado (cm)	36	2,19	2,93	0	9
Baço (cm)	46	7,4	6,51	0	24
Hemoglobina (g/dL)	56	10,51	1,98	6,4	14,3
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	56	176.418	147.300	4245	635.000
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	56	500.751	380.404	150.200	2.764.000
Sokal	46	2,73	9,19	0,54	62,82
Hasford	46	1032,443	611,414	123,9	3311,6
Eutos	46	58,065	45,471	0	204
ELTS	46	1,8124	0,9257	0,4938	6,3147
Tempo de doença (meses)	58	71,5	65,4	3	205

Idade: Idade do paciente no momento do diagnóstico em anos. Fígado e baço: centímetros palpáveis em exame clínico. Hemoglobina=11,5-15,7 g/dL; Leucócitos= 3.600-11.000 cel/mm<sup>3</sup>; Plaquetas: 150.000-450.000 cels/mm<sup>3</sup>; LDH: 120 a 246 U/L; Sokal: Baixo < 0,8; Intermediário: 0,8 – 1,2; Alto > 1,2. Hasford: Baixo < 780; Intermediário: 781 – 1480; Alto > 1480. Eutos: Baixo < 87; Alto > 87. ELTS: Baixo risco ≤ 1.5680; Risco intermediário: 1.5680 - 2.2185; Alto risco: > 2.2185. Tempo de doença: tempo em meses desde o diagnóstico de LMC.

Com relação ao perfil socioeconômico, 44,6% (25/56) dos pacientes são residentes de Fortaleza, 16% (9/56) da região metropolitana de Fortaleza e 26,8% (15/56) do interior. Com relação à presença de comorbidades, 57,4% (31/54) relataram algum

tipo de comorbidade, sendo as mais prevalentes: hipertensão arterial 24% (13/54) e diabetes 11,1% (6/54). Quanto ao estilo de vida, 33,3% (17/51) relataram fazer uso de bebida alcoólica, 34% (17/50) relataram hábitos tabagistas prévios e 34% (16/47) relataram casos de neoplasia familiar, sendo leucemia o tipo mais prevalente 31,2% (5/16). Quanto à exposição a agentes citotóxicos, 41,4% (17/41) relataram exposição prévia.

Quanto às características clínicas da LMC no diagnóstico, a maioria apresentou a presença de translocação simples entre os cromossomos 9 e 22 (92,1%; 35/38) e 3 pacientes apresentaram translocação complexa. A presença de mutação M351T e E255K foi diagnosticada em um paciente e a mutação JAK2 em outro.

Quanto às características bioquímicas ao diagnóstico, observou-se que os pacientes apresentavam elevados índices de LDH, triglicerídeos e fosfatase alcalina ao diagnóstico (tabela 2).

**Tabela 2.** Características bioquímicas e hormonais dos pacientes com LMC no diagnóstico.

Variáveis	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Glicose (mg/dL)	36	80,43	16,47	39	112
Colesterol total (mg/dL)	22	163,14	29,12	98	212
HDL (mg/dL)	22	36,12	11,58	19	63
Triglicerídeos (mg/dL)	21	172,52	87,32	59	392
Bilirrubina total (mg/dL)	41	0,57	0,24	0,27	1,4
Bilirrubina Direta (mg/dL)	40	0,15	0,05	0,04	0,27
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	40	0,43	0,23	0,16	1,31
LDH (U/L)	40	1184,9	758,07	339	3177
Ácido Úrico (mg/dL)	36	4,90	1,93	1,6	9,2
Úreia (mg/dL)	46	31,63	10,16	14	56
Creatinina (mg/dL)	48	0,85	0,22	0,4	1,3
AST/ TGO (U/L)	48	27,82	10,99	10	58
ALT/TGP (U/L)	49	27,57	19,34	7	106
FAL (U/L)	32	229,97	197,23	76	910
GGT (U/L)	27	90,63	141,35	9	587
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	34	139,63	3,78	131,5	149
K <sup>+</sup> (mmol/L)	35	4,51	0,81	3,6	7,6

FAL: fosfatase alcalina; GGT: Gama Glutamil Transferase. Valores de referência: GLI=60-99 mg/dL, CT=desejável<200mg/dL, limítrofe=200-240mg/dL; HDL>60mg/dL; TG= desejável≤130 mg/dL, limítrofe=150-200 mg/dL; LDH: 120-246 U/L; AST/TGO=11-39 U/L; ALT/TGP=5-38 U/L; Bilirrubina Total: 0,3 – 1,2 mg/dL; Bilirrubina Direta ≤0,4 mg/dL; Bilirrubina Indireta≤ 0,8 mg/dL; LDH: 120-246 U/L; Ácido úrico: Homens: 3,7-7,8 mg/dL; Mulheres: 2,8-6,5 mg/dL; Ureia: 19,0 - 49,0 mg/dL; Creatinina: Homens: 0,7 e 1,3mg/dL; Mulheres: 0,6 e 1,2 mg/dL; FAL: 36-110 U/L; GGT:15 a 85 U/L; NA: 135 a 145 mEq/L; K: 3,5-5,5 mEq/L.

#### 4.2 Avaliação da função Tireoidiana

Quanto aos hormônios tireoidianos, observou-se presença de hipotireoidismo em 20% (12/60) dos pacientes diagnosticados com LMC. Ademais, observa-se que o TSH do grupo com hipotireoidismo possui níveis médios de 6,18 mUI/mL com T4L e T3 normais, revelando um predomínio de hipotireoidismo subclínico (tabela 3).

**Tabela 3.** Hormônios tireoidianos no Hipotireoidismo e em Eutireoidismo em pacientes com LMC em uso de ITK.

	Hipotireoidismo (N=12)	Eutireoidismo (N=48)	P
TSH (mUI/mL)	6,178 ± 0,3894	2,054 ± 0,1544	<0,0001*
T4L(mUI/mL)	1,177 ± 0,046	1,199 ± 0,025	0,69
T3(mUI/mL)	1,118 ± 0,076	1,069 ± 0,026	0,86

Média ± desvio padrão; p: diferença entre as médias.

TSH:tireotrofina; T4L:tiroxina livre; T3: triiodotironina. Valor de referência: TSH=0,34-4,5; T4L=0,61-1,48; T3=0,7-2,04. \*Valor significativo p<0,05.

Os pacientes com hipotireoidismo apresentaram média de idade de  $49 \pm 21,33$  anos e a maioria (N=8) pertence ao sexo masculino. Ao avaliar os fatores sociodemográficos dos pacientes com LMC e comparar quanto ao perfil tireoidiano, não se observou diferença entre os grupos.

Embora se observe maior prevalência de hipotireoidismo em pacientes do sexo masculino, não se observou diferença estatística entre os grupos.

Avaliando o uso de álcool, apenas 3 pacientes disseram ser etilista, e desses, 1 (33,33%) teve diagnóstico de hipotireoidismo. Daqueles que disseram consumir bebidas alcoólicas de forma social, 14,29% desenvolveram a doença, e dentre os que disseram não consumir bebidas alcoólicas, esse percentual chega a 20,59%. No entanto, o valor  $p=0,717$  indica que não existe impacto do uso de bebidas alcoólicas no desenvolvimento de hipotireoidismo.

Quanto ao consumo de derivados do tabaco, observa-se que a maioria dos pacientes com LMC, tanto no grupo eutireoideu como no hipotireoideu, não tinham histórico de tabagismo. Ao avaliar a variável entre os grupos, concluímos que não existe impacto da variável tabagista no desenvolvimento de hipotireoidismo ( $p=1$ ) (tabela 2).

Ao analisar se a presença de comorbidades no ato do diagnóstico pode influenciar no desenvolvimento de hipotireoidismo, observamos que a maioria dos pacientes com hipotireoidismo não tinham histórico de comorbidade prévia (55%), enquanto 60% dos pacientes que não desenvolveram hipotireoidismo apresentaram alguma outra

comorbidade. No entanto, não se observa diferença estatística entre os grupos, assim, a presença de histórico de comorbidades não influencia o desenvolvimento de hipotireoidismo ( $p=0,472$ ).

Ao avaliar os aspectos clínicos da LMC durante o diagnóstico, o presente estudo demonstrou que os pacientes que desenvolveram hipotireoidismo apresentavam maior tamanho do fígado (tabela 4).

**Tabela 4.** Características clínicas e laboratoriais da LMC ao diagnóstico de acordo com o perfil tireoidiano.

	Hipotireoidismo (N=12)	Eutireoidismo (N=48)	P
Idade (anos)	41,37 ± 22,71	44,95 ± 15,42	0,53 <sup>a</sup>
Fígado (cm)	4,12 ± 3,44	1,64 ± 2,58	0,019*
Baço (cm)	7,0 ± 5,02	7,5 ± 6,88	0,83
Hemoglobina (g/dL)	10,07 ± 1,96	10,61 ± 1,99	0,42 <sup>a</sup>
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	100.800 (146.810)	135.000 (166.475)	0,68 <sup>b</sup>
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	385.000 (363.000)	425.200 (312.500)	0,48 <sup>b</sup>
LDH (U/L)	1308 (1107,575)	792,5 (974,25)	0,57 <sup>b</sup>
Sokal	7,973 ± 6,857	1,453 ± 0,2827	0,055
Hasford	1267 ± 288,4	975,4 ± 87,58	0,20
Eutos	49 ± 8,033	58,68 ± 8,046	0,57
ELTS	2,342 ± 0,52	1,684 ± 0,1062	0,054
Tempo de doença (meses)	82 (121,0)	42,5 (73,0)	0,769 <sup>b</sup>
Tempo de uso de ITK (meses)	62 (97,25)	49 (72,75)	0,75 <sup>b</sup>
Tempo de uso de HU (meses)	3,5 (23,0)	2,0 (3,0)	0,39 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão ou Mediana (Intervalo Interquartil) p: diferença entre as médias. <sup>a</sup>Teste paramétrico.

<sup>b</sup>Teste não paramétrico. ITK: Inibidor de tirosino quinase. HU: Hidroxiureia. Idade: Idade do paciente no momento da coleta em anos. Fígado e baço: centímetros palpáveis em exame clínico. Hemoglobina=11,5-15,7 g/dL; Leucócitos= 3.600-11.000 cel/mm<sup>3</sup>; Plaquetas: 150.000-450.000 cels/mm<sup>3</sup>; LDH: 120 A 246 U/L; Sokal: Baixo < 0,8; Intermediário: 0,8 – 1,2; Alto > 1,2. Hasford: Baixo < 780; Intermediário: 781 – 1480; Alto > 1480. Eutos: Baixo < 87; Alto > 87. ELTS: Baixo risco ≤ 1.5680; Risco intermediário: 1.5680 - 2.2185; Alto risco: > 2.2185. Tempo de doença: tempo em meses desde o diagnóstico de LMC; Tempo

de uso de ITK: tempo em meses desde o início do primeiro ITK. Tempo de uso de HU: Tempo em meses de uso de HU. \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

Ao avaliar se o desenvolvimento de hipotireoidismo teve associação com os escores de risco da LMC (Sokal, Hasford, EUTOS e ELTS), não se observou diferença estatística entre os grupos (tabela 5).

**Tabela 5.** Escores de risco para LMC calculados no diagnóstico em pacientes com LMC com e sem hipotireoidismo.

Escores de risco	Eutireoidismo	Hipotireoidismo	Total	Valor p <sup>a</sup>
<b>Sokal</b>				
Baixo	9 (24,32%)	1 (11,11%)	10 (21,74%)	0,724
Intermediário	15 (40,54%)	5 (55,56%)	20 (43,48%)	
Alto	13 (35,14%)	3 (33,33%)	16 (34,78%)	
Total	37 (100%)	9 (100%)	46 (100%)	
<b>Hasford</b>				
Baixo	15 (40,54%)	2 (22,22%)	17 (36,96%)	0,571
Intermediário	14 (37,84%)	5 (55,56%)	19 (41,3%)	
Alto	8 (21,62%)	2 (22,22%)	10 (21,74%)	
Total	37 (100%)	9 (100%)	46 (100%)	
<b>Eutos</b>				
Baixo	16 (43,24%)	2 (22,22%)	18 (39,13%)	0,524
Intermediário	11 (29,73%)	4 (44,44%)	15 (32,61%)	
Alto	10 (27,03%)	3 (33,33%)	13 (28,26%)	
Total	37 (100%)	9 (100%)	46 (100%)	
<b>ELTS</b>				
Baixo	32 (82,05%)	10 (100%)	42 (85,71%)	0,319
Intermediário	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Alto	7 (17,95%)	0 (0%)	7 (14,29%)	
Total	39 (100%)	10 (100%)	49 (100%)	

a. Valor p teste exato de Fisher. Critérios de classificação de acordo com o European LeukemiaNet: Sokal (Baixo < 0,8; Intermediário: 0,8 – 1,2; Alto > 1,2); Hasford (Baixo < 780; Intermediário: 781 – 1480;

Alto > 1480); Eutos (Baixo < 87; Alto > 87); e ELTS (Baixo risco ≤ 1.5680; Risco intermediário: 1.5680 - 2.2185; Alto risco: > 2.2185).

De acordo com o presente estudo, a maioria dos pacientes com hipotireoidismo possuem escores de risco classificados como intermediário: Sokal (55%); Hasford (55%); Eutos (44%); no entanto, na classificação de risco pelo escore ELTS todos os pacientes com hipotireoidismo foram classificados como risco baixo (11%); já no grupo de pacientes eutireoideus, observou-se que a maioria apresentou escores baixos: Hasford (40,54%); Eutos (43,24%) e ELTS (82,05%), sendo apenas o escore Sokal com maioria classificada como intermediário (40,54%) (tabela 5). No entanto, não se observa diferença estatística na classificação de risco entre os grupos com hipotireoidismo e sem hipotireoidismo.

No universo de pacientes com hipotireoidismo, quando analisados quanto ao uso de ITK, observou-se que 50% dos pacientes estavam fazendo uso de Imatinibe (n=6) e que eles apresentaram mediana de tempo de uso de medicamento de 49 meses, com IIQ de 72,75 meses. A média de uso de ITK nesses pacientes foi de  $65,41 \pm 61,92$  meses.

Ao avaliar a variação desses hormônios (TSH, T4L) durante o tratamento com ITK, observou-se aumento nos níveis de T4L (tabela 6).

**Tabela 6.** Hormônios tireoidianos de acordo com o tempo de tratamento.

	Diagnóstico	Coleta	p
TSH (mUI/L)	$2,59 \pm 2,63$	$2,87 \pm 2,00$	0,46
T4L (ng/dL)	$1,03 \pm 0,21$	$1,19 \pm 0,17$	<0,001*

Média ± desvio padrão; p: diferença entre as médias.

TSH:tireotrofina; T4L:tiroxina livre. Valor de referência: TSH=0,34-4,7; T4L=0,61-1,48. \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

Ao avaliar a ocorrência de hipotireoidismo de acordo com o tempo de doença, observou-se alta correlação entre TSH e tempo de doença (meses) em pacientes com hipotireoidismo ( $R=0,733$ ;  $p=0,01$ ), indicando que o TSH está elevado em pacientes com mais tempo de diagnóstico de LMC. Curiosamente, o mesmo ocorre ao analisar a correlação entre os níveis de TSH e o tempo de tratamento com hidroxiureia ( $R=0,875$ ;  $p < 0,001$ ). Porém, não se observou correlação entre os níveis de TSH e o tempo de tratamento com ITK em pacientes com hipotireoidismo ( $p=0,07$ ).

A fim de avaliar variáveis relacionadas ao tempo livre de hipotireoidismo, avaliamos a curva de sobrevivência de Kaplan Meier, que estima a probabilidade de sobrevida livre de evento. No nosso caso, o evento foi o desenvolvimento de hipotireoidismo.

Na Tabela 7 é mostrado os tempos de tratamento, valores de probabilidade, número de eventos, erro padrão e intervalo de confiança de 95%. Conforme podemos observar, o evento com menor tempo registrado ocorreu com apenas 2 meses após início do tratamento.

Outras informações são que a probabilidade de os pacientes não desenvolverem hipotireoidismo em até 15 meses após o início do tratamento é bem alta (92,50%), isso sugere que o hipotireoidismo seja um efeito de longo prazo. Após 85 meses a probabilidade de não desenvolver a doença é 80,60%, reduzindo com o tempo, sendo que após 153 meses, essa probabilidade baixa para 51,90%, e após 161 meses baixa para 34,60% (tabela 7).

