



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS
À HEMATOLOGIA**



**CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES E SEU
POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR NO DIAGNÓSTICO E
TRATAMENTO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

IANDARA MAÍRA LOPES DE SOUZA

MANAUS

2023

IANDARA MAÍRA LOPES DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES E SEU
POTENCIAL USO COMO BIOMARCADOR NO DIAGNÓSTICO E
TRATAMENTO DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientadora: **Prof^a Dra. Andréa Monteiro Tarragô**

Coorientador: **Prof^o Dr. Allyson Guimarães da Costa**

MANAUS

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S729cc Souza, Iandara Maíra Lopes de
Caracterização de microvesículas circulantes e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica / Iandara Maíra Lopes de Souza. Manaus : [s.n], 2023.
116 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Tarragô, AndréA Monteiro

Coorientador: Costa, Allyson Guimarães da

1. Leucemia Mieloide Crônica. 2. Vesículas Extracelulares. 3. Microvesículas. 4. Células Hematopoiéticas. 5. Tratamento terapêutico. I. Tarragô, AndréA Monteiro (Orient.). II. Costa, Allyson Guimarães da (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. Caracterização de microvesículas circulantes e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 005/2023

Ao vigésimo sétimo dia do mês de julho do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se na Sala 10 do Bloco E, 1º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397- Chapada, a Defesa de Dissertação da discente, **Iandara Máira Lopes de Souza** sob o título: “**Caracterização de microvesículas circulantes e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica**”, tendo como orientadora a Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô e coorientador o Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa, segundo encaminhamento da Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. ^a Dr. ^a Andréa Monteiro Tarragô – Presidente (HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 717.410.892-04
Prof. ^a Dr. ^a Maria Edileihe Martins de Almeida Membro (FIOCRUZ)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 811309102-53
Prof. ^a Dr. ^a Lucivana Prata de Souza Mourão Membro (UEA)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 600.963.572-15

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho ao meu marido que sempre me incentivou e caminhou ao meu lado, e dedico este trabalho, principalmente, ao meu filho Ricardo, que é a razão pelo qual quero crescer, aprender e me tornar um ser humano melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por permitir que eu superasse os obstáculos encontrado ao longo da execução desse trabalho.

Ao meu filho Ricardo Gabriel de Souza Benarrós e ao meu marido Cério Rômulo da Silva Benarrós pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos desta caminhada e principalmente, pela compreensão nos momentos que eu precisei me ausentar. Eu amo vocês!

Aos meus pais, Emanuel Altamor Viana de Souza e Sônia Regina Lopes de Souza por desde sempre mostrarem, a mim e a meus irmãos, a importância do estudo como ferramenta de transformação social. Agradeço por tudo!

A minha amiga, Lorena Reis, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, por compreender minha ausência e por sempre me estender o melhor ombro amigo. Amo você, amiga!

A minha orientadora Dra. Andréa Monteiro Tarragô por acreditar em mim, e me ensinar tanto, por ser humana, por ser uma profissional admirável, pela excelência em orientar, pelos conselhos de vida e pela dedicação a mim e ao nosso trabalho.

Ao meu coorientador Allyson Guimarães da Costa, um exemplo de profissional e pessoa, sempre me incentivando e apoiando durante todo esse período.

Aos Bibliotecários, Danilo Cunha e Thaisa Macedo pela disposição em ajudar-me sempre e pela amizade que construímos nessa jornada.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Neoplasias Mieloproliferativas, Bruno, Wanessa, Déborah, Miliane, Éricka, Emanuela e Jhemerson, pela aprendizagem, apoio e dedicação para realizarmos cada etapa do projeto.

Aos meus colegas do mestrado, especialmente a Geysel, Wivian, Lidiane e Naamy e pela amizade, apoio e respeito que construímos ao longo dessa jornada. Admiro todas vocês e obrigada pelos momentos de apoio e colo na hora da agonia e ansiedade.

A todos os professores maravilhosos do PPGH que tive a oportunidade e honra de estudar,

especialmente, a prof.^a Dra. Myuki Crispim, que sempre se colocou à disposição a ajudar todos os alunos, nos encorajando, mostrando que o caminho era difícil, mas que venceríamos essa etapa. O meu muito obrigada!

Ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores – GIPB do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas, especialmente a Dra. Andréa Teixeira, Dr. Olindo Assis, Armanda Barbosa e Marina Silvestrini, por me receberem tão bem em sua cidade e instituição, por me ajudar e ensinar tanto na fase da análise fenotípica.

A prof.^a Dra. Lucivana Prata pela dedicação ao me orientar no estágio docente, mostrando todo amor doado ao ato de lecionar.

A pessoas maravilhosas como a Msc. Wally Victória Sposina, Msc. Tatiana Amabile de Lima, Msc Fábio Magalhães, Dr. Nilberto Dias e Dr. Walter neves que em momentos de dúvidas se colocaram à disposição para conversarmos. O meu muito obrigada!

A Dra. Luciana Cassa e Dra. Sônia Frantz pelo incentivo para que eu fizesse o mestrado.

Ao pessoal da recepção do Laboratório Análises Clínicas da Fundação HEMOAM, especialmente a Tayla, Stephanie e Marcia, por ajudar com disposição na captação de pacientes. Obrigada!

Aos funcionários do Laboratório de genômica por me darem assistência sempre que precisei, em especial ao Robson Rodrigues que me socorreu em vários momentos.

Aos Técnicos em Hemoterapia do setor da coleta de doação de sangue, especialmente a Kemilly e Sra. Rosane, pela ajuda prestada no momento da captação do grupo controle.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), à Fundação HEMOAM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia por todo conhecimento agregado e contribuição na minha formação profissional, além do apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD Amazônia).

E agradeço também aos pacientes da Fundação HEMOAM e doadores de sangue que aceitaram participar deste projeto. Sem vocês eu não conseguiria realizar esta pesquisa.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento para a realização desta pesquisa.

“O importante é nunca parar de questionar.”

Albert Einstein

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica é uma neoplasia hematológica que afeta as células da linhagem mieloide. A grande maioria dos pacientes apresentam o cromossomo Philadelphia, que produz uma proteína híbrida com a atividade tirosina quinase aumentada. O tratamento é realizado com inibidores tirosina quinase, que bloqueiam a expressão da oncoproteína. Os inibidores atuam no controle de células imaturas sendo de extrema importância o monitoramento molecular dos pacientes. Nos últimos anos tem sido estudado a importância das Microvesículas, pois elas podem ser usadas como marcador de recidiva durante a doença, e fornecer informações sobre resistência à farmacos. Visto que elas têm um papel importante na comunicação intercelular e estudos indicam que sua liberação aumenta em processos patológicos. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de Microvesículas em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica ao diagnóstico e durante o primeiro ano de tratamento. Esta pesquisa se trata de um estudo descritivo e exploratório, do tipo bidirecional. Foram recrutados trinta pacientes de ambos os sexos, divididos em dois grupos: 15 pacientes com LMC, e 15 doadores de sangue, como grupo controle. As coletas das amostras de sangue periférico dos pacientes foram realizadas em quatro momentos (ao diagnóstico, em citorredução, 3 meses e 6 meses de tratamento com inibidores tirosina quinase), enquanto que no grupo controle coletou-se sangue periférico em apenas um momento. As amostras foram processadas e foram realizadas as quantificações e análises fenotípicas através da técnica de Citometria de fluxo usando marcadores de superfície para identificar células progenitoras, células mieloides, leucócitos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células T, células B, plaquetas, eritrócitos e células endoteliais. Os resultados da pesquisa demonstraram que as microvesículas liberadas de células progenitoras (CD34), neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a), células dendríticas (CD11c) e células endoteliais (CD51/61) são significativamente mais expressas nos pacientes com LMC ao diagnóstico em comparação ao grupo controle. Contudo, ao início do tratamento com inibidores tirosina quinase, pode-se observar a diminuição da quantidade de microvesículas liberadas de células progenitoras, células mieloides, leucócitos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células T, células B, eritrócitos e células endoteliais. Além disso, foram observadas mudanças nas interações entre as populações de microvesículas ao longo do acompanhamento dos pacientes. Investigações futuras são necessárias com o número maior de participantes e os acompanhando por mais tempo, para assim validar esses achados.

Palavras Chaves: Leucemia mieloide crônica, vesículas extracelulares, microvesículas, células hematopoiéticas e tratamento terapêutico.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia is a hematologic malignancy that affects cells of the myeloid lineage. The vast majority of patients have the Philadelphia chromosome, which produces a hybrid protein with increased tyrosine kinase activity. Treatment is performed with tyrosine kinase inhibitors, which block oncoprotein expression. The inhibitors act in the control of immature cells, being of extreme importance the molecular monitoring of the patients. In recent years, the importance of microvesicles has been studied, as they can be used as a marker of relapse during the disease, and provide information on drug resistance. Since they play an important role in intercellular communication and studies indicate that their release increases in pathological processes. The aim of this study was to characterize the profile of microvesicles in patients with Chronic Myeloid Leukemia at diagnosis and during the first year of treatment. This research is a descriptive and exploratory study, of the bidirectional type. Thirty patients of both sexes were recruited, divided into two groups: 15 patients with CML, and 15 blood donors, as a control group. Peripheral blood samples were collected from patients in four moments (at diagnosis, in cytoreduction, 3 months and 6 months of treatment with tyrosine kinase inhibitors), while in the control group peripheral blood was collected in only one moment. The samples were processed and phenotypic quantifications and analyzes were performed through the flow cytometry technique using surface markers to identify progenitor cells, myeloid cells, leukocytes, dendritic cells, monocytes, neutrophils, T cells, B cells, platelets, erythrocytes and endothelial cells. The research results showed that microvesicles released from progenitor cells (CD34), neutrophils (CD16 and CD66), erythrocytes (CD235a), dendritic cells (CD11c) and endothelial cells (CD51/61) are significantly more expressed in patients with CML than diagnosis compared to the control group. However, at the beginning of treatment with tyrosine kinase inhibitors, a decrease in the amount of microvesicles released from progenitor cells, myeloid cells, leukocytes, dendritic cells, monocytes, neutrophils, T cells, B cells, erythrocytes and endothelial cells can be observed. In addition, changes in the interactions between populations of microvesicles can be observed over the course of patient follow-up. Future investigations are needed with a larger number of participants and with longer follow-up, in order to validate these findings.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, extracellular vesicles, microvesicles, hematopoietic cells and therapeutic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama mostrando as linhagens celulares originadas da célula-tronco hematopoiética da medula óssea.....	17
Figura 2 – Comparação das estimativas de novos casos de câncer.....	19
Figura 3 – Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens/mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação.....	21
Figura 4 – Translocação recíproca dos cromossomos 9 e 22.....	22
Figura 5 – Microscopia da Leucemia mieloide crônica (Fase crônica)	26
Figura 6 – Esquema de escolha de tratamento para pacientes com LMC.....	30
Figura 7 – Efeito imunológico.....	33
Figura 8 – Origem das Vesículas Extracelulares.....	34
Figura 9 – Liberação das populações heterogêneas de VEs.....	36
Figura 10 – Processo de liberação de Exossomos e Microvesículas.....	37
Figura 11 – Características das três principais populações de VEs.....	38
Figura 12 – Composição das MVs.....	39
Figura 13 – Liberação de MVs derivadas de células hematopoiéticas.....	47
Figura 14 – Linha do tempo para obtenção das amostras de sangue periférico.....	56
Figura 15 – Fluxograma do desenvolvimento das atividades do projeto.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados sociodemográfico e manifestações clínicas e laboratoriais da população estudada.....	66
Tabela 2 – Dados hematológicos dos pacientes com LMC ao diagnóstico e ao tratamento.....	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Nomenclatura dos tipos de câncer.....	18
Quadro 2 – Evolução trifásica da LMC.....	25
Quadro 3 – Alterações Hematológicos.....	26
Quadro 4 – Exames ao diagnóstico e no monitoramento de pacientes com LMC.....	27
Quadro 5 – Aspectos clínicos da LMC.....	27
Quadro 6 – Resposta molecular - nível de transcrição.....	31
Quadro 7 – Avaliação da resposta terapêutica.....	32
Quadro 8 – Painel para imunofenotipagem das populações de MVs.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

ACA	Anormalidade Cromossômicas Adicionais
APOs	Corpos Apoptóticos
CCyR	Remissão Citogenética Completa
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTLs	Células T citotóxica
DMR	Resposta Molecular Profunda
DPPIV	Dipeptidilpeptidase IV
ESCRT	Complexo de triagem endossomal necessário para o transporte
EXOs	Exossomos
FA	Fase Acelerada
FB	Fase Blástica
FC	Fase Crônica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FISH	Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência
FT	Fator Tecidual
GIPB	Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores
GLOBOCAN	Global câncer statistics
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HSCs	Células-tronco humanas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Escala Internacional
IQR	Intervalo Interquartil
ITK	Inibidor de Tirosina quinase
LAAs	Antígenos associados à leucemia
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda

LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LSCs	Células-tronco leucêmicas
MMR	Resposta Molecular Maior
MVs	Microvesículas
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêutica
Ph+	Cromossomo Philadelphia
PLP	Plasma Livre de Plaquetas
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
qRT-PCR	Transcriptase reversa quantitativa de Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Transcriptase reversa de Reação em Cadeia da Polimerase
SAME	Sector de Atendimento Médico e Estatístico
SDF-1	Fator 1 derivado de células estromais
SIVE	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
SP	Sangue Periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCT	Transplante de Célula-Tronco
TFR	Remissão livre de tratamento.
VEs	Vesículas Extracelulares

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Hematopoese	17
2.2 Câncer	18
2.3 Neoplasias oriundas de tecidos hematopoiéticos	19
2.4 Leucemias	20
2.5 Leucemia Mieloide Crônica e sua fisiopatologia	22
2.5.1 História da LMC	23
2.5.2 Fases e diagnóstico da LMC	24
2.5.3 Tratamento da LMC	28
2.6 Vesículas extracelulares	34
2.6.1 Classificação das VEs	35
2.7 Microvesículas	39
2.8 MVs na LMC	42
2.9 Marcadores de superfícies celular e MVs	44
2.9.1 Marcador celular para Plaquetas	47
2.9.2 Marcador celular para linfócitos T	47
2.9.3 Marcador celular para linfócitos B	48
2.9.4 Marcadores celulares para Monócitos	48
2.9.5 Marcador celular para Células Dendríticas	49
2.9.6 Marcador celular para Células Endoteliais	49
2.9.7 Marcador celular para Eritrócitos	50
2.9.8 Marcador celular para Neutrófilo	50
2.9.9 Marcadores celulares para Células Progenitoras	51
3. OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral	53
3.2 Objetivo Específicos	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Aspectos Éticos:	54
4.2 Tipo e Área de estudo:	54
4.3 População de estudo:	54
4.4 Critérios de inclusão, exclusão e não-inclusão:	54
4.5 Riscos e benefícios:	55

4.6 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais:.....	55
4.7 Obtenção das amostras biológicas:	55
4.8 Obtenção das microvesículas (MVs):.....	57
4.9 Análise fenotípica das Mvs:	58
4.10 Análise descritiva e estatística:	59
4.11 Análise da Matriz de correlação e redes biológicas.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8. ANEXOS E APÊNDICES.....	99
8.1 Parecer consubstanciado do CEP/HEMOAM.....	99
8.1.1 Parecer da primeira submissão do Projeto.....	99
8.1.2 Parecer da segunda submissão: Emenda	103
8.2 Termo de Consentimento livre e esclarecido - TCLE.....	107
8.2.1 TCLE: Paciente	107
8.2.2 TCLE: Doador	111

INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica que atinge as células da linhagem mieloide e uma das características da doença é a presença do cromossomo Philadelphia na maioria dos pacientes diagnosticados, este é resultado da translocação entre os cromossomos 9 e 22, que vai traduzir uma oncoproteína com sua atividade tirosina quinase aumentada¹.