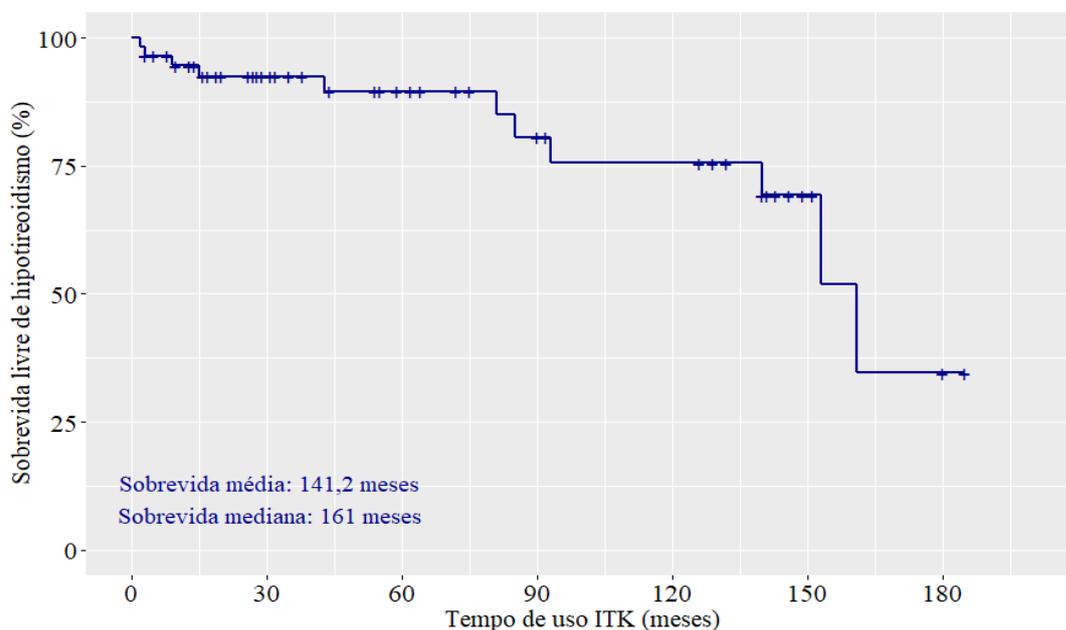
**Tabela 7.** Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em uso de ITK.

Tempo (em meses)	nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
2	57	1	98,20%	1,74%	94,90%	100%
3	56	1	96,50%	2,44%	91,80%	100%
9	50	1	94,60%	3,06%	88,80%	100%
15	46	1	92,50%	3,62%	85,70%	99,90%
43	31	1	89,50%	4,57%	81,00%	98,90%
81	20	1	85,00%	6,15%	73,80%	98,00%
85	19	1	80,60%	7,28%	67,50%	96,20%
93	16	1	75,50%	8,39%	60,80%	93,90%
140	12	1	69,20%	9,77%	52,50%	91,30%
153	4	1	51,90%	16,69%	27,70%	97,50%
161	3	1	34,60%	17,99%	12,50%	95,80%

ITK: Inibidor de tirosino quinase (imatinibe, nilotinibe ou dasatinibe).

A sobrevida média livre de hipotireoidismo dos pacientes com LMC em uso de ITK é 141,2 meses (11,77 anos), e a sobrevida mediana é 161 meses (13,42 anos), que corresponde ao tempo em que a probabilidade de sobrevivência livre da doença é igual a 50%.

**Gráfico 1** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo dos pacientes submetidos a ITK.



ITK: Inibidor de tirosino quinase (imatinibe, nilotinibe ou dasatinibe).

Ao comparar a resposta molecular, vemos que 80% dos pacientes com hipotireoidismo tiveram resposta molecular, sendo metade com resposta molecular completa (RMC) e metade com resposta molecular maior (RMM). No grupo de eutireoidismo observou-se que 70% dos pacientes tiveram alguma resposta molecular ao tratamento, a maioria com RMC. Ao comparar o perfil dos grupos, não se observou diferença estatística entre os grupos ( $p=0,821$ ) (tabela 8).

**Tabela 8.** Comparação entre o perfil de resposta molecular em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.

Resposta Molecular	Eutireoidismo	Hipotireoidismo	Total	Valor $p^a$
RMC	18 (42,86%)	4 (40%)	22 (42,31%)	0,821
RMM	12 (28,57%)	4 (40%)	16 (30,77%)	
SRM	12 (28,57%)	2 (20%)	14 (26,92%)	
<b>Total</b>	<b>42 (100%)</b>	<b>10 (100%)</b>	<b>52 (100%)</b>	

a. Valor  $p$  teste exato de Fisher. Resultados apresentados em N (%). RMC: Resposta molecular completa. RMM: Resposta molecular maior. SRM: Sem resposta molecular.

Como dito anteriormente, queremos comparar esse tempo sem desenvolver hipotireoidismo com outros fatores, a resposta molecular, e os escores de risco. Ao

comparar a sobrevida livre de hipotireoidismo com a resposta molecular da LMC, observa-se que o primeiro evento de hipotireoidismo de quem teve RMC foi apenas após 81 meses de tratamento, já quem teve RMM e sem resposta tiveram os primeiros casos do distúrbio em 2 e 15 meses após início do tratamento, respectivamente (Tabela 9; Gráfico 2).

Avaliando o gráfico de sobrevida, podemos visualizar o tempo médio e mediano (nos casos em que a curva chega a pelo menos 50% de probabilidade), e notamos que os valores são bem próximos e em diversos pontos há a interseção das curvas, esse é um forte indicador que não existe diferença significativa entre as curvas de probabilidade (gráfico 2).

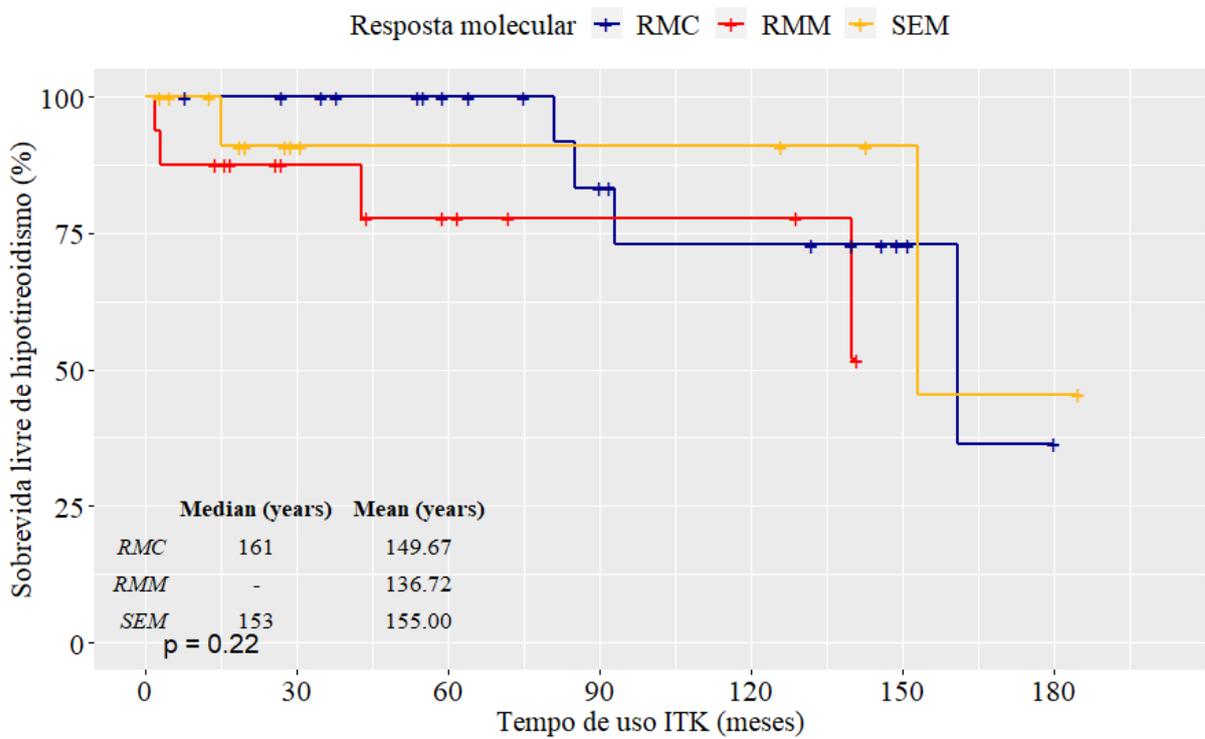
Para comprovar a diferença das curvas, foi aplicado o teste de log-rank e encontramos valor  $p=0,22$ , indicando que a resposta molecular não causa impacto no tempo livre de hipotireoidismo nos pacientes com LMC em tratamento com ITK (tabela 9).

**Tabela 9** - Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com a resposta molecular.

Tempo (em meses)	nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
<i>RMC</i>						
81	12	1	91,70%	7,98%	77,30%	100%
85	11	1	83,30%	10,76%	64,70%	100%
93	8	1	72,90%	13,55%	50,70%	100%
161	2	1	36,50%	26,66%	8,70%	100%
<i>RMM</i>						
2	16	1	93,80%	6,05%	82,60%	100%
3	15	1	87,50%	8,27%	72,70%	100%
43	9	1	77,80%	11,75%	57,80%	100%
140	3	1	51,90%	22,57%	22,10%	100%
<i>SEM</i>						
15	11	1	90,90%	8,67%	75,40%	100%
153	2	1	45,50%	32,43%	11,20%	100%

RMC: Resposta molecular completa. RMM: Resposta molecular maior. SRM: Sem resposta molecular.

**Gráfico 2** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo de acordo com a resposta molecular.



RMC: Resposta molecular completa. RMM: Resposta molecular maior. SRM: Sem resposta molecular.

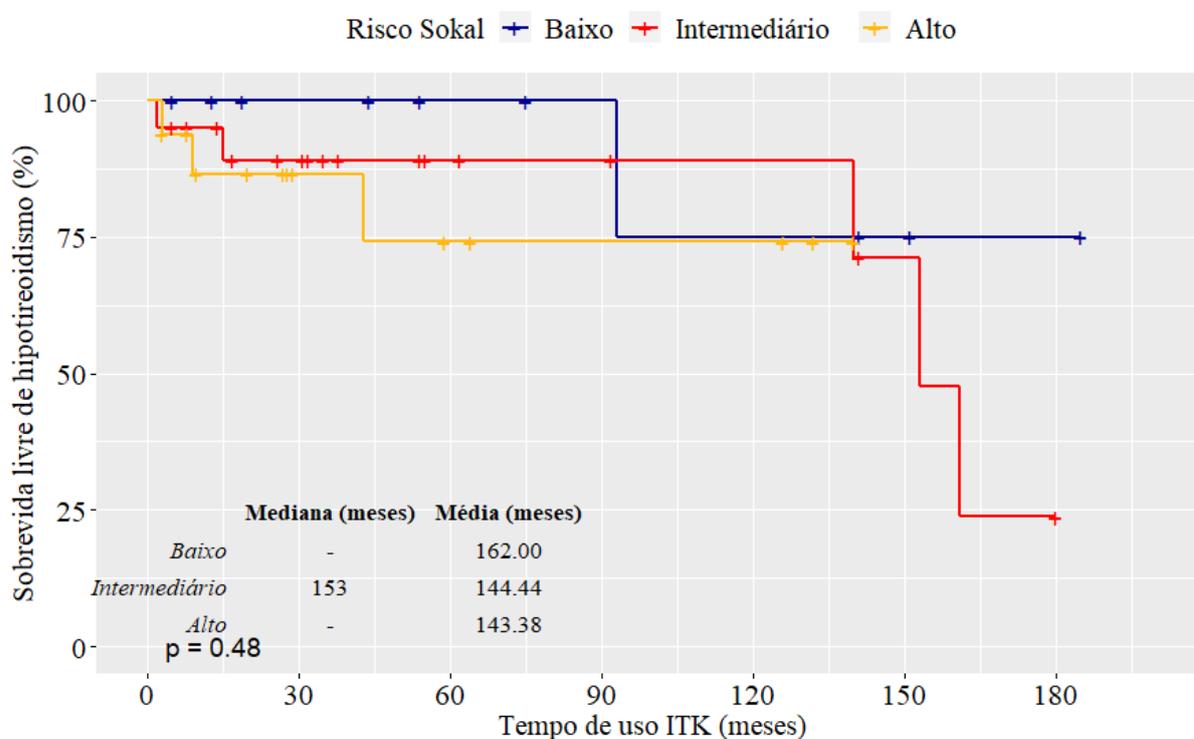
Avaliando a sobrevida estratificada pelo escore de risco Sokal, na Tabela 10 e Gráfico 3, percebemos que dos pacientes baixo risco, só foi registrado caso de hipotireoidismo após 93 meses de tratamento, porém é muito pequena a quantidade de pacientes classificados com esse risco, por isso a curva fica com apenas 1 evento.

O teste de significância mostra que não existe diferença entre as curvas, logo concluímos que o risco Sokal não causa diferença significativa no tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo.

**Tabela 10** - Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco Sokal.

Tempo (em meses)	Nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
<i>Baixo risco</i>						
93	4	1	75,00%	21,70%	42,60%	100%
<i>Risco intermediário</i>						
2	20	1	95,00%	4,87%	85,91%	100%
15	16	1	89,10%	7,34%	75,77%	100%
140	5	1	71,30%	16,98%	44,66%	100%
153	3	1	47,50%	22,45%	18,81%	100%
161	2	1	23,70%	20,20%	4,48%	100%
<i>Alto risco</i>						
3	16	1	93,80%	6,05%	82,60%	100%
9	13	1	86,50%	8,90%	70,70%	100%
43	7	1	74,20%	13,75%	51,60%	100%

**Gráfico 3** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo de acordo com o escore de risco Sokal.



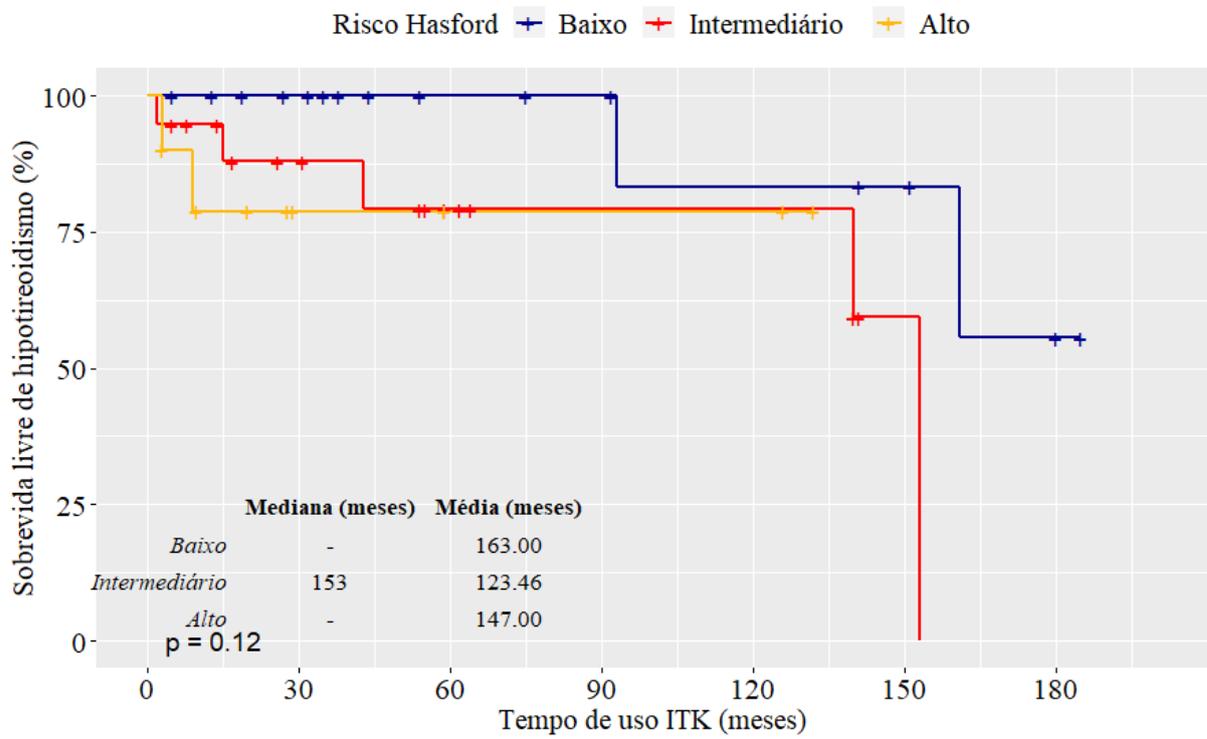
ITK: Inibidor de tirosino quinase.

De forma semelhante fizemos para os escores de risco Hasford (tabela 10; gráfico 4), Eutos (tabela 11; gráfico 5) e ELTS (tabela 12; gráfico 6), porém, em nenhum caso foram identificadas diferenças significativas, indicando que os escores de prognóstico da LMC não têm interferência na probabilidade de desenvolvimento de hipotireoidismo em pacientes em tratamento com ITK.

**Tabela 11** - Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o risco Hasford.

Tempo (em meses)	nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
<i>Baixo risco</i>						
93	6	1	83,30%	15,20%	58,30%	100%
161	3	1	55,60%	24,80%	23,10%	100%
<i>Risco intermediário</i>						
2	19	1	94,70%	5,12%	85,20%	100%
15	14	1	88,00%	8,07%	73,50%	100%
43	10	1	79,20%	11,06%	60,20%	100%
140	4	1	59,40%	19,04%	31,70%	100%
153	1	1	0%	-	-	-
<i>Alto risco</i>						
3	10	1	90,00%	9,49%	73,20%	100%
9	8	1	78,70%	13,40%	56,40%	100%

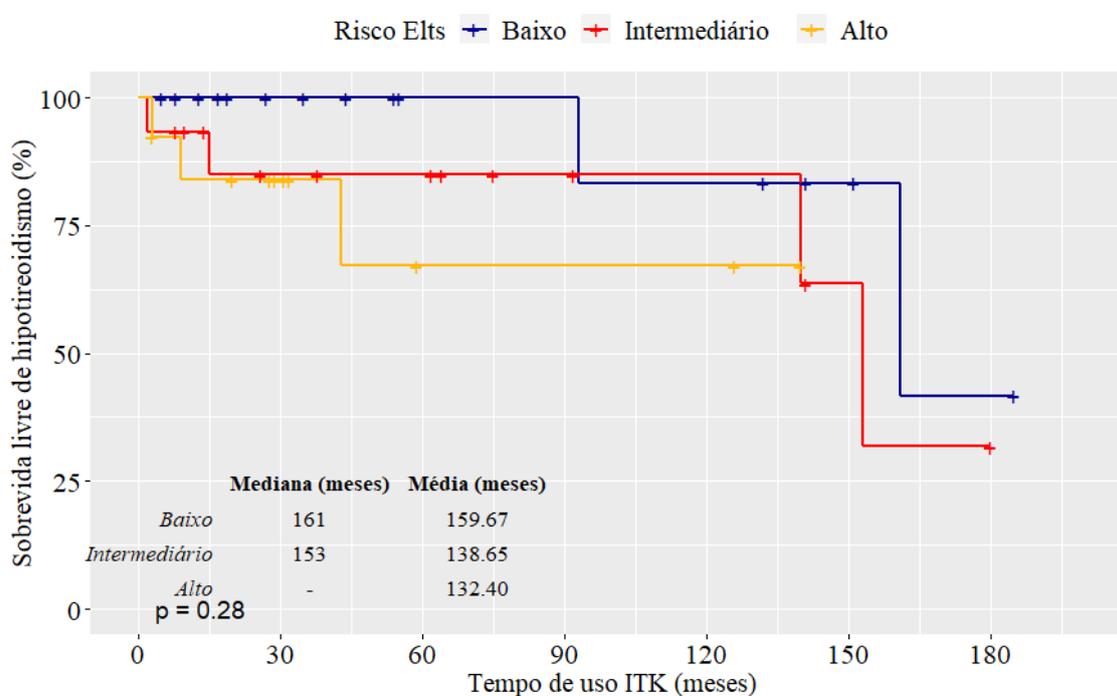
**Gráfico 4** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em uso de ITK de acordo com o escore de risco Hasford.



**Tabela 12** - Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o risco Eutos.

Tempo (em meses)	nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
<i>Baixo risco</i>						
93	6	1	83,30%	15,20%	58,27%	100%
161	2	1	41,70%	30,40%	9,96%	100%
<i>Risco intermediário</i>						
2	15	1	93,30%	6,44%	81,50%	100%
15	11	1	84,80%	9,99%	67,40%	100%
140	4	1	63,60%	19,84%	34,50%	100%
153	2	1	31,80%	24,59%	7,00%	100%
<i>Alto risco</i>						
3	13	1	92,30%	7,39%	78,90%	100%
9	11	1	83,90%	10,45%	65,70%	100%
43	5	1	67,10%	17,18%	40,70%	100%

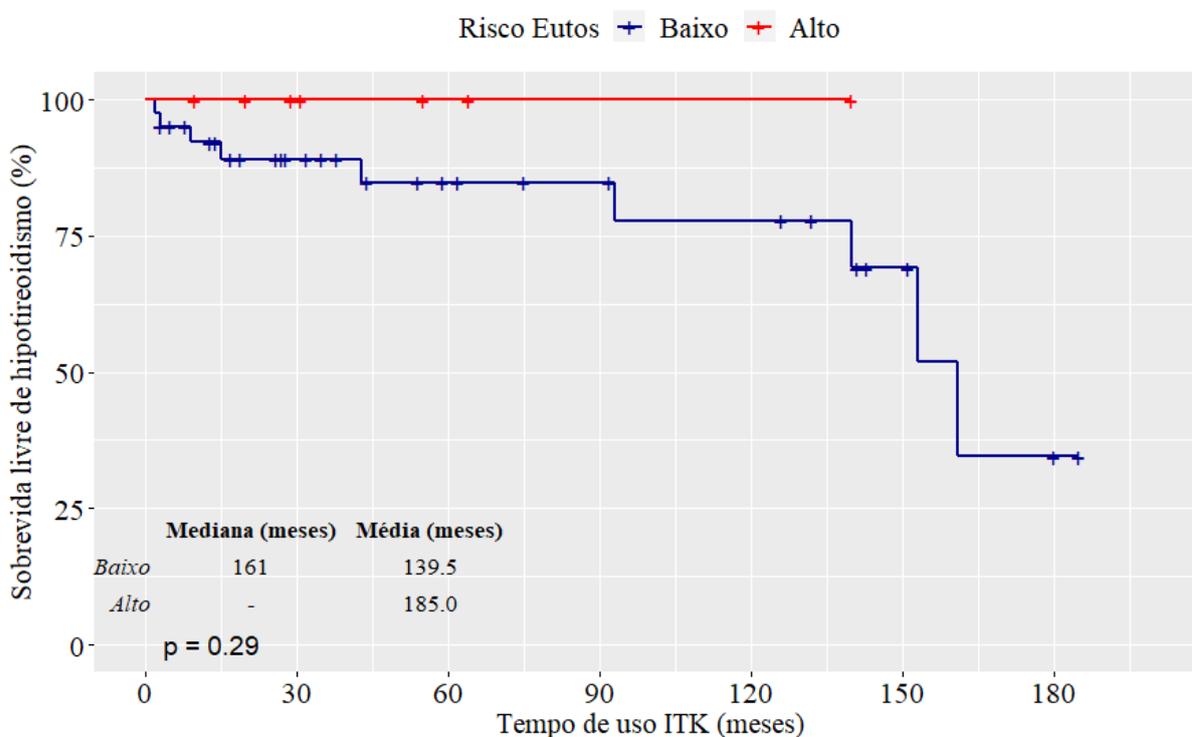
**Gráfico 5** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco Eutos.



**Tabela 13** - Tempo de sobrevida, número em risco, eventos e probabilidade de sobrevida livre de eventos dos pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco ELTS.

Tempo (em meses)	nº em risco	nº de eventos	Probabilidade de sobrevivência	Erro Padrão	IC 95% (inferior)	IC 95% (superior)
<i>Baixo risco</i>						
2	40	1	97,50%	2,47%	92,80%	100%
3	39	1	95,00%	3,45%	88,50%	100%
9	33	1	92,10%	4,38%	83,90%	100%
15	30	1	89,10%	5,20%	79,40%	99,90%
43	21	1	84,80%	6,46%	73,10%	98,50%
93	12	1	77,70%	8,99%	62,00%	97,50%
140	9	1	69,10%	11,41%	50,00%	95,50%
153	4	1	51,80%	17,24%	27,00%	99,50%
161	3	1	34,60%	18,19%	12,30%	97,00%

**Gráfico 6** - Tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo em pacientes com LMC em tratamento com ITK de acordo com o escore de risco ELTS.



### 4.3 Angiogênese

Para avaliar a angiogênese, utilizou-se a dosagem sérica de VEGF e a expressão dos genes *VEGF-A* e do fator de indutor de hipóxia *HIF-1α*. Ao comparar com o grupo controle, observamos maiores níveis de VEGF sérico e de expressão de *HIF-1α* em pacientes com LMC (tabela 13).

**Tabela 14** – Avaliação dos marcadores de angiogênese em pacientes com LMC vs. grupo controle.

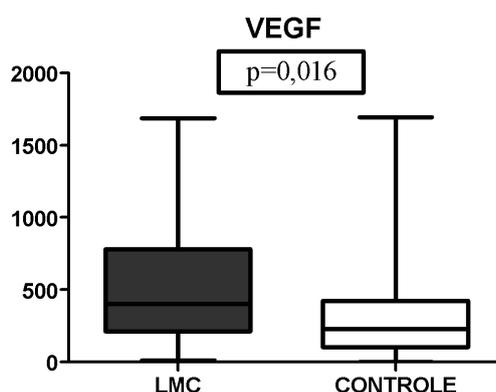
Marcadores	LMC	Controle	Valor p <sup>a</sup>
VEGF sérico	403,2 (567,6)	231,2 (320,8)	0,016*
<i>VEGF-A</i>	743,3 (1167,4)	1493 (1480,6)	0,202
<i>HIF-1α</i>	12,2 (16,9)	7,4 (6,4)	0,0068*

<sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney. Valores em Mediana (Intervalo Interquartil). Valor de p: diferença entre as medianas. \*Valor significativo p<0,05.

#### 4.3.1 Dosagem de VEGF sérico

Observamos maiores níveis de VEGF sérico na LMC quando comparamos com os pacientes do grupo controle (p=0,016; gráfico 7).

**Gráfico 7.** Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase e Grupo controle.



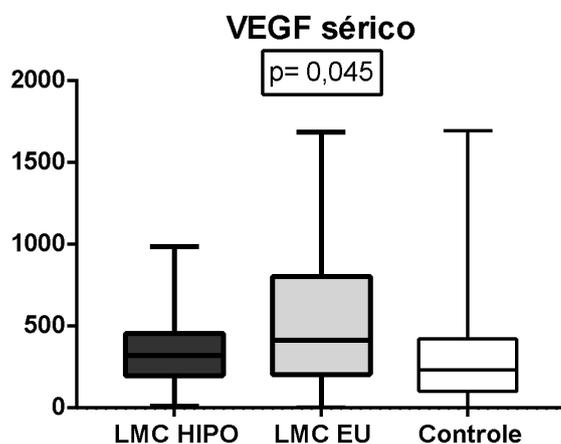
LMC: Leucemia mieloide crônica; Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo p<0,05.

Quando avaliamos a diferença entre os níveis de VEGF entre os grupos de pacientes com LMC com hipotireoidismo subclínico, grupo de pacientes com LMC

eutireoideus e grupo controle, observamos diferença entre os grupos, com maiores níveis nos pacientes com LMC e *status* tireoidiano normal ( $p=0,045$ ; gráfico 8).

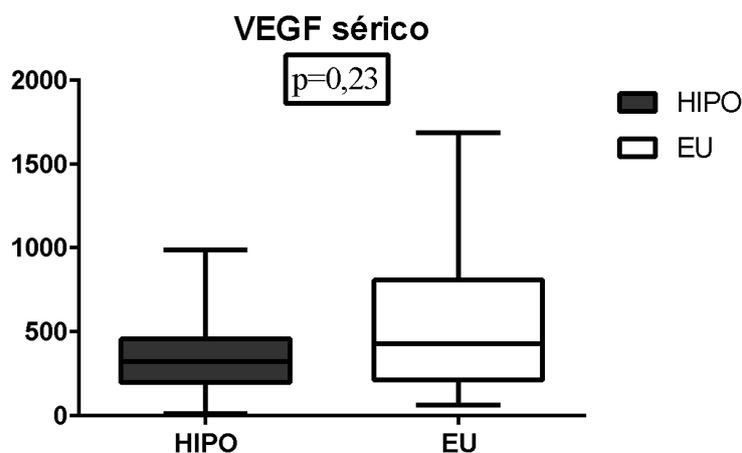
**Gráfico 8.** Avaliação dos níveis séricos de VEGF entre os grupos LMC com hipotireoidismo, LMC eutireoideu e grupo controle.



LMC HIPO: pacientes com LMC em hipotireoidismo subclínico; LMC EU: pacientes com LMC em eutireoidismo; Controle: grupo controle, sem LMC. \*Valor significativo  $p<0,05$ .

No entanto, ao compararmos os níveis séricos de VEGF entre o grupo com LMC e hipotireoidismo e o grupo com LMC eutireoideu, não se observou diferença entre os mesmos ( $p=0,23$ ; gráfico 9).

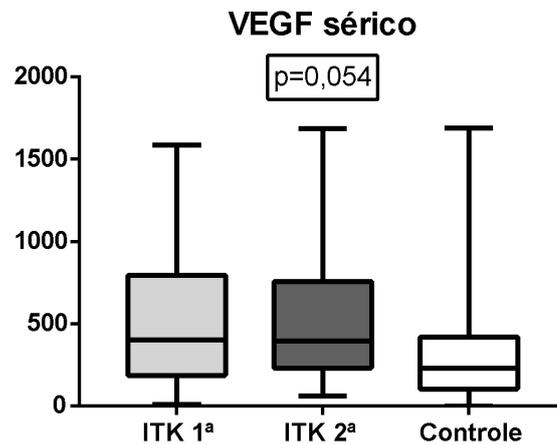
**Gráfico 9.** Níveis séricos de VEGF na LMC dividido de acordo com o perfil tireoidiano.



HIPO: pacientes com LMC em hipotireoidismo; EU: pacientes com LMC em eutireoidismo; \*Valor significativo  $p<0,05$ .

Ao se analisar a diferença entre os níveis séricos de VEGF-A em pacientes com LMC de acordo com a geração de ITK utilizado, não se observou diferença entre os grupos (Gráfico 10).

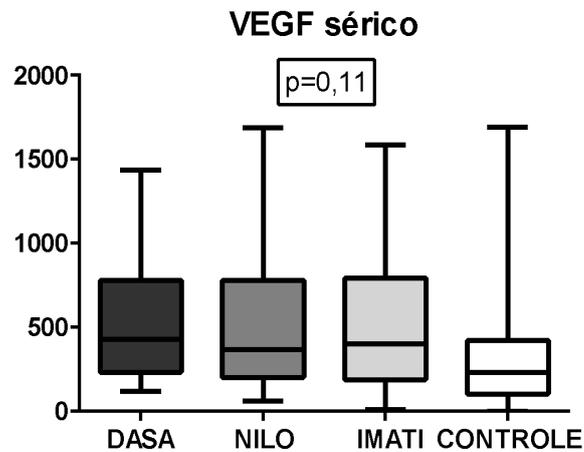
**Gráfico 10.** Níveis séricos de VEGF-A em pacientes com LMC de acordo com o uso de inibidor de tirosino quinase utilizado e com o grupo controle.



ITK 1ª: Inibidor de tirosino quinase de primeira geração (imatinibe); ITK 2ª: Inibidor de tirosino quinase de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe). \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

O mesmo ocorreu quando analisamos os níveis séricos de VEGF em relação ao tipo de ITK utilizado, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,11$ ; gráfico 11).

**Gráfico 11.** Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC de acordo com o tipo do inibidor de tirosino quinase utilizado.

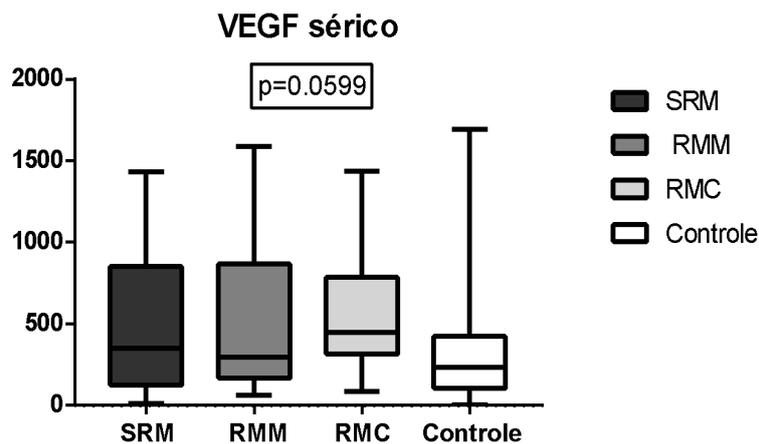


DASA: pacientes com LMC em uso de dasatinibe; NILO: pacientes com LMC em uso de nilotinibe; IMATI: pacientes com LMC em uso de imatinibe. Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo  $p < 0,05$ .