A LMC é responsável por cerca de 15% de todas as leucemias e tem incidência de 1 a 2 casos por 100 mil habitantes por ano. Pode ocorrer em pessoas de qualquer idade, entretanto é mais comum entre os 40 e 60 anos e tem uma leve predominância no sexo masculino^{1,2}.

A história natural da LMC antes da introdução de inibidores de tirosina quinase (ITK) era bifásica ou trifásica: a Fase Crônica (FC) indolente seguida por uma Fase Blástica (FB), com ou sem uma Fase Acelerada (FA)³. O diagnóstico da LMC, geralmente, acontece na fase crônica durante exames de rotina⁴. Contudo, se a doença não for tratada de forma eficaz, a LMC pode evoluir para Fase Blástica, podendo se assemelhar à leucemia aguda⁵.

Visando entender melhor a LMC e ajudar no prognóstico da doença, tratamento e acompanhamento desses pacientes, percebeu-se a importância de estudar o papel das Microvesículas nos pacientes com LMC, já que as Vesículas Extracelulares são importantes mediadores de comunicação intercelular⁶.

As Vesículas Extracelulares (VEs) fazem parte de um grupo heterogêneo de partículas que são liberadas por vários tipos de células, e se formam no sistema endossômico ou por brotação da membrana plasmática⁷. Elas são classificadas no mínimo em três populações: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos⁸. A caracterização é feita a partir das diferenças de tamanho, biogênese, composição e funções⁹.

O papel principal das VEs é promover a comunicação entre as células¹⁰. Há evidências que apontam que as microvesículas (MVs) participem de vários processos fisiológicos e patológicos e sua liberação é substancialmente maior durante a progressão do câncer⁷. Alguns estudos sugerem que elas têm potencial de biomarcador para fins de diagnóstico, prognóstico e monitoramento de pacientes, além de alvos terapêuticos¹⁰.

Conhecer o perfil das MVs em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica e seu possível papel, é fundamental para sua avaliação enquanto biomarcador de prognóstico clínico para os tratamentos atuais, com o intuito à melhora na qualidade de vida dos pacientes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hematopoese

A hematopoese é o processo envolvido na produção e formação das células sanguíneas a partir de células-tronco humanas (HSCs) na medula óssea, com subsequente diferenciação e desenvolvimento celular, formando eritrócitos, granulócitos, monócitos, plaquetas e linfócito^{1,11} (Figura 1).

A hematopoese inicia-se com uma célula-tronco pluripotente, que, por divisão celular assimétrica, tanto pode autorrenovar-se como pode dar origem a distintas linhagens celulares¹². Para que a hematopoese ocorra ela deve estar em um microambiente que seja capaz de reconhecer as células-tronco hematopoiéticas e fornecer fatores de crescimento necessários para apoiar a proliferação, diferenciação e maturação de células-tronco ao longo das linhagens comprometidas (mieloide ou linfóide), pois o microambiente influencia o comportamento e controla a proliferação celular¹. Caso ocorra desregulação no ciclo de divisão celular é possível o desenvolvimento de neoplasias ou câncer^{1,11,12}.

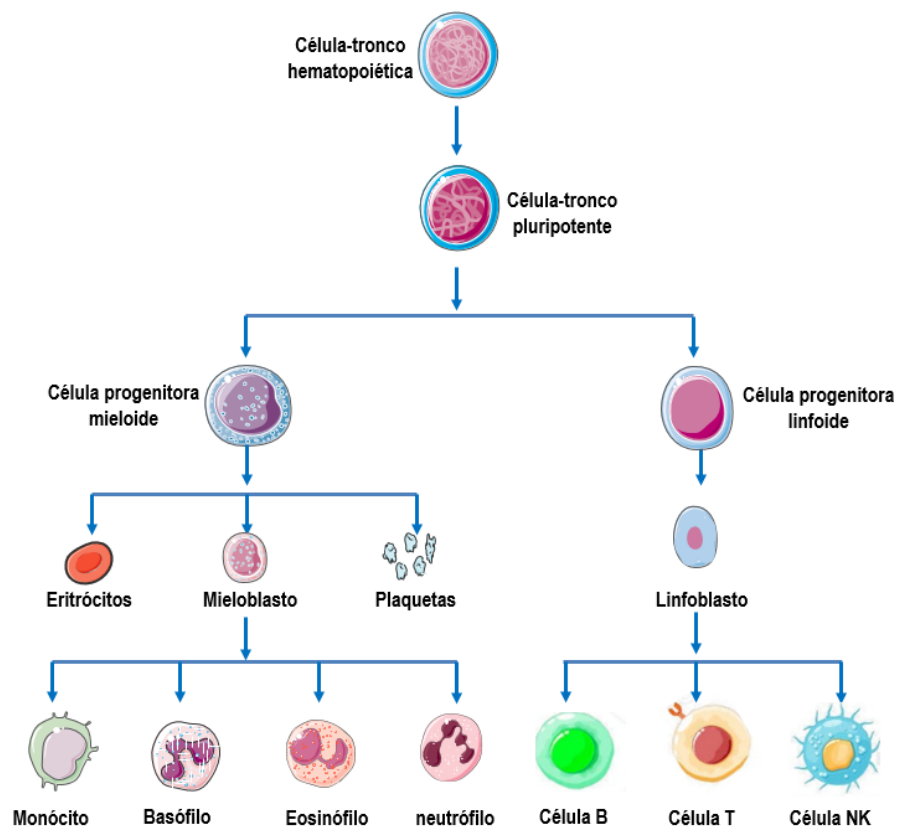


Figura 1. Diagrama mostrando as linhagens celulares originadas da célula-tronco hematopoiética da medula óssea.

Fonte: adaptado de Jagannathan-Bogdan, 2013¹¹.

2.2 Câncer

Câncer é o nome usado para descrever as formas mais agressivas de neoplasia, é um processo patológico caracterizado por uma proliferação celular descontrolada. Ele é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade na maioria dos países¹³ de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹⁴. A nomenclatura dos diferentes tipos de câncer está relacionada ao tipo de célula que deu origem a neoplasia¹⁵ (Quadro 1).

Quadro 1. Nomenclatura dos tipos de câncer¹⁵

Nomenclaturas dos tipos de câncer	
Sarcomas	Tumores malignos originados dos tecidos conjuntivos (mesenquimais).
Carcinomas	Tumores malignos originados dos epitélios de revestimento.
Neoplasias hematopoiéticas	Cânceres do sistema sanguíneo, tais como leucemia e linfoma.

A Global cancer statistics (GLOBOCAN) estimou 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes por câncer em 2018^{13,16}. O risco acumulado de incidência indica que 1 em cada 8 homens e 1 em cada 10 mulheres desenvolverão a doença durante a vida¹⁶, e que independentemente do nível de desenvolvimento humano, o câncer é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo^{14,16}.

Já em 2020, a Global cancer statistics (GLOBOCAN) indicou um aumento nos novos casos e mortes por câncer, sendo 19,3 milhões e quase 10 milhões respectivamente. O risco cumulativo de desenvolver e morrer de câncer foi de 1 em cada 5 homens ou mulheres desenvolve a doença e 1 em cada 8 homens e 1 em 11 mulheres morrem por causa dela. Segundo Sung et al.¹⁴ “estima-se que 28,4 milhões de novos casos de câncer ocorram em 2040, um aumento de 47% dos 19,3 milhões de casos correspondentes em 2020, assumindo que as taxas nacionais estimadas em 2020 permaneçam constantes”.

A ocorrência de novos casos e a mortalidade por câncer é crescente em todo o mundo^{14,16}. Em parte, isso é reflexo do envelhecimento populacional, pois nessa fase há uma diminuição da imunidade, da fagocitose, das modificações do microambiente medular, de

mutações mieloides¹⁷. Além disso, considera-se o crescimento populacional como um reflexo das modificações na prevalência e na distribuição dos principais fatores de risco para o câncer, dos quais estão relacionados ao desenvolvimento socioeconômico^{13,14,16}.

O número de casos novos de câncer, no Brasil, também cresce a cada ano. O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou, para 2018/2019, a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil para cada um desses anos¹⁸. Para o triênio 2020-2022, a estimativa indicou a ocorrência 625 mil casos novos¹³. E a última estimativa realizada pelo INCA para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer¹⁹ (Figura 2).

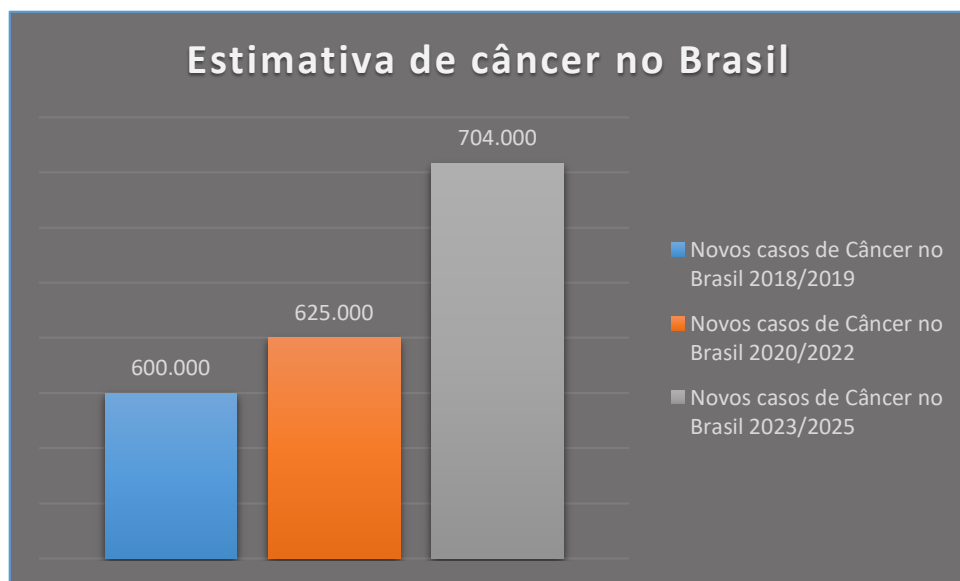


Figura 2. Comparação das estimativas de novos casos de câncer no Brasil.
Fonte: Estimativa INCA: 2020 e 2023^{13,19}.

Conhecer essas estimativas é importante, pois, segundo a OMS, cerca de 40% das mortes por câncer poderia ser evitada. Por meio delas, gestores, profissionais da saúde e sociedade em geral poderiam utilizá-las como ferramenta na implementação das ações de prevenção e controle de câncer¹⁸.

2.3 Neoplasias oriundas de tecidos hematopoiéticos

Entre os tipos de câncer, as neoplasias hematológicas são doenças que se expressam por alterações localizadas no sangue ou em tecidos formadores dele²⁰. Os cânceres de sangue pertencem a um grupo heterogêneo de doenças malignas²¹, e podem ser originados da evolução

clonal do compartimento das células-tronco hematopoiéticas ou da transformação de células progenitoras com potencial imunológico. Os principais grupos de neoplasia oriundas dos tecidos hematopoiéticos são os linfomas, mielomas e leucemias^{1,22}.

Os avanços nos cuidados dos pacientes com neoplasias hematológicas, nos últimos anos, têm melhorado a sobrevida e a qualidade de vida desses pacientes. Porém, ressalta-se a complexidade e os detalhes para se chegar ao diagnóstico e, conseqüentemente, o prognóstico dessas doenças²¹. Segundo os dados nacionais dos Registros de Câncer de Base Populacional mostram que as Neoplasias hematológicas correspondem a 5% do total de novos casos de todas as neoplasias e 7% de todos os óbitos por câncer²². Por isso, é necessário que o monitoramento da morbimortalidade por câncer seja contínuo na gestão da saúde, tornando-o instrumento essencial para o estabelecimento de ações de promoção da saúde, prevenção e controle do câncer e dos seus fatores de risco²¹.

2.4 Leucemias

A leucemia é uma das doenças malignas mais comuns que afetam a população mundial²³. A nível global, em 2018, a leucemia foi classificada como o décimo quinto câncer mais comum diagnosticado com 437.033 casos e 309.006 óbitos, totalizando a décima primeira causa de morte por doenças malignas^{16,23}. Já em 2020 houve um aumento na estimativa para 474.519 de novos casos de leucemia e um aumento para 311.594 na mortalidade^{14,24}.

Na América do Sul, segundo a OMS, através do relatório da GLOBOCAN 2020²⁴ a incidência de Leucemia foi de 25.700 novos casos, e a taxa de mortalidade foi estimada em 18.684 casos de mortes. Tanto a incidência mundial de casos novos e mortalidades quanto a incidência na América do Sul indicaram que homens são mais afetados que mulheres.

Para o Brasil, o número estimado de casos novos de leucemia para cada ano do triênio 2023-2025, é de 11.540 casos, sendo 6.250 casos em homens e de 5.290 em mulheres. Isso corresponde a um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 para cada 100 mil mulheres (Figura 3). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, na região Norte, a leucemia é a sexta mais frequente em homens (4,53/100 mil) e a sexta mais frequente em mulheres (3,64/100 mil)¹⁹.

No Amazonas, em 2020, houve uma estimativa de 180 novos casos de leucemia, dos quais 130 foram registrados na capital, Manaus¹³. Para este ano, em 2023, a previsão é de 200 novos casos no estado, com uma estimativa de 140 novos casos em Manaus¹⁹. Porém, segundo as estimativas de população do IBGE, a população de Manaus corresponde a aproximadamente 53% da população do Estado do Amazonas²⁵. Logo, infere-se um déficit em torno de 25% de casos esperados para o diagnóstico na população do interior do Estado do Amazonas.

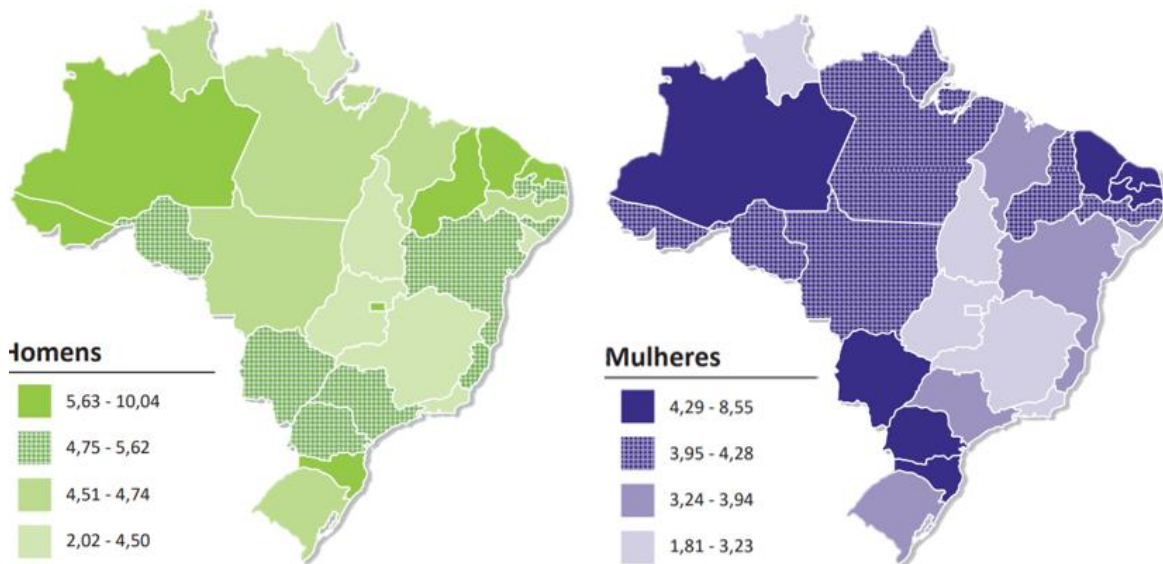


Figura 3. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens/mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação.
Fonte: Estimativa INCA:2023¹⁹.

O Brasil tem um território com extensão continental²⁵, mas não tem estratégia nacional e nem financiamento para a ciência para atender às necessidades do país, somente 8,5% dos médicos que trabalham exclusivamente no Sistema Único de Saúde (SUS) classificam como bom o acesso ao diagnóstico e tratamento do câncer, e como agravante, a pandemia de Covid-19 aprofundou dificuldades e aumentou desigualdades entre o SUS e o setor privado²⁶.

No Amazonas, além de ser um estado extenso territorialmente, ele é conhecido pela sua particularidade do transporte local, devido sua densa malha fluvial que entrecorta o estado impedindo o deslocamentos por via terrestre dos pacientes vindo dos interiores e dificultando, assim, a hemovigilância do Centro de referência em Hemoterapia e Hematologia do Amazonas²⁷.

A leucemia é classificada conforme o tipo de célula acometida e dependendo da velocidade de progressão da doença. Caso as células afetadas sejam da linhagem linfóide é denominada leucemia linfóide. Quando o alvo são as células mielóides são chamadas de leucemia mielóide, e de acordo com a progressão da doença as leucemias podem ser classificadas em agudas ou crônicas²⁸.

Combinando as duas classificações, existem quatro tipos mais comuns de leucemia: leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfóide crônica (LLC), e Leucemia mielóide crônica (LMC)^{3,28,29}.

2.5 Leucemia Mielóide Crônica e sua fisiopatologia

A Leucemia Mielóide Crônica é uma neoplasia mieloproliferativa^{1,2,30,31} que se origina de uma célula-tronco hematopoiética alterada^{1,32} e apresenta em 95% dos casos^{28,33} o cromossomo Philadelphia (Ph⁺) que é resultado da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ^{1,30,32-34} e produz um gene de fusão *BCR* :: *ABL1*^{1,32,34} que traduz uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase aumentada^{30,33,35} (Figura 4).

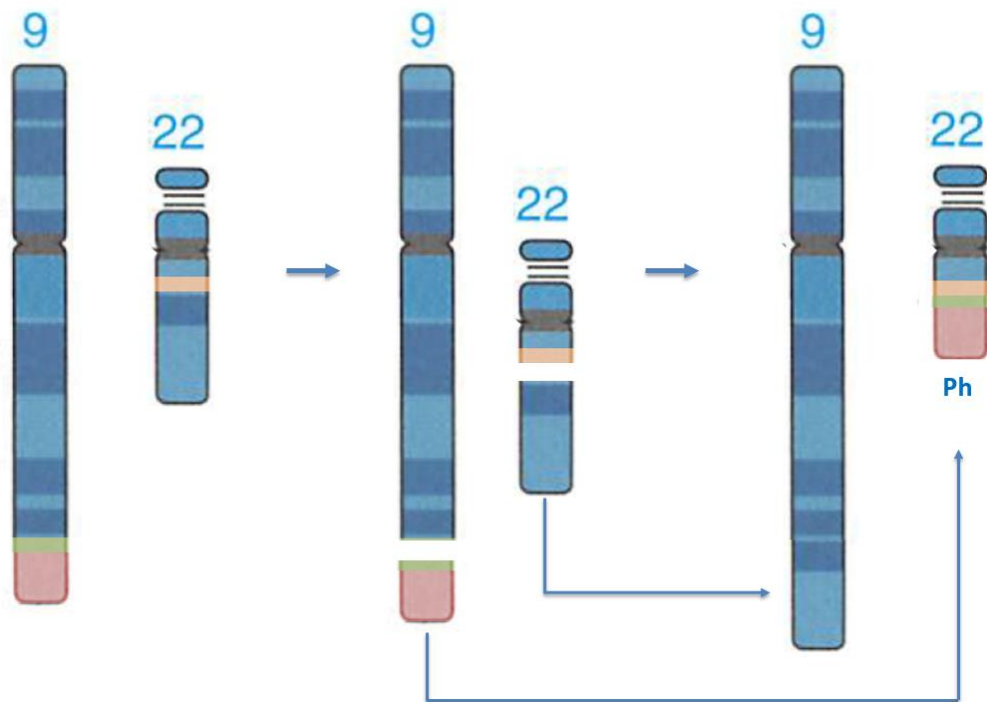


Figura 4. Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22
Fonte: adaptada de Nussbaum, 2021 e de Apperley, 2015^{32,36}.

Essa oncoproteína BCR::ABL pode variar em tamanho dependendo do ponto de quebra dentro do gene *BCR*^{5,37}. Essa interrupção ou quebra do gene pode ocorrer em uma das três posições, chamadas de maior-bcr (M-bcr), menor-bcr (m-bcr) e micro-bcr (μ -bcr)³⁷, e dessa forma traduzir uma proteína de fusão de tamanho 190 kDa, 210 kDa ou 230 kDa. Na LMC o fenótipo BCR::ABL1 p210 é encontrado em 95% dos pacientes do que o fenótipo BCR::ABL1 p190, que é mais encontrado em paciente com LLA Filadelfia positivo (Ph+), apenas 1% dos pacientes com LMC apresenta o p190, já a proteína p230 foi pouco descrita na literatura⁵. O ponto de quebra mais associado a LMC é M-bcr e codifica a oncoproteína p210, a forma p190 é traduzida se o ponto de quebra ocorrer na região m-bcr³⁷.

Além da atividade de tirosinoquinase aumentada, os efeitos celulares gerados por esse processo neoplásico, podem ser a quebra e danos no reparo da fita de DNA, falta de controle do ciclo celular típico, desregulação da adesão celular e inibição da apoptose e autofagia⁵ Como resultado patológico, a diferenciação das células é interrompida e blastos leucêmicos da linhagem mieloide se acumulam na medula óssea e no sangue periférico, prejudicando vários processos biológicos, como hematopoiese, metabolismo e resposta imune³⁸.

A LMC é uma doença responsável por cerca de 15% de todas as leucemias^{2,35,39} e possui incidência de 1 a 2 casos para cada 100 mil indivíduos por ano^{2,35,39,40}. Pode ocorrer em qualquer idade^{1,34}, porém a maioria dos pacientes é diagnosticada após a quarta década de vida⁴¹, apesar de que alguns estudos também indicam que o pico pode ocorrer entre os 60 e 70 anos^{5,40}, com uma leve predominância do sexo masculino^{1,5}.

Embora sua etiologia seja desconhecida, a exposição à radiação poderia ser um fator de risco. Tal implicação decorre de observações na população de sobreviventes da explosão da bomba atômica de Hiroshima, onde houve aumento da incidência relatada de LMC, ^{1,42} já que os casos se tornaram clinicamente evidentes, transcorrido de 3,5 a 6 anos do incidente⁴².

2.5.1 História da LMC

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC), foi descrita pela primeira vez em 1845, como Leucemia Granulocítica Crônica.^{43,44} Em 1960, Nowell e Hungerford⁴⁵ identificaram, em amostras de sangue de pacientes com LMC, um cromossomo pequeno, que foi chamado de “cromossomo diminuto” - uma descoberta que marcou o início de uma nova era na hematologia, que levou ao foco atual na medicina molecular^{44,46}.

A identificação do cromossomo alterado ocorreu após aprimorarem um método de visualização de cromossomos em células mitóticas (cariótipo)⁴³, e esta foi a primeira alteração

genética encontrada diretamente ligada ao câncer⁴⁷. Este cromossomo mais tarde foi nomeado como o “cromossomo Filadélfia (Ph+)”⁴³, de acordo com o Comitê para a Normalização de cromossomos que sugeriram que os cromossomos transmutados são referidos pelo nome da cidade onde foram descobertos⁴⁴.

Anos mais tarde, o cromossomo Ph+ foi identificado como resultado de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22, resultando na fusão de *ABL proto-oncogene 1 (ABL1)*¹ e do ativador *BCR de RhoGEF e GTPase (BCR)*², o produto gerado é uma tirosina quinase com atividade aumentada⁴⁶. A tirosina quinase oncogênica BCR::ABL1 é responsável por iniciar e manter o fenótipo leucêmico das células. Essa oncoproteína também é responsável pela fosforilação, ativação e desregulação de proteínas de sinalização intracelular que regulam a sobrevivência e o crescimento de células progenitoras na medula óssea⁴⁸.

2.5.2 Fases e diagnóstico da LMC

A história natural da LMC não tratada era classificada em três fases: uma fase crônica, uma fase acelerada e uma fase blástica, também chamada de crise blástica^{4,49}. A fase crônica da LMC apresenta-se relativamente indolente nos pacientes, com um aumento das células mieloides, tanto imaturas como as células maduras e também uma retenção da diferenciação hematopoiética. Este fenótipo facilita a identificação com precisão dos pacientes com LMC. Já os fenótipos na fase acelerada e na crise blástica são muito mais variados e agressivos comparados a fase crônica. Essas duas fases tem como característica uma diminuição severa da diferenciação celular, com a mudança de células maduras para blastos leucêmicos⁵⁰.

Em 2022, houve uma atualização na classificação da OMS em relação as fases da LMC tornando-se bifásica . Com a utilização dos inibidores de tirosina-quinase (ITK) e através do monitoramento cuidadoso da doença, tem-se observado uma redução significativa na incidência de progressão para a fase avançada, resultando em uma taxa de sobrevida global em 10 anos que varia de 80% a 90%. Desta forma, a Fase Acelerada (FA) tornou-se menos relevante, uma vez que a resistência causada por mutações da quinase *ABL1* e/ou anormalidades citogenéticas adicionais, bem como o desenvolvimento da Fase blástica (FB), têm sido identificados como os principais atributos que caracterizam a doença. Por isso, a FA foi omitida na classificação

¹ Nome oficial do gene aprovado pelo HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee – ID: HGNC 76, Atualizado em 04 de abril de 2023.

² Nome oficial do gene aprovado pelo HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee – ID: HGNC 1014, Atualizado em 09 de abril de 2023.

atual em favor de uma ênfase nas características de alto risco associadas à progressão da fase crônica e resistência ao inibidores tirosina quinase³ (Quadro 2).

Quadro 2. Evolução da LMC^{1,3}

Classificação antiga - Fases da LMC	
Fase Crônica - FC	<ul style="list-style-type: none"> - O sangue periférico mostra leucocitose $12-1000 \times 10^9/L$. - Neutrófilos em vários estágios de maturação com predominância de mielócitos e neutrófilos segmentados. - Blastos representam $< 2\%$ dos leucócitos. - A medula óssea mostra intensa hiperplasia celular com proliferação granulocítica e um padrão de maturação semelhante àquele no sangue.
Fase Acelerada - FA	<p>Geralmente, o paciente evolui para esta fase, devido não ter resposta terapêutica.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Apresenta contagem alta de leucócitos persistente ou crescente $> 10 \times 10^9/L$. - Persistência ou esplenomegalia crescente. - Persistência de trombocitopenia $< 100 \times 10^9/L$ ou trombocitose $> 1000 \times 10^9/L$. - Apresenta $\geq 20\%$ de basófilos no sangue periférico e 10-19% de blastos no sangue periférico e/ou medula óssea.
Fase blástica - FB	<ul style="list-style-type: none"> - A doença adquire características de leucemia aguda. - $\geq 20\%$ de blastos no sangue periférico ou na medula óssea - - Uma proliferação infiltrativa de blastos em um sítio extramedular, são diagnósticos da fase blástica da LMC.
Classificação atual – Atualização 2022	
Fase Crônica - FC	Mantida
Fase Blástica	<ul style="list-style-type: none"> - $\geq 20\%$ de blastos mieloides no sangue periférico ou na medula óssea; - Presença de proliferação extramedular de blastos; ou - Presença de linfoblastos aumentados no sangue periférico ou na medula óssea.

Geralmente, o diagnóstico dos pacientes com LMC ocorre na fase crônica⁴, durante consultas de rotina, através de exame de sangue e quase 50% dos recém-diagnosticados são assintomáticos^{1,5} Segundo Bavaro et al.⁴⁹, mais de 90% dos casos de LMC são diagnosticados na fase crônica. A suspeita acontece devido os achados clínicos e hematológicos típicos (Quadro 3), como o esfregaço de sangue periférico mostrando leucocitose com desvio à esquerda, basofilia e medula óssea hiperplasmática, com hiperplasia granulocítica³⁷ (Figura 5).

Quadro 3. Alterações Hematológicas¹

Alterações hematológicas
1. Leucocitose $200 \times 10^3/\mu\text{L}$. Um espectro completo é visto no sangue periférico de células mieloides.
2. Aumento de basófilos no hemograma.
3. Anemia normocítica normocrômica é comum.
4. Contagem de plaqueta aumentada (mais frequente), normal ou diminuída.
5. Medula óssea hiper celular com predominância granulocitopóética.
6. Presença do gene de fusão BCR-ABL1 por análise RT-PCR e cromossomo Ph + na análise citogenética.
7. Ácido úrico sérico geralmente aumentado.