Ao avaliar os níveis de VEGF de acordo com a resposta molecular, não se observou diferença entre os grupos (gráfico 12).

**Gráfico 12.** Níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular ao uso dos ITKs e controle.

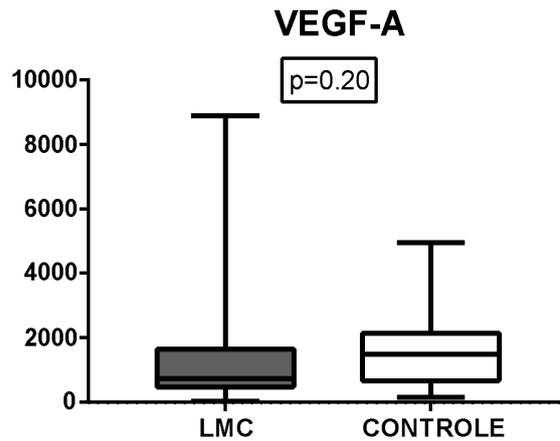


SRM: pacientes com LMC que não obtiveram resposta molecular; RMM: pacientes com LMC com Resposta Molecular Maior; RMC: pacientes com LMC com Resposta Molecular Completa; Controle: grupo controle, sem LMC. \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

### 4.3.2 Expressão gênica de VEGF-A

Como já dito anteriormente, ao avaliar a expressão gênica de *VEGF-A* em pacientes com LMC em uso de ITK, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,20$ ; gráfico 13).

**Gráfico 13.** Expressão de *VEGF-A* em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase e Grupo controle.



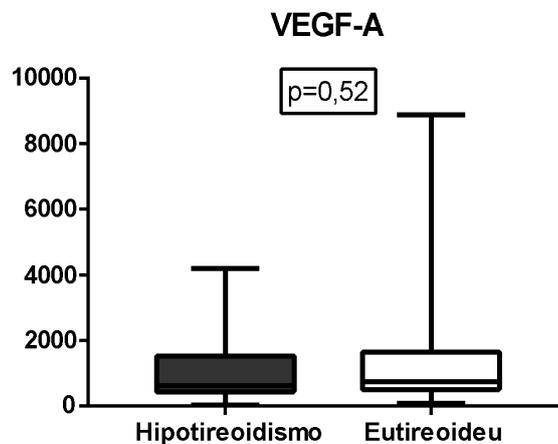
LMC: Leucemia

mieloide crônica; Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo  $p<0,05$ .

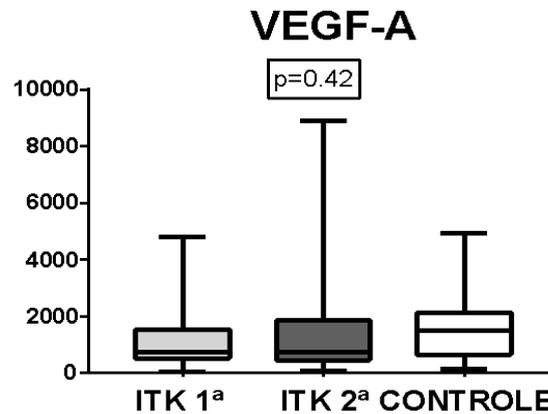
Ao avaliar a expressão gênica de *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,52$ ; gráfico 14).

**Gráfico 14.** Expressão de *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.



O mesmo ocorre ao se analisar a diferença entre a expressão gênica de VEGF-A em pacientes com LMC de acordo com a geração do ITK utilizado ( $p=0,42$ ; gráfico 15).

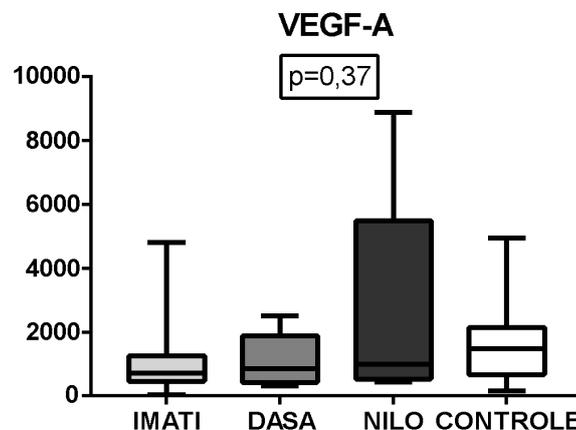
**Gráfico 15.** Expressão de *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com a geração do inibidor de tirosino quinase utilizado.



ITK 1ª: Inibidor de tirosino quinase de primeira geração (imatinibe); ITK 2ª: Inibidor de tirosino quinase de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe). \*Valor significativo  $p<0,05$ .

O mesmo ocorre quando analisamos a expressão do gene *VEGF-A* em relação ao tipo de ITK utilizado, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,37$ ; gráfico 16).

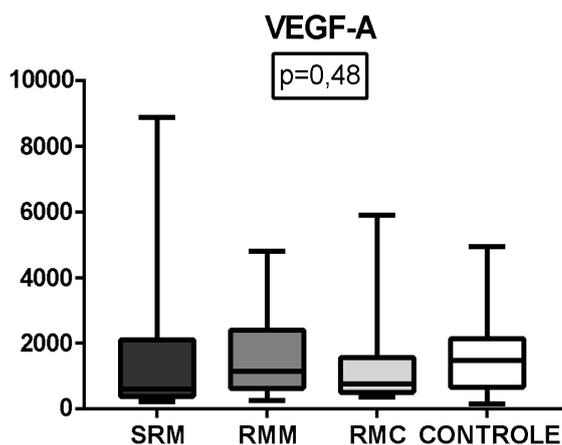
**Gráfico 16.** Expressão do gene *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com o tipo de inibidor de tirosino quinase utilizado.



DASA: pacientes com LMC em uso de dasatinibe; NILO: pacientes com LMC em uso de nilotinibe; IMATI: pacientes com LMC em uso de imatinibe. Controle: grupo controle, sem LMC. \*Valor significativo  $p<0,05$ .

Ao avaliar a expressão do gene *VEGF-A* de acordo com a resposta molecular, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,48$ ; gráfico 17).

**Gráfico 17.** a expressão do gene *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular.



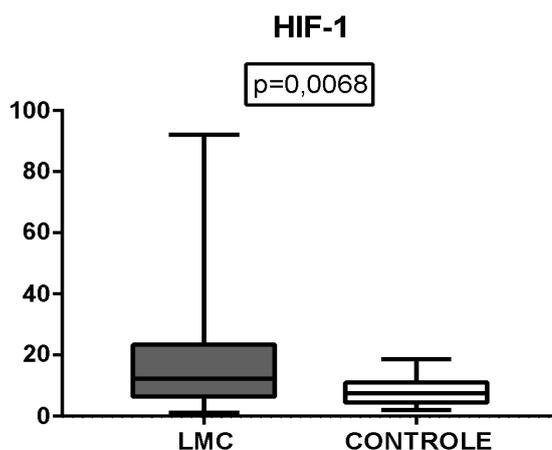
SRM: pacientes com LMC que não obtiveram resposta molecular; RMM: pacientes com LMC com Resposta Molecular Maior; RMC: pacientes com LMC com Resposta Molecular Completa; Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo  $p<0,05$ .

#### 4.3.3. Expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*

Ao analisar a expressão gênica do fator indutor de hipóxia tipo 1 (*HIF-1 $\alpha$* ), em pacientes com LMC e comparar com o grupo controle, observou-se maior expressão gênica no grupo com LMC ( $p=0,0068$ ; gráfico 18).

**Gráfico 18.** Expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase vs. Grupo controle.

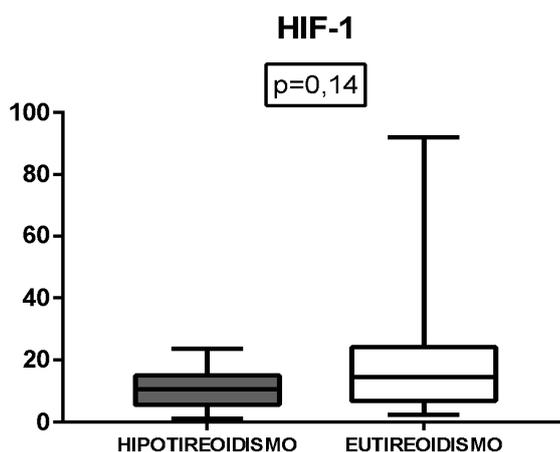


LMC: Leucemia mieloide crônica; Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo  $p < 0,05$ .

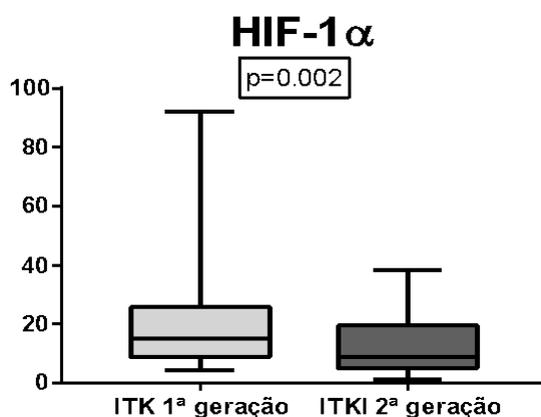
Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC em uso de ITK com hipotireoidismo subclínico e em eutireoidismo, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,14$ ; gráfico 19).

**Gráfico 19.** Expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC de acordo com o perfil tireoidiano.



Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC e comparar com tipo de ITK utilizado (primeira vs. segunda geração), observou-se que os pacientes em uso de ITK de primeira geração apresentavam maior expressão gênica ( $p=0,002$ ; gráfico 20).

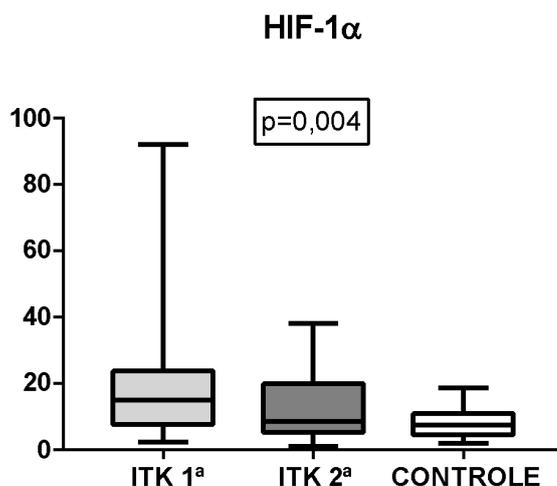
**Gráfico 20.** Expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC de acordo com o inibidor de tirosino quinase utilizado.



ITK 1ª: Inibidor de tirosino quinase de primeira geração (imatinibe); ITK 2ª: Inibidor de tirosino quinase de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe). \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC e comparar com tipo de ITK utilizado (primeira geração; segunda geração; grupo controle), observou-se que os pacientes em uso de ITK de primeira geração apresentavam maior expressão gênica, seguido do grupo com LMC em uso de ITK de segunda geração, com o grupo controle apresentando menor expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  ( $p=0,004$ ; gráfico 21).

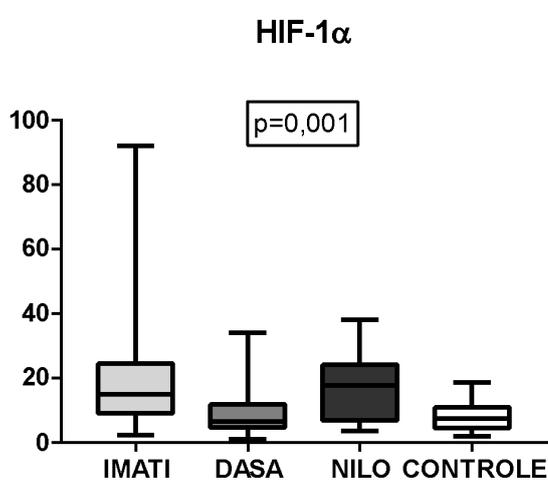
**Gráfico 21.** Expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC de acordo com o inibidor de tirosino quinase utilizado.



ITK 1ª: Inibidor de tirosino quinase de primeira geração (imatinibe); ITK 2ª: Inibidor de tirosino quinase de segunda geração (nilotinibe e dasatinibe). \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

O mesmo ocorre ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1α* em pacientes com LMC variava de acordo com o tipo de ITK utilizado, observando-se que os pacientes em uso de nilotinibe apresentavam maior mediana de expressão gênica, seguido do grupo em uso de imatinibe. O grupo em uso de dasatinibe e o grupo controle apresentaram menor expressão gênica de *HIF-1α* ( $p=0,001$ ; gráfico 22).

**Gráfico 22.** Expressão do gene *HIF-1α* em pacientes com LMC de acordo com o tipo de inibidor de tirosino quinase utilizado.

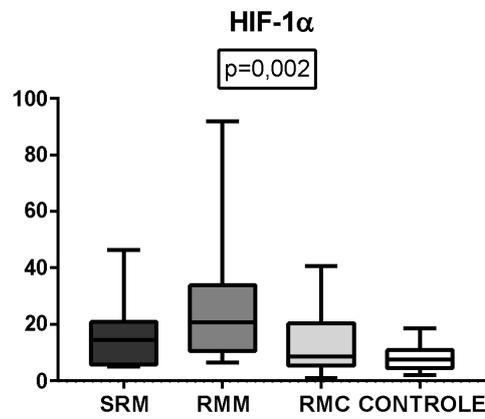


DASA: pacientes com LMC em uso de dasatinibe; NILO: pacientes com LMC em uso de nilotinibe; IMATI: pacientes com LMC em uso de imatinibe. Controle: grupo controle, sem LMC.

\*Valor significativo  $p<0,05$ .

Ao avaliar a expressão do gene *HIF-1α* de acordo com a resposta molecular, observou-se que os pacientes com LMC em RMM apresentavam maior expressão gênica de *HIF-1α*, seguido dos pacientes sem resposta molecular (SRM), com RMC e grupo controle ( $p=0,002$ ; gráfico 23).

**Gráfico 23.** Expressão de HIF em pacientes com LMC de acordo com a resposta molecular.



SRM: pacientes com LMC que não obtiveram resposta molecular; RMM: pacientes com LMC com Resposta Molecular Maior; RMC: pacientes com LMC com Resposta Molecular Completa; Controle: grupo controle, sem LMC. \*Valor significativo  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou avaliar a ocorrência de hipotireoidismo em 60 pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase. Neste, observou-se uma frequência de hipotireoidismo subclínico em 20% dos pacientes com LMC em uso de inibidores de tirosino quinase, apresentando correlação positiva com o tempo de diagnóstico de LMC.

A média de idade dos pacientes do nosso estudo foi  $49,4 \pm 14,94$  anos, apresentando uma relação de homens/ mulheres de 1,3 casos, esses dados corroboram com o perfil clássico de diagnóstico da LMC, que normalmente ocorre em adultos de meia idade e apresenta uma leve predominância do sexo masculino (Höglund, Sandin et al. 2015).

Quanto às características clínicas e laboratoriais dos pacientes ao diagnóstico, no nosso estudo observou-se que os pacientes apresentavam anemia, leucocitose e trombocitose, além de hepatomegalia e esplenomegalia. Ademais, o diagnóstico ocorreu sobretudo em fase crônica, sendo essas características as presentes no cenário clínico mais comum da LMC ao diagnóstico (Jabbour and Kantarjian 2014).

Com o objetivo de estimar o risco do paciente com LMC, a doença é estratificada como risco baixo, intermediário ou alto. Essa estratificação considera critérios clínicos e laboratoriais e pode ser calculada pelos escores SOKAL, EUTOS, ELTS e HASFORD. Alguns estudos demonstram a predominância de pacientes com LMC com escores de baixo risco ao diagnóstico (Hoffmann, Baccarani et al. 2015, Ben Lakhal, Ghedira et al. 2018). Diferente do exposto, no nosso estudo os pacientes normalmente apresentaram escore de risco intermediário ao diagnóstico e o tempo de doença média foi de 71,5 meses. Esse fato pode se justificar pelo número de variáveis de fatores que podem interferir na estratificação do risco da doença, como população estudada, sugerindo interferência genética, ou diferenças no tempo decorrido para realizar o diagnóstico.

Estudos demonstram que os pacientes com LMC apresentam diversas comorbidades, sendo as mais comuns hipertensão arterial, doença cardiovascular e diabetes (Hoffmann, Baccarani et al. 2015). Esses dados corroboram com o perfil dos pacientes do nosso estudo, em que as comorbidades mais frequentes em pacientes foram hipertensão arterial e diabetes.