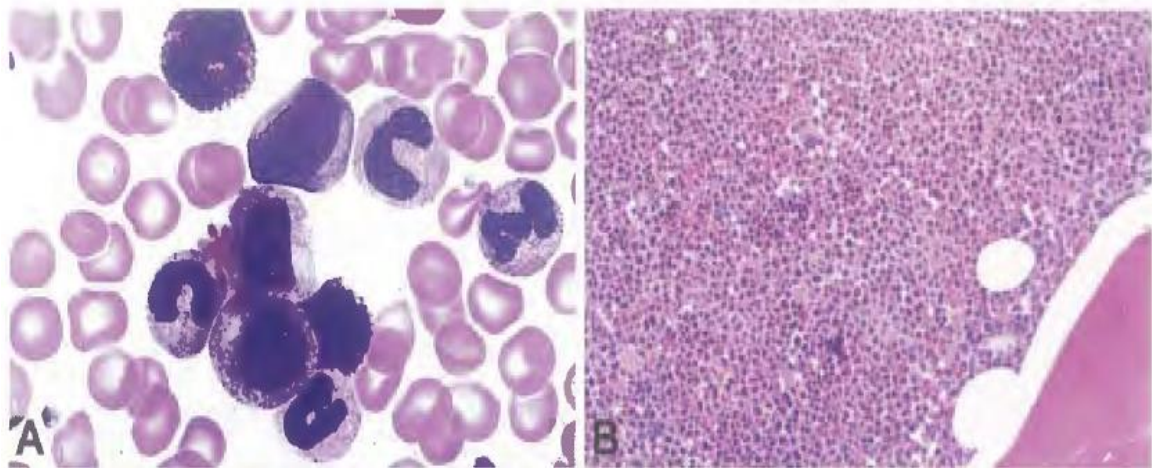


Figura 5. Microscopia da Leucemia mieloide crônica (Fase crônica). **A)** Esfregaço de sangue periférico mostrando leucocitose e células neutrofílicas em vários estágios de maturação; a basofilia é proeminente; **B)** Biópsia de medula óssea mostrando marcada hiper celularidade devido à proliferação granulocítica.

Fonte: Swerdlow SH et al. 2017¹.

O diagnóstico é confirmado com a presença do cromossomo Philadelphia (Ph+) e /ou com a proteína BCR::ABL1¹ no sangue periférico ou nas células da medula óssea⁵¹ através de testes moleculares e citogenético (Quadro 4). Com base na anamnese, exame físico e dados laboratoriais, é possível identificar o estágio da doença e direcionar o tratamento mais adequado ao paciente⁵.

Quadro 4. Exames ao diagnóstico e no monitoramento de pacientes com LMC⁵²

Exames ao diagnóstico e tratamento
1- Mielograma: necessário para avaliação da morfologia, contagem de blastos e basófilos e determinação acurada da fase da doença;
2- Citogenética/Cariótipo: Para demonstração do cromossomo Philadelphia e avaliar presença de mutações cromossômicas adicionais;
3- RT-PCR qualitativo ou quantitativo: Recomendado para a identificação do tipo específico de rearranjo BCR::ABL1 ao diagnóstico (RT-PCR qualitativo), sendo este outro fundamental para o monitoramento e acompanhamento do tratamento (RT-PCR quantitativo). Também possibilita diagnóstico em pacientes Philadelphia negativos;
4- Hibridização <i>in situ</i> ou FISH: para BCR::ABL1: deve ser realizado quando não for possível estabelecer o diagnóstico por cariótipo ou RT-PCR.
Exames quando há falha terapêutica
1) Mielograma: para determinar fase da doença;
2) Cariótipo: para avaliação da evolução clonal;
3) Pesquisa de mutações de ponto no gene <i>BCR :: ABL1</i> .

Se a doença não for tratada de forma eficaz, a LMC poderá evoluir⁴, e então progredir para a crise blástica, que nesta fase se assemelha à leucemia aguda^{5,49}. Nos casos em que a LMC apresenta sintomas/sinais clínicos (Quadro 5), os aspectos gerais são fadiga, mal-estar, perda de peso, suores noturnos e anemia, e cerca de 50% dos pacientes têm esplenomegalia palpável¹.

Quadro 5. Aspectos clínicos da LMC³²

Sintomas/ Sinais clínicos da LMC	
- Frequentes: 1. Fadiga; 2. Suor noturno; 3. Febre 4. Mal-estar; 5. Perda de peso; 6. Dor no quadrante superior esquerdo; e 7. Esplenomegalia.	- Menos frequentes: 1. Priapismo; 2. Hemorragias retinianas; 3. Trombose, sangramento ou ambos; 4. Dor óssea; 5. Hepatomegalia; 6. Linfadenopatia; 7. Infiltração cutânea 8. Massa extramedular

Os parâmetros hematológicos e clínicos são usados como base para definir as fases da doença. No entanto, a resistência a medicamentos, ou o surgimento de anormalidades cromossômicas adicionais em células com Ph⁺ (ACA) levantam preocupações para a progressão da doença⁵² e exige um monitoramento mais próximo desses pacientes, pois o aparecimento de ACAs no tratamento é visto como evolução clonal e tem sido associado à evolução da doença, uma vez que a frequência dos ACAs é maior nas fases avançadas⁴⁹.

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto (PCDT), há outros critérios que sugerem que a LMC está passando por um estágio de transformações, além do apresentado no quadro 2, como: evolução citogenética clonal observada após a cariotipagem diagnóstica, anormalidades cromossômicas adicionais nas células com Ph⁺, duplo Ph, trissomia 8, isocromossomo17q, trissomia 19, ou qualquer anormalidade cromossômica nas células com o Ph⁺ adquirida durante a terapia. Todas essas características são indicativos de progressão da doença^{1,53}.

O reconhecimento da progressão da doença é importante para fins de tratamento e prognóstico. Sinais clínicos como febre e perda de peso e sintomas relacionados a anemia grave, trombocitopenia, aumento da contagem de leucócitos e aumento do baço são caracterizados clinicamente nos casos de evolução da doença e sem acompanhamento e tratamento adequado, essa transformação das fases da LMC pode ocorrer em 3 – 5 anos após o diagnóstico¹. Com terapia direcionada e um cuidadoso monitoramento da doença, a incidência da FB diminui e a taxa de sobrevida global de 10 anos da LMC aumenta para 80-90%^{1,3}.

2.5.3 Tratamento da LMC

No Brasil, o tratamento dos pacientes com LMC é realizado de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, que recomenda o uso de inibidores de tirosina quinase (ITK)⁵⁴. Porém, antes do tratamento iniciar com o inibidor, pode ser administrado, por um curto período, hidroxiuréia nos pacientes sintomáticos com contagem elevada de glóbulos brancos ou plaquetas, enquanto a confirmação molecular e citogenética do diagnóstico de LMC estiver pendente⁵².

Até os anos 2000, entretanto, era limitado a agentes inespecíficos, como busulfan, hidroxiuréia e interferon alfa. Quando surgiu o inibidor da tirosina quinase (ITK) foi um marco para o tratamento dos pacientes com LMC⁴. O benefício foi tamanho com a introdução do primeiro ITK, que os resultados do tratamento em muitos pacientes melhoraram a ponto de

mostrar uma rápida diminuição da carga da doença abaixo do limite de detecção de ensaios, como na citogenética da medula óssea⁵⁵.

O mesilato de imatinibe ou imatinibe foi o primeiro ITK a conseguir a aprovação para o tratamento de pacientes com LMC pela Food and Drug Administration (FDA)⁵⁶ e, também, o primeiro ITK desenvolvido que tem taxas de resposta altas em pacientes com LMC⁴². Segundo Feriotto e colaboradores, desde a introdução do imatinibe, a mortalidade anual na LMC diminuiu de 10–20% para 1–2%⁵⁶. Esse medicamento é padrão de tratamento para pacientes com Leucemia que apresentam o cromossomo Ph⁺⁵⁰, pois ele age na proteína híbrida traduzida devido a translocação dos cromossomos 9 e 22⁴² e influenciou uma resposta hematológica e citogenética completa na maioria dos pacientes na fase crônica^{50,57}, sendo considerado o medicamento de primeira linha ou primeira geração para tratamento dos pacientes com LMC^{35,58}.

A terapia com os ITK tem como objetivo principal atingir uma resposta citogenética completa, e esta acontece quando as células com Ph⁺ não são mais detectáveis na medula óssea, em um período de 12 meses após o início do tratamento. Em pacientes sem tratamento prévio com ITK, o imatinibe é o medicamento de primeira escolha para o tratamento das 3 fases da doença⁵⁵.

Em caso de falha do tratamento de primeira linha ou intolerância a medicação, os ITK de segunda geração são recomendados⁵³. Dasatinibe e Nilotinibe são os inibidores utilizados como segunda linha no tratamento dos pacientes com LMC pois eles surgiram após o imatinibe e por isso são chamados de segunda geração⁵⁹. Eles são mais potentes do que o imatinibe, inibem vários mutantes BCR::ABL1 resistentes ao imatinibe⁵² e também podem ser usados como medicamentos de primeira linha. Contudo, o mais indicado é que sejam usados por pacientes que não podem tomar o imatinibe devido as reações adversas ou porque o mesmo não está fazendo o efeito desejado^{59,60}.

O Dasatinibe tem toxicidade pleuro-pulmonar, de modo que a insuficiência respiratória e doenças pleuro-pulmonares ou pericárdicas prévias ou concomitantes são fortes contraindicações ao uso deste medicamento como tratamento de primeira linha. Histórico de doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral ou doença arteriooclusiva periférica também representa uma forte contraindicação para o uso de Nilotinibe como terapia de primeira linha entre outros efeitos⁵².

Se a falha terapêutica ocorrer também com a segunda linha de tratamento, o paciente poderá utilizar o outro inibidor de segunda geração que ainda não tenha utilizado. Se os três inibidores do tratamento falharem, principalmente no caso de perda de resposta citogenética e hematológica, a única opção para esses pacientes é o transplante de células-tronco alogênico (Figura 6), visto que os ITKs de terceira geração não estão disponíveis no mercado brasileiro⁵⁴, apesar da Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia listar o Ponatinibe como um medicamento aprovado no Brasil, no PCDT do Ministério da Saúde esse medicamento não está recomendado para tratar os pacientes com LMC^{53,60}.

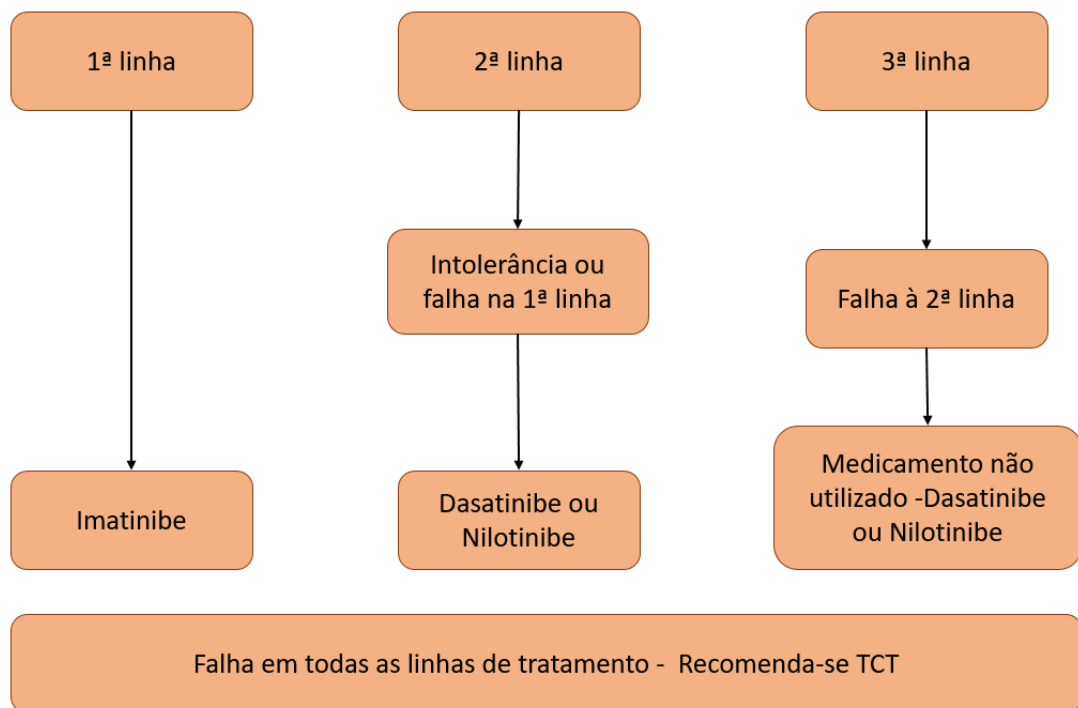


Figura 6. Esquema de escolha de tratamento para pacientes com LMC. TCT: Transplante de células-tronco.

Fonte: Adaptado do PCDT da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto⁵³.

A resposta ao tratamento com ITKs é o mais importante fator prognóstico⁶¹. É relevante para os pacientes com LMC em terapia o monitoramento molecular, pois ele fornece informações prognósticas e ajuda a determinar se um paciente está respondendo bem ou não ao tratamento⁶². A resposta molecular deve ser analisada de acordo com a Escala Internacional (IS) como a proporção de transcrições de *BCR:: ABL1* para transcrições de *ABL1*⁵², e monitorada usando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) do transcrito *BCR :: ABL1*, um ensaio que pode detectar apenas uma célula maligna em 100.000 células não

malignas⁵⁵. Deve ser expressas e relatadas em % do *BCR :: ABL1* em uma escala logarítmica, em que 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% e 0,001% correspondem a uma diminuição de 2, 3, 4, 4,5 e 5 logs, respectivamente⁵² (Quadro 6).

Quadro 6. Resposta molecular – Nível de transcrição⁵²

Monitoramento molecular
1. $BCR-ABL1 \leq 1\%$ - equivale à remissão citogenética completa (CCyR).
2. $BCR-ABL1 \leq 0,1\%$ - equivale à resposta molecular maior (MMR) ou MR ³ .
3. $BCR-ABL1 \leq 0,01\%$ - equivale à doença indetectável em cDNA com > 10.000 transcrições ABL1 ou MR ⁴
4. $BCR-ABL1 \leq 0,0032\%$ - equivale à doença indetectável em cDNA com > 32.000 transcrições ABL1 ou MR ^{4,5}
5. $BCR-ABL1 \leq 0,001\%$ - equivale à doença indetectável em cDNA com > 100.000 transcrições ABL1 ou MR ⁵

A resposta ao tratamento e monitoramento dos níveis de transcrição *BCR :: ABL1* pela IS pode ser classificada em Ótima, Alerta e Falha e devem ser averiguadas em períodos de três meses, seis meses, doze meses e qualquer tempo^{52,61} (Quadro 7). A investigação das respostas ao tratamento possibilita o monitoramento da doença, propiciando mudanças na terapia se houver necessidade, já que as reações adversas resultante do uso dos ITKs podem causar a não adesão ao tratamento e influenciar na qualidade de vida dos pacientes^{54,61} já que o tratamento e acompanhamento da LMC deve ser realizada por toda a vida⁵⁴.

O estágio e curso da doença é um fator importante a ser considerado na hora da escolha do tratamento⁵⁷. Leva-se em consideração para a escolha de terapias, a eficácia, tolerabilidade, toxicidade precoce e tardia e custos de medicamentos. Porém, ultimamente, vem crescendo o foco na qualidade de vida desse paciente e na prevenção de toxicidades orgânicas de longo prazo e, também, na possibilidade de maximizar estratégias para interromper a terapia com ITK resultando na chamada "remissão livre de tratamento"⁵².