Em relação à ocorrência de hipotireoidismo, estudos anteriores demonstraram a presença de hipotireoidismo em pacientes com LMC (KIM *et al.*, 2010; RODIA *et al.*, 2022). Na população geral a frequência de hipotireoidismo varia entre 0,2% e 5,3% na Europa (TAYLOR *et al.*, 2018). No cenário de pacientes com LMC em uso de ITK, esses dados aparecem substancialmente maiores, com frequência variando de 53% de 85% em estudos retrospectivos e de 36% a 71% em estudos prospectivos (KIM *et al.*, 2010; RODIA *et al.*, 2022). Em nosso estudo, a presença de hipotireoidismo subclínico ocorreu em 20% (12/60) dos pacientes diagnosticados com LMC. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado na Alemanha, onde 25% dos pacientes com LMC em uso de ITK de segunda geração apresentaram hipotireoidismo (KIM *et al.*, 2010). Por outro lado, observa-se estudo relatando frequência de 5,8% de casos de hipotireoidismo em pacientes com LMC em tratamento com ITK (RODIA *et al.*, 2022).

Alguns fatores estão relacionados ao desenvolvimento de hipotireoidismo, como sexo feminino, idade avançada (>65 anos), doenças autoimunes, além de alguns medicamentos, como amiodarona, INF-alfa e corticosteroides (CHARTER, 2017). Em nosso estudo, porém, os pacientes com hipotireoidismo subclínico apresentaram média de idade de  $49,10 \pm 21,34$  anos e a maioria (67%; N=8) pertence ao sexo masculino.

De acordo com o presente estudo, a maioria dos pacientes com LMC e com hipotireoidismo subclínico possuem escores de risco classificados como intermediário: Sokal (55%); Hasford (55%); Eutos (44%); já no grupo de pacientes eutireoideus, observou-se que a maioria apresentou escores baixos: Hasford (40,54%); Eutos (43,24%) e ELTS (82,05%) (tabela 4). Esse achado sugere que a presença de hipotireoidismo subclínico pode estar relacionado a um pior prognóstico em pacientes com LMC em tratamento com ITK. No entanto, não se observa diferença estatística na classificação de risco entre os grupos com hipotireoidismo e sem hipotireoidismo. Embora tenha se observado alterações nos hormônios tireoidianos em pacientes com LMC em uso de ITK, o impacto desse achado no prognóstico do paciente ainda permanece incerto. Há estudos prévios que sugerem que o hipotireoidismo estaria relacionado a um melhor prognóstico em pacientes que fazem uso de ITK, como um estudo realizado na Itália, onde os pacientes com LMC em uso com ITK que foram diagnosticados com hipotireoidismo de hashimoto apresentaram melhores respostas moleculares quando comparados ao grupo eutireoideu (RODIA *et al.*, 2022). Além disso, outro estudo observou que o hipotireoidismo estava relacionado a uma melhor sobrevida em pacientes em uso de ITK,

incluindo casos de tratamento de LMC, como de tumores sólidos (LECHNER *et al.*, 2018a).

No universo de pacientes com LMC e com hipotireoidismo, quando analisados quanto ao uso de ITK, observou-se que 50% dos pacientes estavam fazendo uso de Imatinibe (n=6) e com mediana de tempo de uso de medicamento de 49 meses, com IIQ de 72,75 meses. A média de uso de ITK nesses pacientes foi de  $65,41 \pm 61,92$  meses. Esses dados são semelhantes aos dados de um estudo recente publicado na Itália (RODIA *et al.*, 2022). Enquanto outro estudo demonstra que o hipotireoidismo ocorre mais frequentemente em pacientes com LMC em uso de ITK de segunda geração (PATEL *et al.*, 2020).

Nossos dados demonstraram a frequência de 20% de hipotireoidismo subclínico em pacientes com LMC em uso de ITK. Ademais, os níveis de TSH estão diretamente correlacionados ao tempo de doença ( $R=0,733$ ;  $p=0,01$ ), indicando que o TSH estaria elevado em pacientes com mais tempo de diagnóstico de LMC. Curiosamente, o mesmo ocorre ao analisar a correlação entre os níveis de TSH e o tempo de tratamento com hidroxiureia ( $R=0,875$ ;  $p<0,001$ ). Porém, não se observou correlação entre os níveis de TSH e o tempo de tratamento com ITK em pacientes com hipotireoidismo ( $p=0,07$ ). A presença de hipotireoidismo em pacientes que fazem uso de ITK tem sido relatada na literatura, tanto para o tratamento de tumores sólidos, como em pacientes com LMC (LIAO; LIU; SONG, 2021; PATEL *et al.*, 2020; TORINO *et al.*, 2013). A alta correlação entre os níveis de TSH e o tratamento com hidroxiureia relatada em nosso pode indicar que o tratamento prévio com a HU, e não com o ITK, estaria predispondo ao desenvolvimento do hipotireoidismo. O hipotireoidismo também já foi relatado em pacientes com anemia falciforme e em pacientes com talassemia em uso de HU (BAZI *et al.*, 2018; ELALFY *et al.*, 2019; ZEKAVAT *et al.*, 2014).

A fim de avaliar variáveis relacionadas ao tempo livre de hipotireoidismo, avaliamos a curva de sobrevivência de Kaplan Meier, que estima a probabilidade de sobrevida livre de evento, sendo considerado o hipotireoidismo como evento. Observa-se que o menor tempo para o desenvolvimento de hipotireoidismo ocorreu com apenas 2 meses após início do tratamento. No entanto, a probabilidade de os pacientes não desenvolverem hipotireoidismo em até 15 meses após o início do tratamento é bem alta (92,50%), isso sugere que o hipotireoidismo seja um efeito de longo prazo. Ademais, à

medida que o tempo de tratamento aumenta, a probabilidade de não desenvolver hipotireoidismo passa a se reduzir, de modo que após 153 meses, essa probabilidade baixa para 51,90%, e após 161 meses baixa para 34,60%.

Assim, observa-se que a sobrevida média livre de hipotireoidismo dos pacientes com LMC em uso de ITK é alta, com 141,2 meses (11,77 anos) de sobrevida média livre, com mediana de 161 meses (13,42 anos), que corresponde ao tempo em que a probabilidade de sobrevivência livre da doença é igual a 50%. Esse tempo de tratamento é considerado alto, uma vez que, embora o tratamento da LMC ainda seja recomendado por toda a vida, observa-se que a recomendação de uso dos ITKs para o tratamento da LMC iniciou em 2001, assim, um efeito com mais de 10 anos de tratamento é considerado como um efeito a longo prazo (KANTARJIAN *et al.*, 2003).

Um dos maiores questionamentos na prática clínica é se a ocorrência de hipotireoidismo nos pacientes com LMC em uso de ITK representa algum impacto no prognóstico desses pacientes. Assim, ao comparar o perfil de resposta molecular de acordo com o perfil tireoidiano, vemos que 80% dos pacientes com hipotireoidismo tiveram resposta molecular, sendo metade com resposta molecular completa (RMC) e metade com resposta molecular maior (RMM). No grupo de eutireoidismo observou-se que 70% dos pacientes tiveram alguma resposta molecular ao tratamento, a maioria com RMC. Esse dado demonstra que o hipotireoidismo não impacta no perfil de resposta molecular dos pacientes com LMC em uso de ITK ( $p=0,821$ ).

Ademais, comparamos a ocorrência de hipotireoidismo de acordo com os escores de risco para LMC: SOKAL, Hasford, Eutos e ELTS; porém, em nenhum caso foram identificadas diferenças entre os grupos, indicando que os escores de prognóstico da LMC não têm interferência na probabilidade de desenvolvimento de hipotireoidismo em pacientes em tratamento com ITK. Esses dados sugerem que o hipotireoidismo não gera impacto no tratamento da LMC, podendo estar relacionado a outros fatores, mas não à gravidade da doença. Esses resultados vão de encontro com os estudos publicados na literatura, que demonstraram que o hipotireoidismo estava relacionado com melhor prognóstico em pacientes em uso de ITK (LECHNER *et al.*, 2018a; PANI *et al.*, 2016).

Alguns inibidores de tirosino quinase agem especificamente inibindo a angiogênese por meio da inibição direta de receptores VEGF, como ponatinibe. Nesses

casos, observa-se elevação do TSH em aproximadamente 36% dos casos (ARORA AND SCHOLAR, 2005; KRAUSE AND VAN ETTEN, 2005). Além disso, os ITK podem inibir VEGFR e/ou PDGFR por toxicidade celular direta.

No nosso estudo verificamos maiores níveis de marcadores de angiogênese na LMC quando comparamos com o grupo controle. Quando avaliamos a diferença entre os níveis de VEGF entre os grupos de pacientes com LMC que tinham hipotireoidismo, grupo de pacientes com LMC eutireoideus e grupo controle, observamos diferença entre os grupos, com maiores níveis nos pacientes com LMC e status tireoidiano normal ( $p=0,045$ ). Esse achado corrobora com estudos prévios, os quais relataram maiores níveis séricos de VEGF em pacientes com LMC ao comparar com o grupo controle (AGUAYO *et al.*, 2000; KOTRU *et al.*, 2022; VERSTOVSEK *et al.*, 2002). Em um estudo foi observado maiores níveis séricos de VEGF-A em diferentes tipos de leucemias; dentre elas, os níveis foram maiores na LMC (AGUAYO *et al.*, 2000). Assim, estima-se que haja envolvimento desse marcador na leucemogênese, em especial no contexto da LMC.

A fim de avaliar se a angiogênese apresentava associação com o desenvolvimento do hipotireoidismo, comparamos os níveis séricos de VEGF entre o grupo com LMC e hipotireoidismo e o grupo com LMC eutireoideu, no entanto, não se observou diferença entre eles ( $p=0,23$ ).

Quando analisamos os níveis séricos de VEGF em relação à geração de ITK utilizada, não houve diferença estatística nos pacientes com LMC em uso de inibidores de primeira ou segunda geração ( $p=0,054$ ; gráfico 10). O mesmo ocorre quando analisamos os níveis séricos de VEGF em relação ao tipo de ITK utilizado, não havendo diferença estatística entre os grupos, independente do medicamento ( $p=0,11$ ). Ao avaliar os níveis de VEGF de acordo com a resposta molecular, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,059$ ). Estudos prévios demonstraram que os níveis de VEGF-A estão relacionados a um pior prognóstico da LMC, como correlação positiva com o escore Hasford (AGUAYO *et al.*, 2000; KOTRU *et al.*, 2022)

No entanto, ao avaliar a expressão gênica de *VEGF-A* em pacientes com LMC em uso de ITK, não se observou diferença entre os grupos ( $p= 0,20$ ). O mesmo ocorre ao avaliar a expressão gênica de *VEGF-A* em pacientes com LMC de acordo com as diferentes variáveis analisadas no presente estudo, como o perfil tireoidiano ( $p=0,52$ ); a geração do ITK utilizado ( $p=0,42$ ); o tipo de ITK utilizado ( $p=0,37$ ) e a resposta

molecular ( $p=0,48$ ), indicando que o gene *VEGF-A* não está com expressão aumentada no contexto da LMC, muito embora tenhamos observado níveis séricos de VEGF-A aumentados. Esse dado pode ser justificado pelo tipo de amostra analisado, uma vez que o *VEGF-A* pode ser expresso por diferentes células, inclusive por células tireoidianas, e no presente estudo utilizamos sangue total (MASOOD *et al.*, 2001). Ademais, observou-se aumento da expressão gênica de *VEGF-A* apenas em células mielóides imaturas na LMC (KRAUTH *et al.*, 2004). Em nosso estudo a maior parte dos pacientes encontrava-se em remissão hematológica, assim, a quantidade de granulócitos imaturos era ínfima.

Ao analisar a expressão gênica do fator indutor de hipóxia tipo 1 (*HIF-1 $\alpha$* ), em pacientes com LMC e comparar com o grupo controle, observou-se maior expressão gênica no grupo com LMC ( $p=0,0068$ ).

Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC em uso de ITK com hipotireoidismo e sem hipotireoidismo, não se observou diferença entre os grupos ( $p=0,14$ ). Não há estudos publicados na literatura investigando marcadores de angiogênese em pacientes com LMC e hipotireoidismo simultaneamente, no entanto, observou-se maior expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com disfunção tireoidiana (CRAPS *et al.*, 2021). Ademais, em um estudo pré-clínico observou-se que em situações de hipóxia ocorre aumento da expressão de *HIF-1 $\alpha$* , e que o mesmo está relacionado ao aumento da DIO3, interferindo no metabolismo tireoidiano, com redução de hormônio tireoidiano ativo (SIMONIDES *et al.*, 2008). Como já explicado anteriormente, uma vez que os hormônios tireoidianos possuem uma relação log-linear inversa, menores níveis de HT induzem o aumento dos níveis séricos de TSH, o que poderia causar hipotireoidismo a longo prazo.

Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC e comparar com tipo de ITK utilizado, observou-se que os pacientes em uso de ITK de primeira geração apresentavam maior expressão gênica ( $p=0,002$ ). Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC e comparar com tipo de ITK utilizado, observou-se que os pacientes em uso de ITK de primeira geração apresentavam maior expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$* , seguido do grupo com LMC em uso de ITK de segunda geração, com o grupo controle apresentando menor expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  ( $p=0,004$ ). Esses dados corroboram com estudos prévios, os quais demonstraram maior expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em leucemias. Além disso, o aumento da expressão de *HIF-1 $\alpha$*

estava relacionada à sobrevivência de células tronco leucêmicas na LMC (MAYERHOFER *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2012).

Ao avaliar se a expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com LMC variava de acordo com o tipo de ITK utilizado, observa-se que os pacientes em uso de nilotinibe apresentavam maior mediana de expressão gênica, seguido do grupo em uso de imatinibe. O grupo em uso de dasatinibe e o grupo controle apresentaram menor expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  (p=0,001).

Ao avaliar a expressão do gene *HIF-1 $\alpha$*  de acordo com a resposta molecular, observou-se que os pacientes com LMC em RMC apresentaram menor expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  (p=0,002; gráfico 23). Achado que corrobora com o exposto anteriormente, uma vez que se espera menor expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes que se apresentem em remissão molecular, apresentando uma quantidade indetectável de células *BCR-ABL1* positivas. No entanto, esse raciocínio não se reproduz em nossos dados ao analisarmos os pacientes com quantidades detectáveis de células *BCR-ABL1*, pois observamos maior expressão de *HIF-1 $\alpha$*  em pacientes com RMM que em pacientes que não atingiram a resposta molecular (ZHANG *et al.*, 2012).

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo, observamos a presença de hipotireoidismo em 20% dos pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosino-quinase, o qual apresentou alta correlação positiva com o tempo de doença. Assim, nossos dados demonstram que o hipotireoidismo ocorre com frequência superior à demonstrada pela literatura no público geral. Esse evento não teve correlação com os marcadores de angiogênese nem com as variáveis clínicas da LMC (escores de prognóstico, tipo de inibidor de tirosino quinase utilizado e resposta molecular).

Ao avaliar o perfil dos pacientes com LMC no diagnóstico, nossos dados demonstram que a maioria teve diagnóstico na fase crônica da doença e apresentou um quadro de anemia, leucocitose e trombocitose, além de hepato e esplenomegalia, sendo que esse perfil não variou de acordo com a presença do hipotireoidismo.

Ao estudar o hipotireoidismo em grupos estratificados pelo tipo de inibidor de tirosino-quinase (Imatinibe, Nilotinibe e Dasatinibe) e pelas variáveis clínicas da LMC, não se observou diferença entre os grupos.

Ademais, ao estudar o tempo de sobrevida livre de hipotireoidismo, observou-se que esse evento está relacionado a um tratamento de longo prazo, não sendo associado aos escores de risco da LMC e nem à resposta molecular.

Nosso estudo demonstrou, ainda, que os níveis séricos de VEGF e expressão gênica de *HIF-1 $\alpha$*  dos pacientes com LMC estavam superiores aos do grupo controle, indicando envolvimento desses marcadores na leucemogênese da LMC. No entanto, não houve associação do hipotireoidismo com os níveis séricos de VEGF e expressão gênica de *VEGF-A* e *HIF-1 $\alpha$* ;

Por fim, conclui-se que o hipotireoidismo ocorre em frequência considerável na LMC, não sendo associado aos fatores de prognóstico da doença, mas sim ao tempo de diagnóstico. Isso sugere que o hipotireoidismo não tenha impacto clínico sobre o curso da LMC. Ademais, o mecanismo de desenvolvimento do hipotireoidismo não está relacionado à angiogênese, a qual parece ser intrínseca do quadro de leucemogênese *per si*. Nesse contexto, estudos de *follow-up* a longo prazo são necessários para esclarecer melhor o impacto do hipotireoidismo em pacientes com LMC.

## APÊNDICE A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO TIREOIDIANA EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM USO DE INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE E ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS.

**Pesquisador:** LAIS FARIAS MASULLO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 03852918.0.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.066.346

#### Apresentação do Projeto:

O estudo será do tipo observacional prospectivo com a finalidade de avaliar a presença de disfunção tireoidiana em pacientes com diagnóstico de Leucemia Mielóide Crônica em uso de inibidor de tirosina quinase (Imatinibe, Nilotinibe ou Dasatinibe) acompanhados no ambulatório de Hematologia do HUWC no período de janeiro de 2019 a junho de 2020, sendo feito um rastreio de disfunção tireoidiana nos tempos 0, 6 meses, 12 meses e 18 meses, a partir de exames hormonais, após assinatura do TCLE. De acordo com o número atual de pacientes atendidos no ambulatório de hematologia, estima-se que 200 pacientes participem do estudo. O grupo controle será composto de 100 indivíduos saudáveis, doadores de sangue no HEMOCE. O manejo clínico desses pacientes e a rotina de coleta sanguínea seguirá o protocolo já estabelecido pelo serviço

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Avaliar a presença de disfunção tireoidiana em pacientes com LMC tratados com inibidores de tirosina quinase e associar com fatores prognósticos.

##### Objetivo Secundário:

- Comparar a presença de disfunção tireoidiana de acordo com o tipo de inibidor de tirosina quinase utilizado (Imatinibe, Nilotinibe e Dasatinibe) e

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

## **APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

**Você está sendo convidado por Lais Farias Masullo como participante da pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO TIREOIDIANA EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA EM USO DE INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE E ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS”. 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.**

O objetivo dessa pesquisa é estudar se os pacientes com leucemia mieloide crônica que fazem tratamento com os medicamentos classificados como inibidores de tirosina quinase apresentam alguma alteração na tireoide e avaliar a influência dessa alteração sobre a evolução e resposta ao tratamento da sua doença.

Serão realizados estudos após o preenchimento de um questionário contendo informações sobre seus hábitos, estilo de vida e sua doença e após a coleta de dois tubos de 4mL de sangue periférico para análise de hemograma completo e para extração de RNA e 1 tubo de 5mL com gel separador para obtenção de soro para os exames: T3, T4L, anti-TPO, TSH e VEGF. As amostras são obtidas por punção venosa periférica no antebraço.

Essas coletas ocorrerão no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). O desconforto causado poderá ser uma leve dor na hora da punção e possível mancha roxa no local.

Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que haja relação entre a presença de disfunção tireoideana e o uso de inibidores de tirosina quinase no tratamento da LMC. Caso você aceite participar da pesquisa, você terá como benefício a pesquisa e acompanhamento sobre a função da sua tireoide e depois serão comunicados sobre os resultados do estudo e qual a influência disso na sua doença. Os riscos gerados são possíveis dor e mancha roxa no local da coleta e perda do sigilo das informações dos participantes. Você tem o direito e liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para o seu tratamento no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC).

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles; não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

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

### **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

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

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

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

**Nome: Lais Farias Masullo**  
**Instituição: Universidade Federal Do Ceará**  
**Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brasil.**  
**Telefones para contato: (85) 33668264**

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

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

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

_____ Nome do participante da pesquisa	Data ___ / ___ / ___	Assinatura
_____ Nome do pesquisador	Data ___ / ___ / ___	Assinatura
_____ Nome da testemunha (se o participante não souber ler)	Data ___ / ___ / ___	Assinatura
_____ Nome do profissional	Data ___ / ___ / ___	Assinatura

## ANEXO A – Artigo submetido à publicação

### Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy HYPOTHYROIDISM ASSOCIATED WITH TYROSINE KINASE INHIBITORS TREATMENT IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: AN OVERVIEW --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	HEMONCSTEM-D-22-00002
Article Type:	Review Article
Section/Category:	Clinical hematology/oncology
Keywords:	chronic myeloid leukemia; Tyrosine Kinase Inhibitors; Thyroid Dysfunction; hypothyroidism; Thyroid Hormone
Corresponding Author:	Lais Farias Masullo, M.D. Federal University of Ceara: Universidade Federal do Ceara BRAZIL
First Author:	Lais Farias Masullo, M.D.
Order of Authors:	Lais Farias Masullo, M.D. Tarcisio Paulo de Almeida Filho, M.D Pedro Aurio Maia Filho Anna Thawanny Gadelha Moura Acy Quixadá Manoel Ricardo Alves Martins Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Hypothyroidism is a thyroid dysfunction characterized by the reduced production of T3 (triiodothyronine) and T4 (thyroxine) hormones. The condition, if untreated, can lead to an increase in comorbidities and cardiovascular mortality. The development of hypothyroidism associated with tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment in patients with chronic myeloid leukemia (CML) has been described in the literature. The mechanisms associated with the development of hypothyroidism during TKI therapy in CML have not been fully elucidated. TKIs are drugs that revolutionize the clinical course of CML by obtaining long-lasting molecular responses, but adverse reactions, hematological or not, such as hypothyroidism, have been reported and should be investigated to contribute to research addressing new types of TKIs with less toxicity, mainly to the thyroid. This article proposes a discussion on the topic and reports articles in the literature about this topic.



## Levothyroxine Replacement Improves Oxidative Status in Primary Hypothyroidism

Lais Farias Masullo<sup>1,2</sup>, Rejane Araújo Magalhães<sup>2,3</sup>, Romêla Pinheiro Gonçalves Lamas<sup>1,2</sup>, Tarcísio Paulo de Almeida Filho<sup>1,2</sup>, Marilena Facundo de Castro<sup>1</sup>, Pedro Aurio Maia Filho<sup>1,2</sup>, Taina Ostorno Vasconcelos Cunha<sup>2</sup>, Ana Rosa Pinto Quidute<sup>2,4,5</sup>, Evelyn Gadoña Porcira Fontanolo<sup>2,6</sup>, Guang Sun<sup>7</sup> and Manoel Ricardo Alves Martins<sup>2,5,6,8\*</sup>

<sup>1</sup> Research Laboratory in Hemoglobinopathies and Genetics of Hematological Diseases, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup> Post-Graduate Program in Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>3</sup> Division of Endocrinology and Diabetes, Hospital Universitário Walter Cantídio, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>4</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>5</sup> Drug Research and Development Center-NFDM/Fortaleza, Fortaleza, Brazil; <sup>6</sup> Department of Clinical Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>7</sup> Discipline of Medicine, Faculty of Medicine, Memorial University St. John's, NL, Canada

### OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Jacqueline Fontaine,  
Georgetown University, United States

**Reviewed by:**  
Marco Castellani,  
Università degli Studi di Roma La  
Sapienza, Italy  
Roberto Viti,  
Università degli Studi di Messina, Italy

\*Correspondence:  
Manoel Ricardo Alves Martins  
mramartins@gmail.com

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Thyroid Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 14 August 2018  
**Accepted:** 19 October 2018  
**Published:** 08 November 2018

**Citation:**  
Masullo LF, Magalhães RA,  
Lamas FPG, de Almeida Filho TP,  
Castro MF, Maia Filho PA, Cunha TV,  
Quidute ARP, Fontanolo EG, Sun G  
and Martins MRA (2018)  
Levothyroxine Replacement Improves  
Oxidative Status in Primary  
Hypothyroidism.  
Front. Endocrinol. 9:555.  
doi: 10.3389/fendo.2018.00055

**Objective:** Although hypothyroidism has been linked to oxidative stress, data regarding the relationship between thyroid hormone levels and oxidative stress is still inconsistent. This study was designed to evaluate the effect of levothyroxine replacement on oxidative stress in women with primary hypothyroidism.

**Design:** A total of 25 female patients with primary hypothyroidism were included. Oxidative stress markers were measured before and after levothyroxine replacement treatment in all patients.

**Methods:** Oxidative stress was evaluated through the measurement of oxidants (thiobarbituric acid reactive substances [TBARS] and nitrite/nitrate levels), and antioxidants (superoxide dismutase and catalase activity).

**Results:** Antioxidant catalase activity ( $83.77 \pm 23.8$  vs.  $50.12 \pm 12.75$   $\mu\text{M}/\text{min}$ ;  $p = 0.03$ ) was significantly increased and the levels of TBARS ( $3.02 \pm 0.86$  vs.  $3.55 \pm 0.87$   $\mu\text{M}$ ;  $p = 0.03$ ) were significantly decreased in the state of euthyroidism after levothyroxine replacement compared to the hypothyroidism before levothyroxine treatment. No significant change in neither nitrite/nitrate concentration ( $p = 0.18$ ) nor in superoxide dismutase activity ( $p = 0.83$ ) after L-T4 adjustment was found.

**Conclusions:** Our data demonstrate that levothyroxine replacement improved oxidative status in patients with primary hypothyroidism, indexed by the significantly decreased levels of malonaldehyde (MDA) and increased catalase (CAT) activity.

**Keywords:** oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants, oxidants, thyroid hormones, hypothyroidism, levothyroxine replacement, thyroid disease

### INTRODUCTION

Primary hypothyroidism is a disorder defined by an increased thyroid stimulating hormone (TSH) level, which may or may not be accompanied by a decreased thyroid hormone (TH) level, T3 and T4 (1). The most common causes of hypothyroidism are autoimmune destruction of the thyroid, thyroid surgery, and radiiodine therapy (2).

## 7. REFERÊNCIAS:

ABDULRAHMAN, R. M.; VERLOOP, H.; HOFTIJZER, H.; VERBURG, E.; HOVENS, G. C.; CORSSMIT, E. P.; REINERS, C.; GELDERBLON, H.; PEREIRA, A. M.; KAPITEIJN, E.; ROMIJN, J. A.; VISSER, T. J.; SMIT, J. W. Sorafenib-induced hypothyroidism is associated with increased type 3 deiodination. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol. 95, no. 8, p. 3758–3762, Aug. 2010. .

ADNAN-AWAD, S.; KIM, D.; HOHTARI, H.; JAVARAPPA, K. K.; BRANDSTOETTER, T.; MAYER, I.; POTDAR, S.; HECKMAN, C. A.; KYTÖLÄ, S.; PORKKA, K.; DOMA, E.; SEXL, V.; KANKAINEN, M.; MUSTJOKI, S. Characterization of p190-Bcr-Abl chronic myeloid leukemia reveals specific signaling pathways and therapeutic targets. **Leukemia**, vol. 35, no. 7, p. 1964–1975, Jul. 2021. .

AGUAYO, A.; KANTARJIAN, H.; MANSHOURI, T.; GIDEL, C.; ESTEY, E.; THOMAS, D.; KOLLER, C.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KEATING, M.; FREIREICH, E.; ALBITAR, M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. **Blood**, vol. 96, no. 6, p. 2240–2245, 15 Sep. 2000. .

AL-HABBOUBI, H. H.; MAHDI, N.; ABU-HIJLEH, T. M.; ABU-HIJLEH, F. M.; SATER, M. S.; ALMAWI, W. Y. The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease. **European journal of haematology**, vol. 89, no. 5, p. 403–409, Nov. 2012. .

APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet**, vol. 385, no. 9976, p. 1447–1459, 11 Apr. 2015. .

APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. **Cell**, vol. 176, no. 6, p. 1248–1264, 7 Mar. 2019. .

ARBER DA, ORAZI A, HASSERJIAN R, ET AL. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, vol. 128, no. 3, p. 462–463, 2016. DOI 10.1182/blood-2016-06-721662. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-06-721662>.

ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 315, no. 3, p. 971–979, 2005. DOI 10.1124/jpet.105.084145. Available at: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.105.084145>.

ARORA, M.; HOROWITZ, M. M. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Chronic Myelogenous Leukemia. **Chronic Myeloid Leukemia**, , p. 13–26, 2006. DOI 10.3109/9780849379567-2. Available at: <http://dx.doi.org/10.3109/9780849379567-2>.

BADRAN, A.; ELSHENAWY, M. A.; SHAHIN, A.; ALJUBRAN, A.; ALZAHIRANI, A.; ELDALI, A.; BAZARBASHI, S. Efficacy and Prognostic Factors of Sunitinib as First-Line Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma in an Arab Population. **JCO global oncology**, vol. 6, p. 19–26, Feb. 2020. .

BAILEY, E. B.; TANTRAVAHU, S. K.; POOLE, A.; AGARWAL, A. M.; STRAUBHAR, A. M.; BATTEN, J. A.; PATEL, S. B.; WELLS, C. E.; STENEHJEM, D. D.; AGARWAL, N. Correlation of degree of hypothyroidism with survival outcomes in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. **Clinical genitourinary cancer**, vol. 13, no. 3, p. e131–7, Jun. 2015. .

BAKERYWALA, S.; SCHWARCZ, M. D.; GOLDBERG, M. D.; VALIQUETTE, G.; WEISS, I. A. Nilotinib-Associated Destructive Thyroiditis. **Case reports in endocrinology**, vol. 2015, p. 736092, 7 May 2015. .

BALDINI, I. M.; VITA, A.; MAURI, M. C.; AMODEI, V.; CARRISI, M.; BRAVIN, S.; CANTALAMESSA, L. Psychopathological and cognitive features in subclinical hypothyroidism. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, vol. 21, no. 6, p. 925–935, Aug. 1997. .

BASKIN, H. J.; JACK. BASKIN, H.; COBIN, R. H.; DUICK, D. S.; GHARIB, H.; GUTTLER, R. B.; KAPLAN, M. M.; SEGAL, R. L.; GARBER, J. R.; HAMILTON, C. R., Jr; HANDELSMAN, Y.; HELLMAN, R.; KUKORA, J. S.; LEVY, P.; PALUMBO, P. J.; PETAK, S. M.; RETTINGER, H. I.; RODBARD, H. W.; F. JOHN SERVICE; ... TOURTELOT, J. B. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the Evaluation and Treatment of Hyperthyroidism and Hypothyroidism. **Endocrine Practice**, vol. 8, no. 6, p. 457–469, 2002. DOI 10.4158/1934-2403-8.6.457. Available at: <http://dx.doi.org/10.4158/1934-2403-8.6.457>.

BAZI, A.; HARATI, H.; KHOSRAVI-BONJAR, A.; RAKHSHANI, E.; DELARAMNASAB, M. Hypothyroidism and Hypoparathyroidism in Thalassemia Major Patients: A Study in Sistan and Baluchestan Province, Iran. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, vol. 16, no. 2, p. e13228, Apr. 2018. .

BILEN, M. A.; PATEL, A.; HESS, K. R.; MUNOZ, J.; BUSAIDY, N. L.; WHELER, J. J.; JANKU, F.; FALCHOOK, G. S.; HONG, D. S.; MERIC-BERNSTAM, F.; HABRA, M. A.; NAING, A. Association between new-onset hypothyroidism and clinical response in patients treated with tyrosine kinase inhibitor therapy in phase I clinical trials. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, vol. 78, no. 1, p. 167–171, Jul. 2016. .

BIONDI, B.; CAPPOLA, A. R.; COOPER, D. S. Subclinical Hypothyroidism: A Review. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, vol. 322, no. 2, p. 153–160, 9 Jul. 2019. .

BIONDI, B.; WARTOFSKY, L. Treatment with thyroid hormone. **Endocrine reviews**, vol. 35, no. 3, p. 433–512, Jun. 2014. .

BOUTHELIER, A.; ARAGONÉS, J. Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research**, vol. 1867, no. 9, p. 118733, Sep. 2020. .

BRAUN, D.; KIM, T. D.; LE COUTRE, P.; KÖHRLE, J.; HERSHMAN, J. M.; SCHWEIZER, U. Tyrosine kinase inhibitors noncompetitively inhibit MCT8-mediated iodothyronine transport. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol.

97, no. 1, p. E100–5, Jan. 2012. .

BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 122, no. 9, p. 3035–3043, 2012. DOI 10.1172/jci60047. Available at: <http://dx.doi.org/10.1172/jci60047>.

CANARIS, G. J.; MANOWITZ, N. R.; MAYOR, G.; CHESTER RIDGWAY, E. The Colorado Thyroid Disease Prevalence Study. **Archives of Internal Medicine**, vol. 160, no. 4, p. 526, 2000. DOI 10.1001/archinte.160.4.526. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.160.4.526>.

CHEN, H.; SHEN, Y.-F.; GONG, F.; YANG, G.-H.; JIANG, Y.-Q.; ZHANG, R. Expression of VEGF and its effect on cell proliferation in patients with chronic myeloid leukemia. **European review for medical and pharmacological sciences**, vol. 19, no. 19, p. 3569–3573, Oct. 2015. .

CHIOVATO, L.; MAGRI, F.; CARLÉ, A. Hypothyroidism in Context: Where We've Been and Where We're Going. **Advances in therapy**, vol. 36, no. Suppl 2, p. 47–58, Sep. 2019. .