Quadro 7. Avaliação da resposta Terapêutica⁵²

Tempo	Resposta ótima	Alerta⁶¹ ou aviso	Falha
Linha de base		Alto risco de ACA	
3 meses	BCR-ABL ^{IS} ≤10% Ph ≤35% (PCyR)	BCR-ABL ^{IS} >10% Ph+ 36-95%	Ph+ >95%
6 meses	BCR-ABL ^{IS} ≤1% Ph +0% (CCyR)	BCR-ABL ^{IS} 1-10% Ph+ 1-35%	BCR-ABL ^{IS} >10% Ph+ >35%
12 meses	BCR-ABL ^{IS} ≤0.1% (RMM)	BCR-ABL ^{IS} 0.1-1%	BCR-ABL ^{IS} >1% Ph+ >0%
Qualquer tempo	RMM ou melhor	ACA/Ph	Perda de CCyR Perda de MMR, confirmar** Mutações ACA/Ph+

** em dois consecutivos testes, do qual um ≥ 1%; IS: BCR-ABL na Escala Internacional; RMM: resposta molecular maior; ACA/Ph: anormalidades cromossômicas adicionais em células Ph.

Como a expectativa de vida dos pacientes com LMC está se aproximando da população em geral, e alcançando um número significativo de pacientes com resposta molecular profunda sustentada⁵⁷, o propósito para muitos pacientes, agora, é a remissão sem tratamento⁶³. É possível considerar uma tentativa de descontinuação do tratamento, se a remissão molecular profunda sustentada for alcançada por uma duração suficientemente longa^{52,64}. Hoje, falamos de cura funcional, quando o paciente mantém o resultado de 4,5 log por 3 anos consecutivos^{65,66}. Pode-se então, sugerir a suspensão da medicação, porém é obrigatório seguir alguns requisitos para a descontinuação do ITK, como por exemplo, concordar em ser monitorado frequentemente após a interrupção do tratamento (mensalmente nos primeiros 6 meses, a cada 2 meses nos meses 6 a 12 e a cada 3 meses a partir de então)⁶⁶.

As respostas imunes adaptativas são disfuncionais em pacientes com LMC no momento do diagnóstico. Isso facilita a progressão e autopreservação do tumor, impedindo o desenvolvimento de respostas imunes antileucêmicas. No estudo de Hsieh e colaboradores, os dados clínicos mostraram que os pacientes tratados com imatinibe ou dasatinibe exibem expansão de células T citotóxicas CD8+ ou células NK que estão associadas a uma melhor resposta à terapia⁶⁷ (Figura 7).

As células NK estão associadas à sobrevida livre de recidiva molecular, pois pacientes com maior porcentagem de células NK, no momento da descontinuação do medicamento,

tinham maior probabilidade de permanecer em remissão⁶⁸. Ilander e colaboradores relataram que as células NK secretam citocinas TNF- α /IFN- γ , que são capazes de ativar as células T. Eles observaram que em pacientes não recidivantes, o número de células NK estava associado a uma resposta do tipo Th1 de células T CD4 +, que também podem contribuir para a imunidade antitumoral. E levantaram a hipótese de que o aumento de células NK maduras podem ser capazes de matar diretamente as células tumorais e potencializar as respostas imunes adaptativas contra a leucemia, mantendo assim a remissão após a descontinuação do imatinibe⁶⁹.

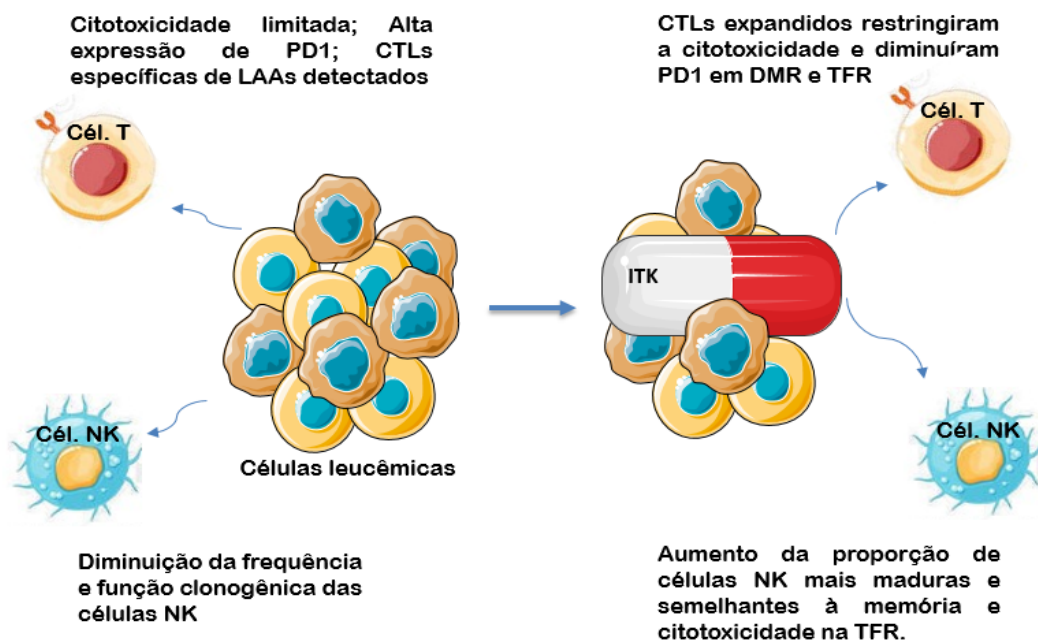


Figura 7. Efeito imunológico – Esquema à esquerda – efeitos da LMC em células imunes, células natural killer (NK) e células T citotóxicas (CTLs), sem tratamento. Esquema à direita – efeitos nas células CTLs e NK após o tratamento com ITKs. Antígenos associados à leucemia (LAAs), morte programada (PD1), remissão livre de tratamento (TFR), resposta molecular profunda (DMR).

Fonte: adaptado de Hsieh, 2021⁶⁷.

A vigilância imunológica de células leucêmicas residuais é um fator crítico para a manutenção da remissão livre de tratamento. Quando a maioria das células de LMC são eliminadas com o tratamento, as células imunes podem limitar o crescimento das células leucêmicas residuais fazendo com que a remissão sem tratamento seja sustentável. Desta forma, a compreensão das características imunológicas e seus mecanismos de interação das células imunes com células da LMC contribuem no desenvolvimento de novas imunoterapias, visando as células residuais para melhorar as taxas de remissão livre de tratamento⁶⁷.

2.6 Vesículas extracelulares

As Vesículas Extracelulares (VEs) fazem parte de um grupo variado e heterogêneo de estruturas membranosas que são liberadas por diversas células e se originam em grande parte do sistema endossômico e/ ou da membrana plasmática^{7,70}. Elas contêm em seu interior várias proteínas, lipídios, glicolipídios, glicoproteínas e ácidos nucleicos, incluindo DNA, mRNA e RNAs não codificantes. E por isso elas têm o potencial de fornecer várias mensagens aos tecidos circundantes⁷. A partir do momento que as VEs são liberadas no espaço extracelular, elas podem alcançar as células receptoras e transferir seu conteúdo para obter respostas funcionais, podendo promover mudanças fenotípicas que afetarão sua condição fisiológica ou patológica⁷⁰ (Figura 8).

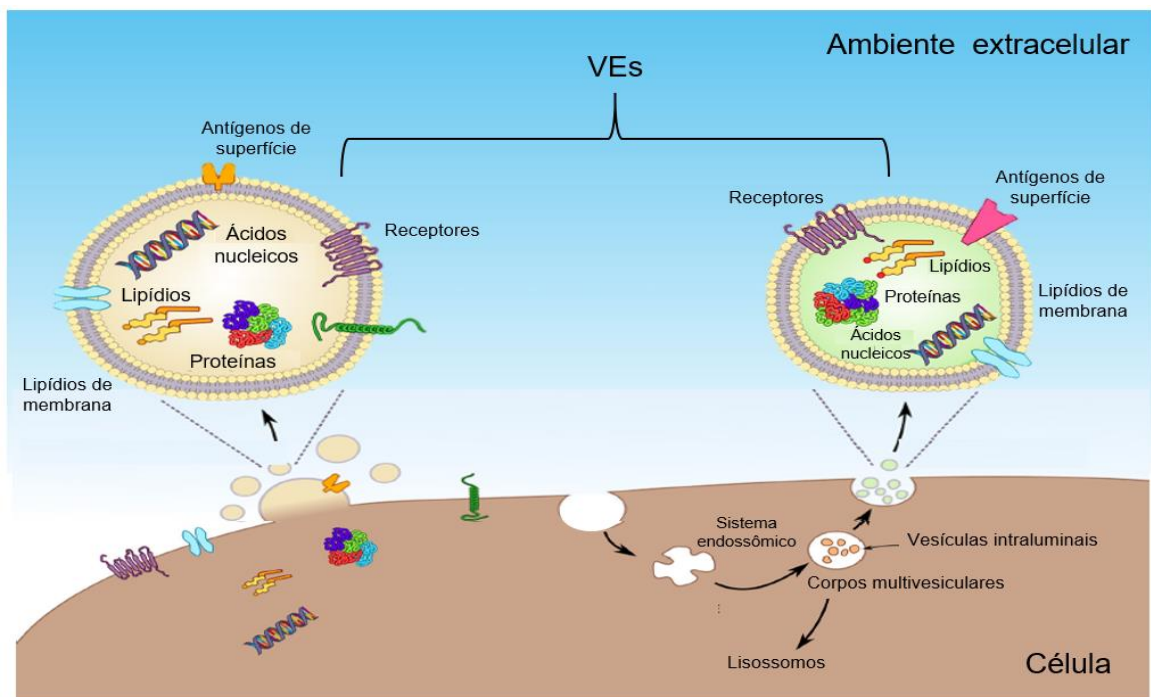


Figura 8. Origem das Vesículas Extracelulares. Vesículas surgindo a partir do brotamento da membrana plasmática ou do sistema endossômico.

Fonte: Adaptado de Słomka, 2018⁹

A comunicação intercelular é uma característica essencial dos organismos multicelulares e pode ocorrer através de transferências de moléculas segregadas ou contato direto entre célula-célula. Nos últimos 30 anos, surgiu um terceiro mecanismo de comunicação entre as células que envolve a transferência intercelular por meio de vesículas extracelulares^{6,71}. As VEs surgiram como um novo e importante mecanismo de comunicação intercelular,

principalmente devido sua capacidade de transferir seu conteúdo biológico composto por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos para as células receptoras^{8,70}.

A comunicação entre as células mediadas por VEs pode acontecer por meio do acoplamento na membrana plasmática, seguida pela ativação dos receptores e sinalização de superfície, a célula pode internalizar essa vesícula através da endocitose ou as VES podem se fundir a célula alvo. A interação da vesícula com a superfície celular, a transferência de cargas vai depender da origem das VEs e da origem das células receptoras⁷⁰.

Nas últimas décadas houve um aumento do interesse da comunidade científica em estudar VEs, devido a descoberta de que elas estão presente nos fluidos corporais⁷² como sêmen, leite materno, líquido amniótico, fluido de ascites, líquido cefalorraquidiano, bile⁷¹, urina, saliva e sangue^{7,71}, transportam RNA, mostram uma gama de funções regulatórias⁷¹ e também devido a possibilidade de usá-las como biomarcadores para acompanhar a progressão de vários estados patológicos, por exemplo, para avaliar o risco de progressão e metástase tumoral ou para fornecer biomarcadores precoces de doenças neurodegenerativas⁷⁰. As funções das VEs nesses processos fisiológicos e patológicos vão depender da capacidade das VEs de interagir com as células receptoras e fornecer seu conteúdo (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos como o RNAs)^{71,73}.

Para se estabelecer uma definição clara e precisa das VEs são necessários vários debates pela comunidade científica, como por exemplo, o fato das VEs serem liberadas de diferentes tipos de células, o que resulta em suas variadas composições e funções. Além disso, elas são liberadas através de mecanismos diversos, variam em tamanhos (30 a 2.000 nm de diâmetro), por isso, são usados diferentes métodos analíticos para seu isolamento e identificação a partir do meio extracelular⁹. Por isso, conhecer os mecanismos moleculares envolvidos na biogênese das VES e no recrutamento de carga nos ajudará a decifrar seu papel nos processos fisiológicos. Pensando em resolver esses desafios a comunidade científica criou a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (SIVE) para padronizar métodos para purificação mais precisos das VEs para a implementação em um ambiente clínico como biomarcadores, vacinas ou dispositivos de administração de medicamentos⁷¹.

2.6.1 Classificação das VEs

As VEs podem ser classificadas no mínimo em três populações principais: exossomos (EXOs), microvesículas (MVs, também foram chamadas de vesículas de liberação,

micropartículas^{71,73} ou ectossomos⁷⁴) e corpos apoptóticos (APOs)^{6,8,9,75}. Há também uma população de VEs que parecem ser exclusivas das células cancerosas, surge diretamente da membrana plasmática e sua formação não coincide com o aumento das taxas de morte celular, sendo uma classe única com biogênese diferente dos APOS, elas são chamadas de grandes oncossomas (OGs) e tem capacidade de transferir material oncogênico e seu tamanho é atípico variando de 1-10 μm ⁸ (Figura 9). Todos esses tipos de VEs possuem características em comum, como tamanho nanométrico, compostas por bicamadas fosfolipídicas com formato esférico e a presença de proteínas, receptores de membrana e ácidos citosólicos originários de sua célula de origem⁹ e apresentam propriedades estruturais que podem, por vezes, se sobrepor⁶.

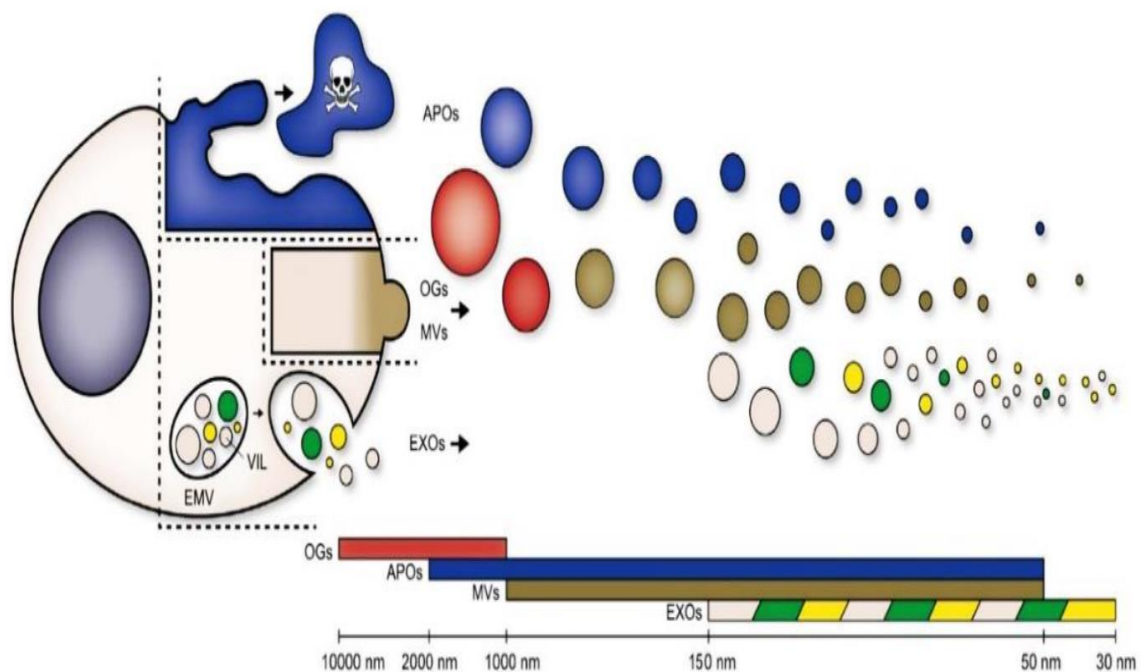


Figura 9. Liberação das populações heterogêneas de VEs. As células liberam populações heterogêneas de VEs com tamanhos sobrepostos. Os APOs (azul) são liberados por células submetidas à apoptose. OGs (vermelho) e MVs (marrom) são derivados diretamente da membrana plasmática. EXOs (mix de cores) são derivados de compartimentos endossomais intracelulares. VIL – Vesículas Intraluminais; EMV – Endossoma Multivesicular.