CORBIN, A. S.; LA ROSÉE, P.; STOFFREGEN, E. P.; DRUKER, B. J.; DEININGER, M. W. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. **Blood**, vol. 101, no. 11, p. 4611–4614, 1 Jun. 2003. .

CORTES, J. E.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; DEININGER, M. W.; MAURO, M. J.; CHUAH, C.; KIM, D.-W.; DYAGIL, I.; GLUSHKO, N.; MILOJKOVIC, D.; LE COUTRE, P.; GARCIA-GUTIERREZ, V.; REILLY, L.; JEYNES-ELLIS, A.; LEIP, E.; BARDY-BOUXIN, N.; HOCHHAUS, A.; BRÜMMENDORF, T. H. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, vol. 36, no. 3, p. 231–237, 20 Jan. 2018. .

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**, vol. 10, no. 3, p. 149–166, 2007. DOI 10.1007/s10456-007-9074-0. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-007-9074-0>.

CRAPS, J.; JORIS, V.; BALDESCHI, L.; DAUMERIE, C.; CAMBONI, A.; BUEMI, A.; LENGELÉ, B.; BEHETS, C.; BOSCHI, A.; MOURAD, M.; MANY, M.-C.; DESSY, C. miR-199a Downregulation as a Driver of the NOX4/HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A Pathway in Thyroid and Orbital Adipose Tissues from Graves' Patients. **International journal of molecular sciences**, vol. 23, no. 1, 23 Dec. 2021. DOI 10.3390/ijms23010153. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010153>.

DANESE, S.; SANS, M.; DE LA MOTTE, C.; GRAZIANI, C.; WEST, G.; PHILLIPS, M. H.; POLA, R.; RUTELLA, S.; WILLIS, J.; GASBARRINI, A.; FIOCCHI, C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology**, vol. 130, no. 7, p. 2060–2073, Jun. 2006. .

DE CARVALHO, G. A.; PAZ-FILHO, G.; MESA JUNIOR, C.; GRAF, H. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Pitfalls on the replacement therapy for primary and central hypothyroidism in adults. **European journal of endocrinology /**

**European Federation of Endocrine Societies**, vol. 178, no. 6, p. R231–R244, Jun. 2018. .

DE GROOT, J. W. B.; LINKS, T. P.; VAN DER GRAAF, W. T. A. Tyrosine kinase inhibitors causing hypothyroidism in a patient on levothyroxine. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, vol. 17, no. 11, p. 1719–1720, Nov. 2006. .

DE GROOT, J. W. B.; ZONNENBERG, B. A.; PLUKKER, J. T. M.; VAN DER GRAAF, W. T. A.; LINKS, T. P. Imatinib induces hypothyroidism in patients receiving levothyroxine. **Clinical pharmacology and therapeutics**, vol. 78, no. 4, p. 433–438, Oct. 2005. .

DE LEO, S.; LEE, S. Y.; BRAVERMAN, L. E. Hyperthyroidism. **The Lancet**, vol. 388, no. 10047, p. 906–918, 27 Aug. 2016. .

DESAI, J.; YASSA, L.; MARQUSEE, E.; GEORGE, S.; FRATES, M. C.; CHEN, M. H.; MORGAN, J. A.; DYCHTER, S. S.; LARSEN, P. R.; DEMETRI, G. D.; ALEXANDER, E. K. Hypothyroidism after sunitinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumors. **Annals of internal medicine**, vol. 145, no. 9, p. 660–664, 7 Nov. 2006. .

DIAS, S.; HATTORI, K.; ZHU, Z.; HEISSIG, B.; CHOY, M.; LANE, W.; WU, Y.; CHADBURN, A.; HYJEK, E.; GILL, M.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A.; RAFII, S. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. **The Journal of clinical investigation**, vol. 106, no. 4, p. 511–521, Aug. 2000. .

DOWNES, N. L.; LAHAM-KARAM, N.; KAIKKONEN, M. U.; YLÄ-HERTTUALA, S. Differential but Complementary HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  Transcriptional Regulation. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, vol. 26, no. 7, p. 1735–1745, 5 Jul. 2018. .

DRUKER, B. J.; TALPAZ, M.; RESTA, D. J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J. M.; LYDON, N. B.; KANTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C. L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, vol. 344, no. 14, p. 1031–1037, 5 Apr. 2001. .

ELALFY, M. S.; EL-SHERIF, N. H.; SAKR, H. M.; EL ASHKAR, M. N. M. Thyroid hemodynamic alterations in Egyptian patients with sickle cell disease: relation to disease severity, total body iron and thyroid function. **Expert review of hematology**, vol. 12, no. 8, p. 589–596, Aug. 2019. .

EMING, S. A.; KRIEG, T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, vol. 11, no. 1, p. 79–86, Sep. 2006. .

EROUKHMANNOFF, J.; CASTINETTI, F.; PENEL, N.; SALAS, S. Auto-immune thyroid dysfunction induced by tyrosine kinase inhibitors in a patient with recurrent chordoma. **BMC cancer**, vol. 16, p. 679, 24 Aug. 2016. .

FALLAHI, P.; FERRARI, S. M.; VITA, R.; DI DOMENICANTONIO, A.; CORRADO, A.; BENVENGA, S.; ANTONELLI, A. Thyroid dysfunctions induced by tyrosine kinase inhibitors. **Expert opinion on drug safety**, vol. 13, no. 6, p. 723–733, Jun. 2014. .

FLORENTIN, J.; O'NEIL, S. P.; OHAYON, L. L.; UDDIN, A.; VASAMSETTI, S. B.; ARUNKUMAR, A.; GHOSH, S.; BOATZ, J. C.; SUI, J.; KLIMENT, C. R.; CHAN, S. Y.; DUTTA, P. VEGF Receptor 1 Promotes Hypoxia-Induced Hematopoietic Progenitor Proliferation and Differentiation. **Frontiers in immunology**, vol. 13, p. 882484, 12 May 2022. .

FONG, G.-H. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. **Angiogenesis**, vol. 11, no. 2, p. 121–140, 2008. DOI 10.1007/s10456-008-9107-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-008-9107-3>.

FORRISTAL, C. E.; BROWN, A. L.; HELWANI, F. M.; WINKLER, I. G.; NOWLAN, B.; BARBIER, V.; POWELL, R. J.; ENGLER, G. A.; DIAKIW, S. M.; ZANNETTINO, A. C. W.; MARTIN, S.; PATTABIRAMAN, D.; D'ANDREA, R. J.; LEWIS, I. D.; LEVESQUE, J. P. Hypoxia inducible factor (HIF)-2 $\alpha$  accelerates disease progression in mouse models of leukemia and lymphoma but is not a poor prognosis factor in human AML. **Leukemia**, vol. 29, no. 10, p. 2075–2085, 2015. DOI 10.1038/leu.2015.102. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.102>.

FÜREDER, W.; KRAUTH, M.-T.; SPERR, W. R.; SONNECK, K.; SIMONITSCH-KLUPP, I.; MÜLLAUER, L.; WILLMANN, M.; HORNY, H.-P.; VALENT, P. Evaluation of angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. **The American journal of pathology**, vol. 168, no. 1, p. 123–130, Jan. 2006. .

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; ANTOLINI, L.; MAHON, F.-X.; GUILHOT, F.; DEININGER, M.; FAVA, C.; NAGLER, A.; DELLA CASA, C. M.; MORRA, E.; ABRUZZESE, E.; D'EMILIO, A.; STAGNO, F.; LE COUTRE, P.; HURTADO-MONROY, R.; SANTINI, V.; MARTINO, B.; PANE, F.; PICCIN, A.; GIRALDO, P.; ... KIM, D.-W. Multicenter independent assessment of outcomes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 103, no. 7, p. 553–561, 6 Apr. 2011. .

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; GASSER, M.; AHMED, S.; ASSOULINE, S.; SCAPOZZA, L. Abl inhibitor BMS354825 binding mode in Abelson kinase revealed by molecular docking studies. **Leukemia**, vol. 19, no. 7, p. 1267–1269, Jul. 2005. .

GARCÍA-GUTIÉRREZ, V.; MILOJKOVIC, D.; HERNANDEZ-BOLUDA, J. C.; CLAUDIANI, S.; MARTIN MATEOS, M. L.; CASADO-MONTERO, L. F.; GONZÁLEZ, G.; JIMENEZ-VELASCO, A.; BOQUE, C.; MARTINEZ-TRILLOS, A.; VÁZQUEZ, I. M.; PAYER, Á. R.; SENÍN, A.; AMUSTIO DÍEZ, E.; GARCÍA, A. B.; CARRASCOSA, G. B.; ORTÍ, G.; RUIZ, B. C.; FERNÁNDEZ, M. Á.; ... GRUPO ESPAÑOL DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (GELMC). Safety and efficacy of bosutinib in fourth-line therapy of chronic myeloid leukemia patients. **Annals of hematology**, vol. 98, no. 2, p. 321–330, Feb. 2019. .

GEZER, D.; VUKOVIC, M.; SOGA, T.; POLLARD, P. J.; KRANC, K. R. Concise

review: genetic dissection of hypoxia signaling pathways in normal and leukemic stem cells. **Stem cells**, vol. 32, no. 6, p. 1390–1397, Jun. 2014. .

GILES, F. J.; MAURO, M. J.; HONG, F.; ORTMANN, C.-E.; MCNEILL, C.; WOODMAN, R. C.; HOCHHAUS, A.; LE COUTRE, P. D.; SAGLIO, G. Rates of peripheral arterial occlusive disease in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic phase treated with imatinib, nilotinib, or non-tyrosine kinase therapy: a retrospective cohort analysis. **Leukemia**, vol. 27, no. 6, p. 1310–1315, Jun. 2013. .

GODOY, C. R. T.; LEVY, D.; GIAMPAOLI, V.; CHAMONE, D. A. F.; BYDLOWSKI, S. P.; PEREIRA, J. Circulating endothelial cells are increased in chronic myeloid leukemia blast crisis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]**, vol. 48, no. 6, p. 509–514, Jun. 2015. .

GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. **New England Journal of Medicine**, vol. 349, no. 15, p. 1451–1464, 2003. DOI 10.1056/nejmra020777. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra020777>.

HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; KOLB, H. J.; PRALLE, H.; HOSSFELD, D. K.; QUEISSER, W.; LÖFFLER, H.; HOCHHAUS, A.; HEINZE, B. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. **Blood**, vol. 84, no. 12, p. 4064–4077, 15 Dec. 1994. .

HIROTA, K. Special Issue: Hypoxia-Inducible Factors: Regulation and Therapeutic Potential. **Biomedicines**, vol. 9, no. 12, 25 Nov. 2021. DOI 10.3390/biomedicines9121768. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9121768>.

HOCHHAUS, A.; O'BRIEN, S. G.; GUILHOT, F.; DRUKER, B. J.; BRANFORD, S.; FORONI, L.; GOLDMAN, J. M.; MÜLLER, M. C.; RADICH, J. P.; RUDOLTZ, M.; MONE, M.; GATHMANN, I.; HUGHES, T. P.; LARSON, R. A.; IRIS INVESTIGATORS. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, vol. 23, no. 6, p. 1054–1061, Jun. 2009. .

JABBOUR, E.; CORTES, J. E.; GILES, F. J.; O'BRIEN, S.; KANTARJIAN, H. M. Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. **Cancer**, vol. 109, no. 11, p. 2171–2181, 1 Jun. 2007. .

JABBOUR, E.; CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications. **Cancer**, vol. 112, no. 10, p. 2112–2118, 15 May 2008. .

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. **American journal of hematology**, vol. 93, no. 3, p. 442–459, Mar. 2018. .

JENSEN, R. L.; RAGEL, B. T.; WHANG, K.; GILLESPIE, D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF)

secretion and tumor growth in malignant gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, vol. 78, no. 3, p. 233–247, 2006. DOI 10.1007/s11060-005-9103-z. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-005-9103-z>.

JONKLAAS, J.; BIANCO, A. C.; BAUER, A. J.; BURMAN, K. D.; CAPPOLA, A. R.; CELI, F. S.; COOPER, D. S.; KIM, B. W.; PEETERS, R. P.; ROSENTHAL, M. S.; SAWKA, A. M.; AMERICAN THYROID ASSOCIATION TASK FORCE ON THYROID HORMONE REPLACEMENT. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 24, no. 12, p. 1670–1751, Dec. 2014. .

JORDE, R.; WATERLOO, K.; STORHAUG, H.; NYRNES, A.; SUNDSFJORD, J.; JENSSEN, T. G. Neuropsychological function and symptoms in subjects with subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine treatment. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol. 91, no. 1, p. 145–153, Jan. 2006. .

KANTARJIAN, H. M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J.; GILES, F. J.; RIOS, M. B.; SHAN, J.; FADERL, S.; GARCIA-MANERO, G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; WIERDA, W.; KEATING, M.; TALPAZ, M. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. **Cancer**, vol. 98, no. 12, p. 2636–2642, 15 Dec. 2003. .

KAPPERS, M. H. W.; VAN ESCH, J. H. M.; SMEDTS, F. M. M.; DE KRIJGER, R. R.; EECHOUTE, K.; MATHIJSEN, R. H. J.; SLEIJFER, S.; LEIJTEN, F.; DANSER, A. H. J.; VAN DEN MEIRACKER, A. H.; VISSER, T. J. Sunitinib-induced hypothyroidism is due to induction of type 3 deiodinase activity and thyroidal capillary regression. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol. 96, no. 10, p. 3087–3094, Oct. 2011. .

KIM, T. D.; SCHWARZ, M.; NOGAI, H.; GRILLE, P.; WESTERMANN, J.; PLÖCKINGER, U.; BRAUN, D.; SCHWEIZER, U.; ARNOLD, R.; DÖRKEN, B.; LE COUTRE, P. Thyroid dysfunction caused by second-generation tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 20, no. 11, p. 1209–1214, Nov. 2010. .

KIMURA, H.; WEISZ, A.; KURASHIMA, Y.; HASHIMOTO, K.; OGURA, T.; D'ACQUISTO, F.; ADDEO, R.; MAKUUCHI, M.; ESUMI, H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. **Blood**, vol. 95, no. 1, p. 189–197, 1 Jan. 2000. .

KOCH, S.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, vol. 2, no. 7, p. a006502, Jul. 2012. .

KOTRU, M.; MATHUR, P.; GARG, N.; KUMAR, Y.; SIKKA, M.; RUSIA, U. Serum vascular endothelial growth factor correlates with Hasford score in chronic myeloid leukemia. **Indian journal of hematology & blood transfusion: an official journal of**

**Indian Society of Hematology and Blood Transfusion**, vol. 38, no. 1, p. 61–67, Jan. 2022. .

KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. **The New England journal of medicine**, vol. 353, no. 2, p. 172–187, 14 Jul. 2005. .

KRAUTH, M.-T.; SIMONITSCH, I.; AICHBERGER, K. J.; MAYERHOFER, M.; SPERR, W. R.; SILLABER, C.; SCHNEEWEISS, B.; MANN, G.; GADNER, H.; VALENT, P. Immunohistochemical detection of VEGF in the bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia and correlation with the phase of disease. **American journal of clinical pathology**, vol. 121, no. 4, p. 473–481, Apr. 2004. .

KROCK, B. L.; SKULI, N.; SIMON, M. C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes & Cancer**, vol. 2, no. 12, p. 1117–1133, 2011. DOI 10.1177/1947601911423654. Available at: <http://dx.doi.org/10.1177/1947601911423654>.

LARSON, R. A.; KIM, D.-W.; JOOTAR, S.; PASQUINI, R.; CLARK, R. E.; LOBO, C.; GOLDBERG, S. L.; SHIBAYAMA, H.; HOCHHAUS, A.; SAGLIO, G.; KANTARJIAN, H. M.; KEMP, C.; DENG, W.; MENSSEN, H. D.; HUGHES, T. P. ENESTnd 5-year (y) update: Long-term outcomes of patients (pts) with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with frontline nilotinib (NIL) versus imatinib (IM). **Journal of Clinical Oncology**, vol. 32, no. 15\_suppl, p. 7073–7073, 2014. DOI 10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.7073. Available at: [http://dx.doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.7073](http://dx.doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.7073).

LECHNER, M. G.; VYAS, C. M.; HAMNVIK, O.-P. R.; ALEXANDER, E. K.; LARSEN, P. R.; CHOUEIRI, T. K.; ANGELL, T. E. Hypothyroidism During Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Advanced Nonthyroidal Cancers. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 28, no. 4, p. 445–453, Apr. 2018a. .