Fonte: Adaptado de Wilms, 2018⁸

Os EXOS são formados como vesículas intraluminais dentro de um corpo multivesicular, e depois são secretados pela fusão do corpo multivesicular com a membrana plasmática^{7,75}. Eles têm tamanho que variam de 30 a 100 nm de diâmetro⁷⁶, mas outras pesquisas mostram que eles podem chegar a um tamanho de 120nm⁸ a 150nm de diâmetro^{9,73}.

Existem dois mecanismos envolvidos na geração de EXOs. Um deles depende do Complexo de triagem endossomal necessário para o transporte (ESCRT), enquanto o outro é independente do ESCRT. Naturalmente, nem todas as vesículas intraluminais se tornam EXOs, já que parte dos corpos multivesiculares se fundem com lisossomos e sofrem degradação^{9,70} (Figura 10).

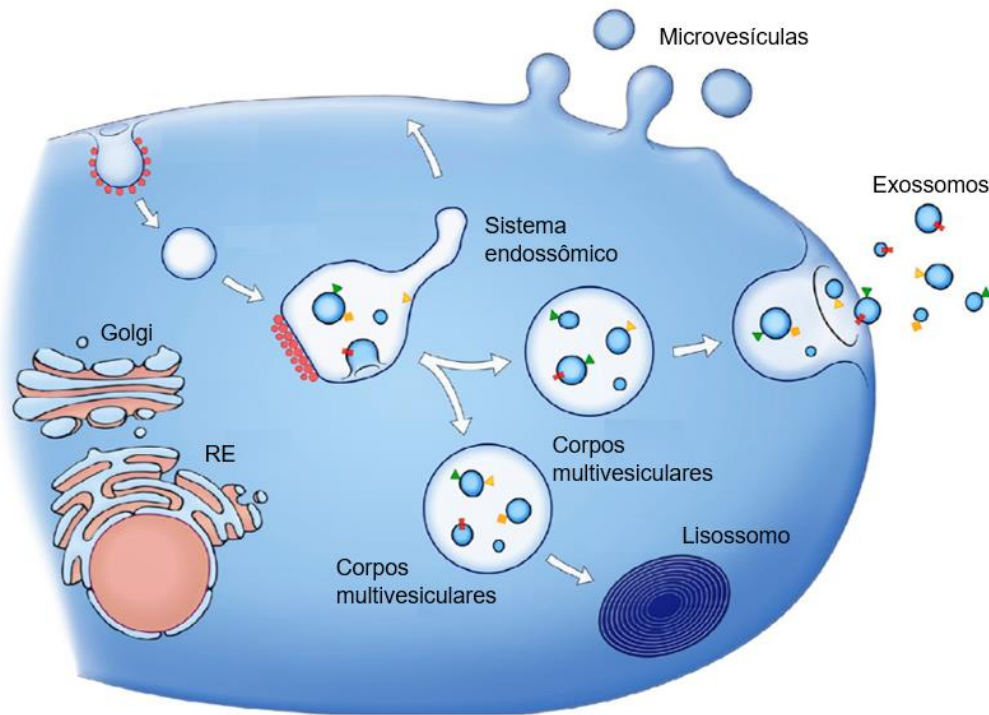


Figura 10. Processo de Liberação de Exossomos e Microvesículas.
Fonte: Raposo e Stoorvogel, 2013⁷¹.

As MVs são formadas por brotamento externo direto da membrana plasmática de células e pela subsequente fissão dessas vesículas no meio extracelular^{7,70,75}. Em relação ao tamanho das MVs, há um autor que afirmar que elas têm um tamanho maior que 100nm de diâmetro⁷⁶, outro que elas podem variar de 50nm a 1000nm⁸ enquanto Izadirad e colaboradores encontraram um tamanho de 100nm a 1000nm de diâmetro⁷³. As MVs são conhecidas principalmente pelo seu papel na coagulação sanguínea, porém, estudos recentes mostraram que elas tem um papel na comunicação intercelular em vários tipos de células, englobando as células cancerígenas, estas são chamadas de oncossomas e podem ser bem maiores chegando até 10 μ m^{7,70}.

Os corpos apoptóticos (APOs) são formados durante a formação de bolhas e fragmentação celular após ocorrer a morte celular programada, chamada de apoptose⁷. Os APOs

são liberadas através da ruptura da célula. Seu tamanho varia 50 e 2.000 nm de diâmetro⁸, mas há autores que afirmam que podem chegar a 5000nm de diâmetro⁷³, sendo possível encontrar em seu interior organelas citosólicas e/ou fragmentos nucleares¹⁰. Portanto, é possível notar a complexidade de estudar a caracterização das populações de VEs puras, devido a sobreposição na composição, e biogênese⁸ (Figura 11).

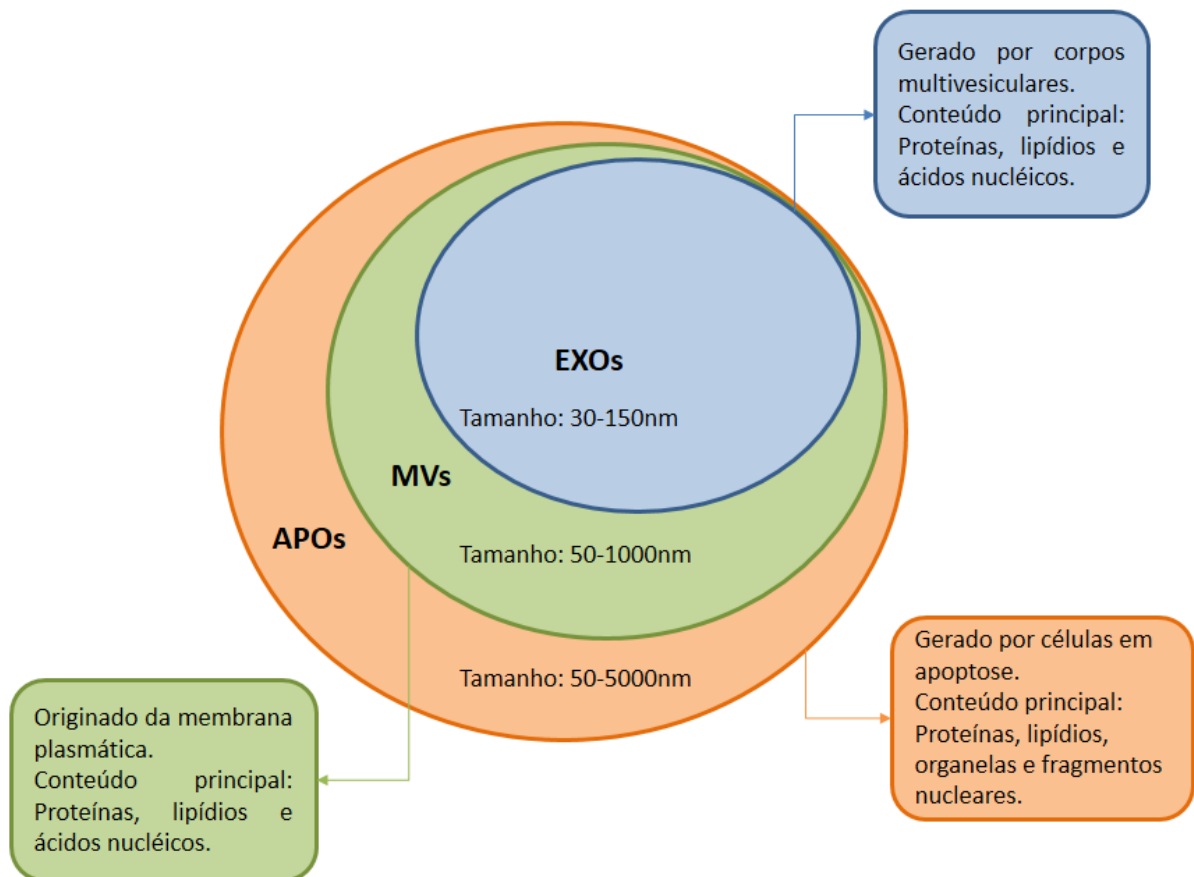


Figura 11. Características das três principais populações de VEs em termos de tamanho, biogênese e conteúdo.

Fonte: adaptado de Forte et al.,2021⁷⁷

Em 2017, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (SIVE), propôs classificar as VES tendo como base as condições de centrifugação em: VES sedimentando a $100.000 \times g$ serão classificadas como VEs pequenas, em vez de exossomos; VEs sedimentando em velocidades inferiores a $20.000 \times g$ em VEs médias no lugar dos termos microvesículas e ectossomos. E VEs sedimentando a $2.000 \times g$ serão VEs grandes para grandes fragmentos de células, grandes corpos apoptóticos. Como essas recomendações são novas, a maioria dos autores ainda usam os termos anteriores⁹.

Estudos indicam que a maioria dos tipos de células formam e liberam VES, no entanto, parece que o estresse celular e a doença frequentemente regulam positivamente sua formação e alteram a carga contida dentro delas⁷. Em neoplasias hematológicas, como na leucemia, as VEs demonstraram participar do crescimento do tumor primário, bem como estimular resistência a vários medicamentos por meio do recrutamento de células residentes no microambiente, como células endoteliais ou leucócitos^{73,78}.

2.7 Microvesículas

A liberação de MVs se inicia por brotamento externo da superfície da membrana plasmática, seguida por um evento de fissão que, de várias maneiras, se assemelha ao passo de abscisão na citocinese. Durante esse processo de abscisão as membranas opostas se unem antes de beliscar a conexão da membrana e separar as células filhas. No entanto, a composição das MVs vai depender do tipo de célula que a originou, mas a composição da membrana das MVs permanece um pouco diferente da célula parental, pois parece ocorrer uma remodelação significativa com o enriquecidas de algumas moléculas, por exemplo o colesterol, possibilitando funções especializadas. Ou seja, nem todas as proteínas e moléculas da membrana plasmática são incorporadas nas vesículas¹⁰ (Figura 12).

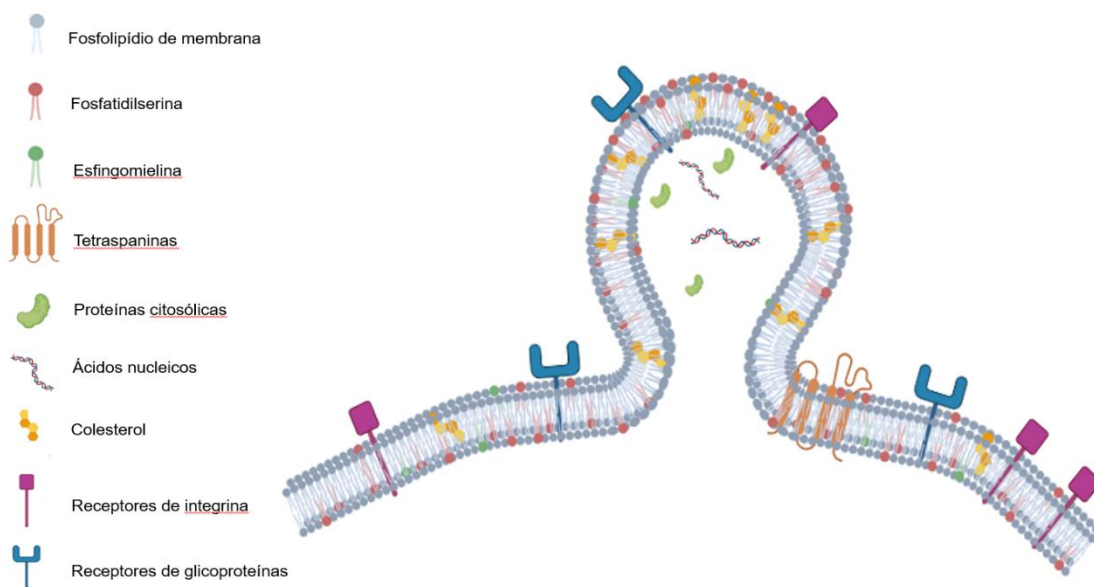


Figura 12. Composição das MVs.

Fonte: Criada através do BioRender, adaptado de Chari et al., 2010¹⁰.

O colesterol presente na membrana plasmática, por exemplo, tem um papel importante na origem das MVs, pois sua diminuição reduz a formação de MV. A ceramida, um lipídio com

formato de cone, que viabiliza a flexão da membrana, também demonstrou regular a formação de MVs⁷. A fosfatidilserina é realocada para o folheto da membrana externa, especificamente em locais na superfície celular onde vai ocorrer a liberação de microvesículas, enquanto a topologia das proteínas da membrana permanece intacta^{10,70}. A maioria das MVs expõe a fosfatidilserina em sua membrana. Porém, outras revisões sugerem outro antígeno de superfície das MVs, o fator tecidual. Essas MVs estão sendo cada vez mais utilizadas para avaliar complicações tromboembólicas em variadas condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. Uma gama de moléculas bioativas (proteínas, lipídios e ácidos nucléicos) que podem ser transportadas por MVs de célula em célula, permite que essas partículas de tamanho nanométrico desempenhem muitas funções na coagulação, inflamação, câncer e angiogênese⁹.

Estudos indicam que a concentração extracelular de cálcio pode abalar a origem das MVs, o seu aumento pode induzir uma forte liberação de MVs⁷⁰. Isso se torna interessante, pois a sinalização do cálcio se apresenta frequentemente desregulada no câncer e diferentes oncogenes e supressores de tumor afetam sua regulação. Esses estudos demonstraram que níveis aumentados de cálcio levam ao embaralhamento dos fosfolípidios da membrana e também ao aumento da formação de MVs em eritrócitos e plaquetas e um mecanismo parecido nas células cancerosas pode ser visto⁷.

Diversas funções biológicas foram atribuídas as VEs nos últimos anos, e agora se sabe que os EXOs e MVs representam importantes veículos de comunicação intercelular entre células próximas ou distantes⁷¹. Portanto, o papel das microvesículas é promover a comunicação entre as células das quais elas derivam e seus ambientes circundantes¹⁰. Essas VEs são liberadas por diferentes tipos celulares, tanto no espaço intersticial quanto em fluídos corporais, podendo chegar a longas distâncias até serem capturadas por células receptoras, podendo promover mudanças fenotípicas que afetarão sua condição fisiológica ou patológica^{6,70}. Elas atuam em diversos processos fisiológicos, como no reparo tecidual, na coagulação sanguínea e na manutenção das células tronco, bem como em processos patológicos, como em distúrbios imunológicos, doenças neurológicas, disseminação de oncoproteínas e propagação de agentes patogênicos, como o vírus do HIV⁶.

A comunicação entre as células mediadas por VEs pode acontecer por meio do acoplamento na membrana plasmática, seguida pela ativação dos receptores e sinalização de superfície, a célula pode internalizar essa vesícula através da endocitose ou as VEs podem se fundir a célula alvo. A interação da vesícula com a superfície celular, a transferência de cargas

dependem da origem das VEs e da identidade e origem das células receptoras⁷⁰. A maneira que ocorrerá a captação de carga das MVs pelas células receptoras podem ser por fusão simples entre as membranas plasmáticas com a deposição direta de carga no citoplasma ou por captação das vesículas intactas por meio de um mecanismo de tráfego que as leva para um compartimento endossômico ou lisossomal⁷. A absorção dessas VEs pelas células receptoras ocorre por vários modos: internalizadas por endocitose mediada por clatrina ou independente de clatrina, como macropinocitose e fagocitose, ou por endocitose mediada por caveola e jangadas lipídicas, ou podem apenas permanecer na membrana plasmática da células ligadas a sua superfície^{7,70}.

As VEs estabelecem interações com a superfície de suas células-alvo, seguidas em muitos casos pela fusão com a membrana plasmática ou membranas endocíticas. Essa interação entre célula-alvo e VEs se assemelha à interação análoga de células hospedeiras com a de alguns vírus, que são construídas em torno de uma glicoproteína central que atua como um 'ativador' de sua ligação à superfície celular. Estudos recentes, levaram a uma compreensão melhor desse processo de interação e mostraram que as mesmas VEs podem se ligar de maneiras diferentes a várias células-alvo. Por exemplo, quando as MVs liberadas da microglia interagem com outras células microgлияis, eles começam a rolar sobre a superfície até atingir locais apropriados para a internalização⁷⁴.

Estudos demonstraram que a quantidade de microvesículas perdidas pelas células tumorais se correlaciona com sua capacidade de invasão *in vitro*¹⁰. Foi percebido, que um dos papéis principais das MVs na progressão do tumor é a habilidade de alterar o comportamento de outros tipos de células facilitando assim a sobrevivência das células tumorais. Dessa forma, as MVs podem facilitar a progressão do tumor ao orientar a carga citotóxica para as células imunes circulantes⁷. Como estão envolvidas em processos angiogênicos e podem afetar a sobrevivência / apoptose celular em órgãos distantes como baço e fígado em doenças hematológicas. Afetam também os processos metastáticos e o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas⁷⁹.

Além das implicações das MVs em relação a sobrevivência e progressão do tumor, há também seu papel na resistência aos medicamentos. Foi observado que as MVs mediam o derramamento de quimioterápicos promovendo a sobrevivência celular, e o número de MVs formadas após o tratamento com fármacos tem correlação com sua resistência quimioterápica⁷, coincidindo com um aumento progressivo da gravidade da doença⁷⁴.

Muitos pesquisadores testaram as MVs como potenciais biomarcadores prognósticos e preditivos para a progressão do câncer¹⁰. Nos dias de hoje, muitos autores definem MVs, e também exossomos, como uma "biópsia líquida", o que as torna uma alternativa a uma biópsia clássica, que tem como característica várias limitações. Por outro lado, até que um método analítico preciso, rápido e barato seja desenvolvido, o uso de MVs como biomarcador será bastante incomum⁹.

Como discutido anteriormente, as VEs podem acumular-se em vários fluidos corporais e suas análises podem revelar a presença de VEs em doenças específicas, ou alguns de seus componentes ser reconhecido como biomarcadores para o diagnóstico da doença e terapia personalizada. Além disso, o aumento ou diminuição desses biomarcadores pode fornecer informações sobre o estado dos pacientes e pode ser usado como indicador prognóstico⁷⁴.

2.8 MVs na LMC

As MVs carregam informações valiosas sobre o câncer, e a sua quantidade liberada, fenótipo e carga molecular, incluindo proteínas, lipídios, metabólitos e ácidos nucleicos, espelham a natureza e a origem das células parentais^{76,80}, contribuindo para a progressão de malignidades, influenciando o sistema imunológico, criando um microambiente propício para um fenótipo favorável de progressão tumoral e leucêmica⁸¹.

Estudos prévios sugeriram que as VEs, principalmente as MVs, estão envolvidas na inflamação, regulação imunológica, metástases tumorais e angiogênese, podendo também ser indicadores para o diagnóstico e prognóstico da doença⁸². No geral, elas modulam as células alvo transferindo proteínas e miRNA para células vizinhas, elevando a expressão da proteína na membrana da célula alvo e induzindo as vias de sinalização celular que afetam as funções celulares, incluindo diferenciação, proliferação, migração, invasão e apoptose^{79,83,84}.

Além disso, MVs contendo moléculas de coagulação e adesão, desempenham um papel central na iniciação da coagulação e formação de trombos. A exposição celular a citocinas ou quimioterapia resulta na secreção de microvesículas bem como a ação de quimioterápicos levam à ativação plaquetária e geração de MVs associados ao aumento do risco de trombose. Desta forma, gatilhos adicionais, como proteínas da cascata do complemento, estados de hipóxia, irradiação ou lesão oxidativa aumentam o número de VEs liberadas pelas células⁷⁹.

Estudos recentes apontam que as MVs derivadas da linhagem celular LAMA84 LMC, por meio da secreção de interleucina-8 (IL-8), podem induzir a expressão das moléculas de

adesão intercelular 1 (ICAM-1) e de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) em células endoteliais da veia umbilical humana. Esse processo tem sido associado ao aumento na adesão e migração de células da LMC. É importante notar que as moléculas ICAM-1 e VCAM-1 podem mediar a adesão de células leucêmicas às células endoteliais, o que sugere que a liberação de IL-8 de MVs derivadas de células leucêmicas pode contribuir com o desenvolvimento do processo trombótico nessa doença maligna^{79,85,86}.

As MVs da LMC podem liberar de forma livre e invasiva o gene *BCR :: ABL1* das células da LMC em neutrófilos normais e, em seguida, influenciar sua função na medula óssea. Embora VEs normais possam direcionar a medula óssea a prevenir a leucemia metastática, as MVs leucêmicas podem promover a mobilização de neutrófilos que podem desempenhar um papel importante na invasão leucêmica e metástase. Isso pode explicar por que a maioria das malignidades hematológicas, especialmente a leucemia, progride rapidamente⁸⁷.

Um estudo mostrou que as MVs derivadas das células leucêmicas K562 continham o mRNA do *BCR :: ABL1*. Após a incubação com MVs positivas para o oncogene *BCR :: ABL1*, as células mononucleares derivadas de transplantes normais apresentaram um fenótipo maligno semelhante à leucemia tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi observado que a transferência horizontal do mRNA *BCR :: ABL1* das MVs para as células receptoras foi um fator crítico para a transformação⁸⁸.

Um outro estudo mostrou que VEs liberados das células de LMC estimulam as células do estroma da medula óssea a produzir interleucina (IL-8), um potente fator pró-angiogênico que modula *in vitro* e *in vivo* o fenótipo maligno das células leucêmicas^{76,79}. Em outro estudo, Jin Cai e colaboradores descobriram que as MVs derivadas de tumor podem “educar” as células normais em direção a um fenótipo tumoral. O gene híbrido *BCR :: ABL1* que foi transferido de MVs de células de LMC, foram injetadas em ratos e induziram em características parciais de LMC, 2 meses após a administração⁸⁷.

As MVs também estão envolvidas em processos angiogênicos⁸⁹ que podem desempenhar um papel significativo na comunicação do microambiente da medula óssea e podem afetar a sobrevivência/ apoptose celular em órgãos distantes como baço e fígado em doenças hematológicas⁷⁹. Além disso, está bem estabelecido que a hipóxia desempenha um papel no aumento da angiogênese tumoral. Muitos estudos demonstraram que a exposição de células cancerígenas humanas à hipóxia aumenta o desprendimento de microvesículas, a fim de modificar seu microambiente para facilitar a angiogênese e metástase de tumores⁷⁶.

A superfície das MVs dos pacientes contém uma série de marcadores que podem ser rastreados por citometria de fluxo e são usados rotineiramente no diagnóstico de células malignas características de uma determinada doença⁹⁰. Assim, as MVs podem ser utilizados como biomarcadores prognósticos para o monitoramento da doença em neoplasias hematológicas⁸⁵.

Por exemplo, no estudo de Zhang et. al as MVs derivadas de blastos de pacientes com LMC expressaram níveis aumentados de CD123 nas células CD34 + em associação com a progressão da doença. Assim, as MVs derivadas de células CD34 + podem ser um preditor da progressão da doença e podem ser usadas como um marcador residual mínimo de doença⁸². Dada a baixa expressão de CD123 em células hematopoiéticas normais, a superexpressão desse marcador em MVs derivadas de células leucêmicas indicou a estimulação da proliferação de células de LMC⁸⁵. Devido ao papel das MVs no processo biológico e achado clínico na LMC, elas podem ser um potencial biomarcador de prognóstico e terapia alvo nessa doença^{80,85}.

2.9 Marcadores de superfícies celular e MVs

Os marcadores de superfície celular podem ser carboidratos ligados à membrana celular ou proteínas expressas na superfície das células e são utilizados para identificar diferentes tipos de células. Em resumo, os marcadores de superfície celular são como uma impressão digital, específicos para cada tipo de célula, e podem ser identificados de acordo com os tipos de marcadores presentes na membrana. Os mais comuns são o antígeno CD, também conhecido como moléculas CD (do inglês, *Cluster of differentiation*) e agrupamentos de diferenciação. As moléculas de CD podem atuar de várias maneiras, por exemplo, atuando como receptores ou ligantes importantes para a célula. É possível uma cascata de sinal ser iniciada, alterando o comportamento da célula. Nem sempre elas desempenham um papel na sinalização celular, mas podem ter outras funções, como a adesão celular⁹¹.

As MVs apresentam inúmeras proteínas e lipídios sinalizadores em sua superfície⁹², e por isso são conhecidas por terem uma assinatura única de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, refletindo sua célula e tecido de origem⁹³ e potencialmente, podem refletir a patologia molecular em diferentes doenças⁹⁴. As VEs são liberadas de muitos tipos de células, incluindo glóbulos vermelhos, plaquetas, linfócitos, células dendríticas, células endoteliais e células tumorais⁹⁵. À medida que as VEs circulam no sangue, eles podem atuar como vetores de transporte ou transdutores de sinal tanto no local quanto distante de seu local de origem, além de ajudar a remover moléculas indesejadas ou resíduos celulares afim de manter a integridade celular⁹².

Estudos têm demonstrado que o nível de liberação de MVs em doenças é significativamente maior do que os níveis normais. As microvesículas provêm de vários tipos de células, carregam ingredientes ativos que possuem semelhança com os componentes das células maternas e contêm alguns componentes ativos similares e marcadores específicos das células de origem. As células liberam MVs que carregam moléculas ativas das células parentais sob vários estímulos, incluindo proteínas de conteúdo e proteínas de superfície. Os componentes ativos protéicos expressos por MVs podem interagir com células-alvo, promover a adesão e internalização de VEs às células-alvo, induzir angiogênese e regular reações de coagulação⁹⁶. As MVs refletem não apenas o tipo de célula da qual ela foi liberado, mas também as vias de tráfego intracelular que levam essa carga à superfície celular. As cargas identificadas incluem várias formas de proteínas que variam de receptores de integrina, proteases ativas, várias pequenas GTPases, proteínas de resistência a múltiplas drogas e máquinas de processamento de miRNA⁹⁷.

Os lipídios expressos por MVs vêm principalmente dos componentes da membrana plasmática das células parentais, incluindo esfingosina-1-fosfato, fosfatidilserina, colesterol, ceramida, e ácido araquidônico^{93,98}. O ácido araquidônico e outras moléculas sinalizadoras de ácidos graxos poliinsaturados foram identificados como biomarcadores e determinados como envolvidos na regulação da resposta imune distal. Além disso, a cascata pró-coagulante e a regeneração da cartilagem mediadora também são funções fisiológicas importantes dos lipídios ativos. A fosfatidilserina e o fator tecidual (FT), que são expressos por MVs, estão envolvidos na ativação da cascata de coagulação no organismo. O FT é inibido em células em repouso porém, a esfingosina é hidrolisada após lesão por estresse, eliminando assim a inibição do FT, o que leva à ativação do mesmo, e afetando o efeito pró-coagulante das células receptoras. As microvesículas que contêm ácido araquidônico liberado após a ativação plaquetária também têm esse efeito pró-coagulante após serem ingeridas pelas células endoteliais. Além disso, várias moléculas ativas podem ser transferidas para células receptoras com a captação de MVs pelas células, mediando mudanças nos efeitos biológicos celulares⁹⁶.

As VEs exercem um papel importante na promoção de respostas imunes, afetando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. Exossomos derivados de células dendríticas aumentaram a atividade citotóxica de células Natural Killer. Além disso, MVs de células dendríticas induziram as células epiteliais a liberar citocinas pró-inflamatórias, MVs derivadas de leucócitos ativaram o endotélio, regulando positivamente as moléculas de adesão e liberando citocinas, levando ao recrutamento de leucócitos e as MVs plaquetárias afetaram a adesão de

monócitos ao endotélio⁹².

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando células-tronco cancerígenas depende principalmente do uso de marcadores de superfície celular para identificar, enriquecer e/ou isolar essas células leucêmicas, por exemplo. Um tanto de marcadores de superfície de células-tronco cancerígenas já foram identificados, mas é necessário mais investigações pois alguns marcadores são controversos. Curiosamente, a maioria dos marcadores de superfície de células-tronco cancerígenas atuais são derivados de marcadores de superfície de células-tronco adultas ou embrionárias normais conhecidas. A semelhança dos marcadores de superfície celular sugere que essas células-tronco cancerígenas se originam predominantemente de células-tronco normais por meio do acúmulo de alterações epigenéticas e genéticas. Para melhor isolar as células-tronco cancerígenas funcionais, é necessário procurar marcadores de superfície mais específicos ou usar vários marcadores de superfície em combinação⁹⁹.

As microvesículas circulantes são principalmente de origem plaquetária, eritrocitária, leucocitária e endotelial⁹². Ou seja, especificando os marcadores de superfície celular das células, é possível identificar as MVs derivadas de cada célula, por exemplo, o antígeno comum dos leucócitos, o marcador CD45 é uma proteína transmembrana essencial dos sistemas hematológico e imunológico. Todas as células-tronco hematopoiéticas expressam o marcador de superfície CD45, exceto plaquetas e eritrócitos.

Se uma MV for identificada com esse marcador, é possível afirmar que ela foi secretada por uma célula leucocitária^{94,100}, e desta forma ter certeza de qual população de MVs derivada das células está sendo estudada. Além do antígeno comum dos leucócitos, CD45, outros marcadores de superfície também foram analisados nesta pesquisa para diferentes células do sangue, como plaquetas (CD41a), linfócitos (CD3), eritrócitos (CD235a) e outros (Figura 13), assim como ocorreu nos estudos de Bonilla e colaboradores que usaram 20 marcadores celulares para realizarem a comparação de VEs em pacientes com síndrome da fadiga crônica¹⁰¹ e também no estudo de Miljkovic-Licina et al. que caracterizaram as vesículas de pacientes com leucemia mieloide aguda e linfoblástica de células B, mostrando como esses antígenos são potenciais biomarcadores da doença¹⁰².