LECHNER, M. G.; VYAS, C. M.; HAMNVIK, O.-P. R.; ALEXANDER, E. K.; LARSEN, P. R.; CHOUEIRI, T. K.; ANGELL, T. E. Risk Factors for New Hypothyroidism During Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Advanced Nonthyroidal Cancer Patients. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 28, no. 4, p. 437–444, Apr. 2018b. .

LEE, H.-W.; SHIN, J. H.; SIMONS, M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. **Experimental & Molecular Medicine**, 2022. DOI 10.1038/s12276-022-00785-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-022-00785-1>.

LIAO, X.; LIU, Z.; SONG, H. Thyroid dysfunction related to vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: A real-world study based on FAERS. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, vol. 46, no. 5, p. 1418–1425, Oct. 2021. .

LOEFFLER, J. S.; TARBELL, N. J.; GARBER, J. R.; MAUCH, P. The development of Graves' disease following radiation therapy in Hodgkin's disease. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, vol. 14, no. 1, p. 175–178, Jan. 1988.

LUIDENS, M. K.; MOUSA, S. A.; DAVIS, F. B.; LIN, H.-Y.; DAVIS, P. J. Thyroid hormone and angiogenesis. **Vascular pharmacology**, vol. 52, no. 3-4, p. 142–145, Mar. 2010. .

LUNDBERG, L. G.; LERNER, R.; SUNDELIN, P.; ROGERS, R.; FOLKMAN, J.; PALMBLAD, J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. **The American journal of pathology**, vol. 157, no. 1, p. 15–19, Jul. 2000. .

MADARIAGA, A. G.; PALACIOS, S. S.; GUILLÉN-GRIMA, F.; GALOFRÉ, J. C. The Incidence and Prevalence of Thyroid Dysfunction in Europe: A Meta-Analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 99, no. 3, p. 923–931, 2014. DOI 10.1210/jc.2013-2409. Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2013-2409>.

MAEKAWA, T.; ASHIHARA, E.; KIMURA, S. The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. **International journal of clinical oncology**, vol. 12, no. 5, p. 327–340, Oct. 2007. .

MAKITA, N.; IIRI, T. Tyrosine kinase inhibitor-induced thyroid disorders: a review and hypothesis. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 23, no. 2, p. 151–159, Feb. 2013. .

MAKITA, N.; MIYAKAWA, M.; FUJITA, T.; IIRI, T. Sunitinib induces hypothyroidism with a markedly reduced vascularity. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 20, no. 3, p. 323–326, Mar. 2010. .

MASOOD, R.; CAI, J.; ZHENG, T.; SMITH, D. L.; HINTON, D. R.; GILL, P. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. **Blood**, vol. 98, no. 6, p. 1904–1913, 15 Sep. 2001. . Accessed on: 7 Jun. 2022.

MAYERHOFER, M.; VALENT, P.; SPERR, W. R.; GRIFFIN, J. D.; SILLABER, C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. **Blood**, vol. 100, no. 10, p. 3767–3775, 15 Nov. 2002. .

MILOJKOVIC, D.; APPERLEY, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, vol. 15, no. 24, p. 7519–7527, 2009. DOI 10.1158/1078-0432.ccr-09-1068. Available at: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-1068>.

MUGHAL, T. I.; SCHRIEBER, A. Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Biologics: targets & therapy**, vol. 4, p. 315–323, 2 Dec. 2010. .

NILLESEN, S. T. M.; GEUTJES, P. J.; WISMANS, R.; SCHALKWIJK, J.; DAAMEN, W. F.; VAN KUPPEVELT, T. H. Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. **Biomaterials**,

vol. 28, no. 6, p. 1123–1131, Feb. 2007. .

NOMBELA-ARRIETA, C.; PIVARNIK, G.; WINKEL, B.; CANTY, K. J.; HARLEY, B.; MAHONEY, J. E.; PARK, S.-Y.; LU, J.; PROTOPOPOV, A.; SILBERSTEIN, L. E. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. **Nature cell biology**, vol. 15, no. 5, p. 533–543, May 2013. .

PANI, F.; ATZORI, F.; BAGHINO, G.; BOI, F.; IONTA, M. T.; TANCA, L.; SCARTOZZI, M.; MARIOTTI, S. Hypothyroidism and Thyroid Autoimmunity as a Prognostic Biomarker of Better Response in Metastatic Cancer Long-Term Survivors Treated with Sunitinib. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 26, no. 9, p. 1336–1337, Sep. 2016. .

PARMAR, K.; MAUCH, P.; VERGILIO, J.-A.; SACKSTEIN, R.; DOWN, J. D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 104, no. 13, p. 5431–5436, 27 Mar. 2007. .

PASIC, I.; LIPTON, J. H. Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. **Leukemia Research**, vol. 55, p. 65–78, 2017. DOI 10.1016/j.leukres.2017.01.005. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.005>.

PATEL, S.; NAYERNAMA, A.; JONES, S. C.; CLARO, R. A.; WALDRON, P. E. BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor-associated thyroid dysfunction: A review of cases reported to the FDA Adverse Event Reporting System and published in the literature. **American Journal of Hematology**, vol. 95, no. 12, 2020. DOI 10.1002/ajh.25997. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.25997>.

PENACK, O.; SOCIÉ, G.; VAN DEN BRINK, M. R. M. The importance of neovascularization and its inhibition for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, vol. 117, no. 16, p. 4181–4189, 2011. DOI 10.1182/blood-2010-10-312934. Available at: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-10-312934>.

PEZZUTO, A.; CARICO, E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. **Current molecular medicine**, vol. 18, no. 6, p. 343–351, 2018. .

RAMSDEN, J. D. Angiogenesis in the thyroid gland. **Journal of Endocrinology**, vol. 166, no. 3, p. 475–480, 2000. DOI 10.1677/joe.0.1660475. Available at: <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1660475>.

RAZVI, S.; INGOE, L.; KEEKA, G.; OATES, C.; MCMILLAN, C.; WEAVER, J. U. The beneficial effect of L-thyroxine on cardiovascular risk factors, endothelial function, and quality of life in subclinical hypothyroidism: randomized, crossover trial. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol. 92, no. 5, p. 1715–1723, May 2007. .

RODIA, R.; PANI, F.; CAOCCI, G.; LA NASA, G.; SIMULA, M. P.; MULAS, O.; VELLUZZI, F.; LOVISELLI, A.; MARIOTTI, S.; BOI, F. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism are associated with deep molecular response in patients with chronic myeloid leukemia on tyrosine kinase inhibitors. **Journal of Endocrinological**

**Investigation**, vol. 45, no. 2, p. 291–300, 2022. DOI 10.1007/s40618-021-01613-5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s40618-021-01613-5>.

RODRIGUEZ, D.; WATTS, D.; GAETE, D.; SORMENDI, S.; WIELOCKX, B. Hypoxia Pathway Proteins and Their Impact on the Blood Vasculature. **International journal of molecular sciences**, vol. 22, no. 17, 25 Aug. 2021. DOI 10.3390/ijms22179191. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179191>.

ROSARIO, P. W. **Subclinical hypothyroidism**. **The New England journal of medicine**. [S. l.: s. n.], 5 Oct. 2017.

ROSS, D. S.; BURCH, H. B.; COOPER, D. S.; GREENLEE, M. C.; LAURBERG, P.; MAIA, A. L.; RIVKEES, S. A.; SAMUELS, M.; SOSA, J. A.; STAN, M. N.; WALTER, M. A. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, vol. 26, no. 10, p. 1343–1421, Oct. 2016. .

ROWLEY, J. D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. **Nature**, vol. 243, no. 5405, p. 290–293, Jun. 1973. . Accessed on: 4 Jun. 2022.

SACHA, T. Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, vol. 6, no. 1, p. e2014007, 2 Jan. 2014. .

SAMAD, M. A.; MAHBOOB, E.; MANSOOR, H. Chronic myeloid leukemia: a type of MPN. **Blood research**, 30 May 2022. DOI 10.5045/br.2022.2021173. Available at: <http://dx.doi.org/10.5045/br.2022.2021173>.

SAUSSELE, S.; HAVERKAMP, W.; LANG, F.; KOSCHMIEDER, S.; KIANI, A.; JENTSCH-ULLRICH, K.; STEGELMANN, F.; PFEIFER, H.; LA ROSÉE, P.; GOEKBUGET, N.; RIEGER, C.; WALLER, C. F.; FRANKE, G.-N.; LE COUTRE, P.; KIRCHMAIR, R.; JUNGHANSS, C. Ponatinib in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome-Positive Acute Leukemia: Recommendations of a German Expert Consensus Panel with Focus on Cardiovascular Management. **Acta Haematologica**, vol. 143, no. 3, p. 217–231, 2020. DOI 10.1159/000501927. Available at: <http://dx.doi.org/10.1159/000501927>.

SCHEPERS, K.; CAMPBELL, T. B.; PASSEGUÉ, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. **Cell stem cell**, vol. 16, no. 3, p. 254–267, 5 Mar. 2015. .

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**, vol. 148, no. 3, p. 399–408, 2012. DOI 10.1016/j.cell.2012.01.021. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.

SHAH, D. R.; SHAH, R. R.; MORGANROTH, J. Tyrosine kinase inhibitors: their on-target toxicities as potential indicators of efficacy. **Drug safety: an international journal of medical toxicology and drug experience**, vol. 36, no. 6, p. 413–426, Jun. 2013. .

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes & Cancer**, vol. 2, no. 12, p. 1097–1105, 2011. DOI 10.1177/1947601911423031. Available at: <http://dx.doi.org/10.1177/1947601911423031>.

SHIELDS, C. L. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ocular Health and Disease. **Yearbook of Ophthalmology**, vol. 2006, p. 232–233, 2006. DOI 10.1016/s0084-392x(08)70389-7. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0084-392x\(08\)70389-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0084-392x(08)70389-7).

SHIMODA, K.; TAKAHASHI, N.; KIRITO, K.; IRIYAMA, N.; KAWAGUCHI, T.; KIZAKI, M. JSH Practical Guidelines for Hematological Malignancies, 2018: I. Leukemia-4. Chronic myeloid leukemia (CML)/myeloproliferative neoplasms (MPN). **International journal of hematology**, vol. 112, no. 3, p. 268–291, Sep. 2020. .

SIMONIDES, W. S.; MULCAHEY, M. A.; REDOUT, E. M.; MULLER, A.; ZUIDWIJK, M. J.; VISSER, T. J.; WASSEN, F. W. J. S.; CRESCENZI, A.; DA-SILVA, W. S.; HARNEY, J.; ENGEL, F. B.; OBREGON, M.-J.; LARSEN, P. R.; BIANCO, A. C.; HUANG, S. A. Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. **The Journal of clinical investigation**, vol. 118, no. 3, p. 975–983, Mar. 2008. .

SPEK, A. H. van der; VAN DER SPEK, A. H.; FLIERS, E.; BOELEN, A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 458, p. 29–38, 2017. DOI 10.1016/j.mce.2017.01.025. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.025>.

SZYMCZAK, D.; DYBKO, J.; KULICZKOWSKI, K. The role of hypoxia-inducible factors in leukemias. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, vol. 27, no. 2, p. 271–275, Feb. 2018. .

TABE, Y.; KONOPLEVA, M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. **British Journal of Haematology**, vol. 164, no. 6, p. 767–778, 2014. DOI 10.1111/bjh.12725. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.12725>.

TALPAZ, M.; MCCREDIE, K. B.; MAVLIGIT, G. M.; GUTTERMAN, J. U. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, vol. 62, no. 3, p. 689–692, Sep. 1983. .

TALPAZ, M.; SPITZER, G.; HITTELMAN, W.; KANTARJIAN, H.; GUTTERMAN, J. Changes in granulocyte-monocyte colony-forming cells among leukocyte-interferon-treated chronic myelogenous leukemia patients. **Experimental hematology**, vol. 14, no. 7, p. 668–671, Aug. 1986. .

TAYLOR, P. N.; ALBRECHT, D.; SCHOLZ, A.; GUTIERREZ-BUEY, G.; LAZARUS, J. H.; DAYAN, C. M.; OKOSIEME, O. E. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Nature reviews. Endocrinology**, vol. 14, no. 5, p. 301–316, May 2018. .

TOKARSKI, J. S.; NEWITT, J. A.; CHANG, C. Y. J.; CHENG, J. D.; WITTEKIND, M.; KIEFER, S. E.; KISH, K.; LEE, F. Y. F.; BORZILLERRI, R.; LOMBARDO, L. J.;

XIE, D.; ZHANG, Y.; KLEI, H. E. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. **Cancer research**, vol. 66, no. 11, p. 5790–5797, 1 Jun. 2006. .

TORINO, F.; BARNABEI, A.; PARAGLIOLA, R.; BALDELLI, R.; APPETECCHIA, M.; CORSELLO, S. M. Thyroid Dysfunction as an Unintended Side Effect of Anticancer Drugs. **Thyroid**, vol. 23, no. 11, p. 1345–1366, 2013. DOI 10.1089/thy.2013.0241. Available at: <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2013.0241>.

TORINO, F.; CORSELLO, S. M.; LONGO, R.; BARNABEI, A.; GASPARINI, G. Hypothyroidism related to tyrosine kinase inhibitors: an emerging toxic effect of targeted therapy. **Nature reviews. Clinical oncology**, vol. 6, no. 4, p. 219–228, Apr. 2009. .

VERSTOVSEK, S.; KANTARJIAN, H.; MANSOURI, T.; CORTES, J.; GILES, F. J.; ROGERS, A.; ALBITAR, M. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase chronic myeloid leukemia. **Blood**, vol. 99, no. 6, p. 2265–2267, 15 Mar. 2002. .

VERSTOVSEK, S.; LUNIN, S.; KANTARJIAN, H.; MANSOURI, T.; FADERL, S.; CORTES, J.; GILES, F.; ALBITAR, M. Clinical relevance of VEGF receptors 1 and 2 in patients with chronic myelogenous leukemia. **Leukemia research**, vol. 27, no. 7, p. 661–669, Jul. 2003. .

VETTER, M. L.; KAUL, S.; IQBAL, N. Tyrosine Kinase Inhibitors and the Thyroid as Both an Unintended and an Intended Target. **Endocrine Practice**, vol. 14, no. 5, p. 618–624, 2008. DOI 10.4158/ep.14.5.618. Available at: <http://dx.doi.org/10.4158/ep.14.5.618>.

WANG, G. L.; JIANG, B. H.; RUE, E. A.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 92, no. 12, p. 5510–5514, 6 Jun. 1995. .

WEISBERG, E.; MANLEY, P. W.; BREITENSTEIN, W.; BRÜGGEN, J.; COWAN-JACOB, S. W.; RAY, A.; HUNTLY, B.; FABBRO, D.; FENDRICH, G.; HALL-MEYERS, E.; KUNG, A. L.; MESTAN, J.; DALEY, G. Q.; CALLAHAN, L.; CATLEY, L.; CAVAZZA, C.; AZAM, M.; NEUBERG, D.; WRIGHT, R. D.; ... GRIFFIN, J. D. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. **Cancer cell**, vol. 7, no. 2, p. 129–141, Feb. 2005. .

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Molecular Diversity**, vol. 10, no. 4, p. 515–527, 2006. DOI 10.1007/s11030-006-9027-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11030-006-9027-3>.

YANG, S.-L.; WU, C.; XIONG, Z.-F.; FANG, X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). **Molecular medicine reports**, vol. 12, no. 2, p. 2411–2416, Aug. 2015. .

YU, S.; CUI, M.; HE, X.; JING, R.; WANG, H. A review of the challenge in measuring and standardizing BCR-ABL1. **Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM /**

FESCC, vol. 55, no. 10, p. 1465–1473, 28 Aug. 2017. .

ZEKAVAT, O. R.; MAKAREM, A. R.; HAGHPANAH, S.; KARAMIZADEH, Z.; JAVAD, P.; KARIMI, M. Hypothyroidism in  $\beta$ -Thalassemia Intermedia Patients with and without Hydroxyurea. **Iranian journal of medical sciences**, vol. 39, no. 1, p. 60–63, Jan. 2014. .

ZHANG, H.; LI, H.; XI, H. S.; LI, S. HIF1 $\alpha$  is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. **Blood**, vol. 119, no. 11, p. 2595–2607, 15 Mar. 2012. .

ZHAO, F.; MANCUSO, A.; BUI, T. V.; TONG, X.; GRUBER, J. J.; SWIDER, C. R.; SANCHEZ, P. V.; LUM, J. J.; SAYED, N.; MELO, J. V.; PERL, A. E.; CARROLL, M.; TUTTLE, S. W.; THOMPSON, C. B. Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1 $\alpha$ -induced metabolic reprogramming. **Oncogene**, vol. 29, no. 20, p. 2962–2972, 20 May 2010. .

ZHOU, T. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. 2009. DOI 10.2210/pdb3ik3/pdb. Available at: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb3ik3/pdb>.