2.9.1 Marcador celular para Plaquetas

O Marcador de superfície celular CD41a, é um receptor de glicoproteína mais abundante na superfície plaquetária. Os receptores GP IIb/IIIa são responsáveis pelas interações célula-célula e célula-proteínas em diversos processos biológicos e reconhecendo dois sítios específicos na molécula de fibrinogênio que está diretamente ligado a cascata de coagulação^{103,104}.

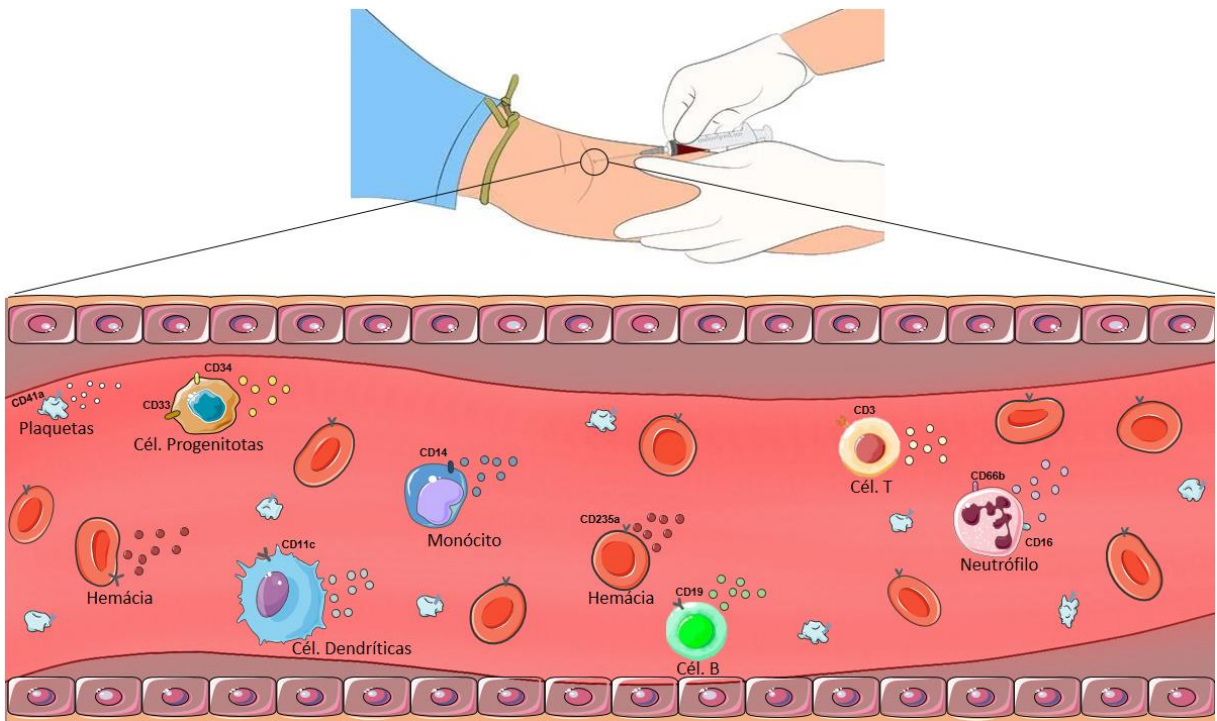


Figura 13. Liberação de MVs derivadas de células hematopoiéticas. Células na corrente sanguínea com seus marcadores específicos secretando MVs.

2.9.2 Marcador celular para linfócitos T

O complexo proteico CD3 é uma característica definidora da linhagem de células T, portanto, anticorpos anti-CD3 podem ser usados efetivamente como marcadores de células T¹⁰⁵. O complexo TCR-CD3 transmite o sinal para o citosol para ativar eventos de sinalização, além de ser a molécula chave para iniciar eventos bioquímicos na ativação e diferenciação de células T que podem levar a diferentes resultados, dependendo da quantidade e qualidade do estímulo¹⁰⁶.

2.9.3 Marcador celular para linfócitos B

O CD19 é uma proteína de superfície celular específica dos linfócitos B¹⁰⁷, e é regulado positivamente na etapa de comprometimento da linhagem B após a diferenciação da célula-tronco pluripotente¹⁰⁸. Ela faz parte da superfamília de imunoglobulinas. É uma glicoproteína de cadeia simples presente na superfície de linfócitos B e células dendríticas foliculares do sistema hematopoiético¹⁰⁹.

Essa proteína forma um complexo com várias proteínas de membrana, incluindo o receptor do complemento tipo 2 (CD21) e a tetraspanina (CD81) e esse complexo reduz o limiar para a ativação de células B iniciada por antígeno. A ativação desse complexo receptor de antígeno de célula B ativa a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase e a subsequente liberação de estoques intracelulares de íons de cálcio¹⁰⁷.

Pacientes com LMC expostos ao IFN- α e posteriormente tratados com imatinibe apresentaram níveis reduzidos de imunoglobulina e hipogamaglobulinemia. O imatinibe parece ter um efeito na desregulação da função das células B, já que a redução dos níveis de Ig foi maior em pacientes com resposta citogenética. Também foi observada perda de subconjuntos de células B de memória IgM em pacientes com LMC ao diagnóstico e após a remissão citogenética completa com imatinibe, sugerindo que os ITKs podem interferir na produção e manutenção da memória de células B⁶⁷.

As células que sofreram transformação neoplásica continuam expressando o antígeno CD19, tornando essa molécula uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de leucemias e linfomas por meio de anticorpos monoclonais (mAbs) e citometria de fluxo¹⁰⁸. A terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR-T) tem se destacado como uma história de sucesso clínico em malignidades de células B, e há esperança de que essa abordagem possa ser aplicada com êxito também em malignidades mielóides⁶⁷. Na pesquisa de Lu Zhou e colaboradores foi possível obter a remissão molecular completa e retorno à fase crônica em um paciente com LMC linfóide que possuía a mutação T315I no oncogene BCR-ABL1, após tratamento com a terapia anti-CD19 CAR-T¹¹⁰.

2.9.4 Marcadores celulares para Monócitos

Os Monócitos podem ser tipicamente definidos com base na expressão diferencial de CD14^{111,112}. Eles se apresentaram adequados para apresentação de antígenos, secreção de

citocinas, regulação de apoptose e diferenciação. Além disso, os números de monócitos CD14⁺ são expandidos no sangue de pacientes com infecções sistêmicas, o que implica que eles devem desempenhar um papel importante na defesa rápida contra patógenos¹¹³⁻¹¹⁵.

MVs derivadas de monócitos CD14⁺, podem estar ativamente implicados na homeostase vascular, através da regulação da função das células endoteliais e na coagulação do sangue por efeitos pró ou anticoagulantes. Esses efeitos podem ser combinados com a imunomodulação, principalmente pela indução da liberação de citocinas por outras células¹¹⁶.

2.9.5 Marcador celular para Células Dendríticas

O marcador de superfície CD11c é conhecido como integrina αX , e é o marcador de definição mais amplamente utilizado para células dendríticas¹¹⁷. As células dendríticas são fundamentais para o processo de captura e apresentação de antígenos às células T, tendo um papel crítico na regulação das respostas imunológicas do hospedeiro contra infecções e câncer¹¹⁸. O CD11c tem um papel importante na morte de células T citotóxicas, na adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio e induz a ativação celular^{119,120}. Foi descoberto que esse receptor interage com outras moléculas solúveis, como heparina e fibrinogênio, e com moléculas de adesão¹²¹.

2.9.6 Marcador celular para Células Endoteliais

O marcador CD51/CD61 é um complexo de integrina conhecido como integrina $\alpha_v \beta_3$. É expresso em níveis elevados em células endoteliais, osteoclastos e células de melanoma e em níveis baixos em plaquetas e macrófagos¹²². O aumento da expressão da integrina desempenha um papel na adesão da célula endotelial à matriz da membrana basal e na migração da célula endotelial¹²³.

O CD51/CD61, também é conhecido como receptor da vitronectina, e medeia a ligação das plaquetas à vitronectina imobilizada sem ativação prévia. Outros ligantes incluem proteínas contendo RGD, tais como fibrinogênio, fibronectina, fator de von Willebrand (vWf), laminina, trombospondina e a molécula de adesão neural L1. Atua também, como um receptor independente de ativação para fixação e disseminação de plaquetas em vitronectina e outras proteínas contendo RGD, incluindo componentes da matriz¹²². Além disso, CD51/CD61+ poderia ser um biomarcador específico para monitorar a disfunção endotelial devido está

envolvido em diferentes papéis fisiopatológicos, como por exemplo, em pacientes obesos com hipertensão devido sua alta expressão¹²⁴.

2.9.7 Marcador celular para Eritrócitos

Os eritrócitos também podem estar envolvidos em aspectos patológicos de muitas doenças, incluindo leucemias, doenças infecciosas e anomalias genéticas. Portanto, estudos sobre essas células são igualmente importantes para entender seu papel em diversas doenças. O marcador de superfície celular que independente da maturação celular a expressão permanece constante é a glicoforina-A (GPA) ou CD235a¹²⁵. As proteínas da membrana dos glóbulos vermelhos podem ser classificadas em proteínas transmembranares e proteínas periféricas da membrana que se associam ao lado citoplasmático da bicamada lipídica. A glicoforina-A, é uma única cadeia polipeptídica e está ligada a vários sialo-oligossacarídeos, que carregam alguns antígenos dos grupos sanguíneos M e N¹²⁶.

No estudo conduzido por Barr e colaboradores, foi constatado que os eritrócitos são capazes de participar da trombose, agindo como mediadores na adesão de plaquetas a uma superfície endotelial íntegra em um modelo de trombose mediada por FeCl₃¹²⁷. As MVs derivadas de eritrócitos também surgiram como mediadores potenciais da morbidade relacionada à transfusão pela ativação dependente da trombina do sistema complemento¹²⁸.

Além disso, níveis elevados de MVs CD235a⁺ foram detectados em pacientes com distúrbios hematológicos como β -talassemia, hemoglobinúria paroxística noturna, anemia falciforme, pré-eclâmpsia grave, síndrome nefrótica e doença de Crohn e na glicose-6 pacientes com deficiência de fosfato desidrogenase. Além de ser preditores sensíveis de eventos trombóticos em pacientes HIV trombocitopênicos¹²⁹. Devido ao seu conteúdo de hemoglobina e pela exposição da fosfatidilserina em sua membrana, as MVs CD235a⁺ podem ser responsáveis pela eliminação de óxido nítrico e aumento da atividade pró-coagulante. Além disso, as superfícies das MVs CD235a⁺ também são adequadas para as reações anticoagulantes do sistema da proteína C, devido à sua capacidade de se ligar à proteína S, sendo importante para equilibrar a coagulação *in vivo*¹²⁸.

2.9.8 Marcador celular para Neutrófilo

Os neutrófilos são os glóbulos brancos mais abundantes e são um componente essencial

do sistema imunológico inato. O CD66b e o CD16 são marcadores de superfície celular consistentemente expressos em neutrófilos, independentemente da localização da célula, nível de ativação e estado da doença^{130,131}. Além disso, os neutrófilos são altamente pró-inflamatórios; portanto, o acúmulo excessivo de neutrófilos somado à ativação prolongada podem resultar em dano tecidual como resultado de uma inflamação crônica e podem contribuir para a progressão da doença do câncer, favorecendo a metástase, angiogênese e inibindo células imunes antitumorais¹³².

Outro evento interessante, são as MVs derivadas neutrófilos que demonstraram ter efeitos antimicrobianos ao induzir a agregação bacteriana¹³³. As MVs também podem desempenhar um papel imunológico importante em suas células-mãe. Um exemplo disso é observado nas MVs derivadas de neutrófilos, que têm a capacidade de aumentar a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como IL-6 e moléculas de adesão em células endoteliais, facilitando assim sua transmigração através das barreiras endoteliais. Além disso, essas MVs são ricas em várias quimiocinas, o que sugere que elas podem desempenhar um papel fundamental na atração de leucócitos para o local da inflamação^{93,134}.

2.9.9 Marcadores celulares para Células Progenitoras

A imunofenotipagem na LMC tem um papel importante na análise dos blastos, e este está aumentado principalmente na fase blástica, porém a maioria dos pacientes com LMC são diagnosticados na fase crônica e os blastos normalmente representam <2% dos leucócitos nessa fase¹.

O CD34 ou proteína fosfoglicoproteína transmembrana foi identificada pela primeira vez em células-tronco e células progenitoras hematopoiéticas¹³⁵. É considerado um marcador comum de células progenitoras e é expresso por uma ampla gama de tipos de células, como células-tronco hematopoiéticas (HSCs), mesenquimais (MSCs) e células progenitoras endoteliais (EPCs)¹³⁶. O uso deste marcador para prognóstico, diagnóstico e tratamento de neoplasias tem sido cada vez mais discutido¹³⁵. Além de ser considerado como um marcador para progenitores hematopoiéticos, sua expressão nessas células tem sido aproveitada para aplicações de terapia celular em vários distúrbios hematológicos¹³⁶.

O CD33 é altamente expresso em células comprometidas com a linhagem mieloide da medula óssea e monócitos circulantes. A expressão de CD33 é regulada a níveis baixos em

granulócitos periféricos e macrófagos residentes, e é constitutiva em células dendríticas. Este padrão de expressão sugere um papel de CD33 na diferenciação mielóide e função celular de monócitos e células dendríticas¹³⁷.

O CD33, também conhecido como p67 ou Siglec-3, é uma proteína transmembrana do tipo I que pertence à superfamília das imunoglobulinas. Embora seja amplamente considerada como um receptor inibitório mielóide específico, alguns estudos sugerem que a molécula CD33 também pode estar presente em células da linhagem linfóide¹³⁸.

Essa molécula deve ser considerada como um antígeno hematopoiético restrito com expressão em linhagens mielóides e linfóides¹³⁷. Sugere-se que o CD33 possa exercer um papel regulador importante na proliferação e/ou diferenciação celular, modulando respostas inflamatórias e imunes. Estudos *in vitro* têm mostrado que essa proteína é capaz de suprimir constitutivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias¹³⁹.

As MVs celulares vêm se destacando com seu papel essencial na resposta hemostática e seu potencial como marcadores de doenças, mas também sua implicação em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos. As MVs carregam marcadores de suas células parentais, e podem ser usadas como ferramentas de investigação e diagnóstico¹²⁹.

Sabe-se que os estudos com MVs derivadas de neoplasias hematológicas são escassos^{76,79,89} e quase não há dados sobre seus efeitos e as características das MVs em estudos no Brasil. Desta forma, nos propusemos estudar a população amazonense diagnosticada com LMC visando a caracterização do perfil das MVs circulantes durante o tratamento, buscando identificar possíveis biomarcadores que possam contribuir com a literatura existente para que seja possível buscar novas possibilidades para os pacientes acometidos com esta doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil de MVs em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica ao diagnóstico e no seguimento clínico durante o tratamento terapêutico.

3.2 Objetivo Específicos

- Descrever as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico e no seguimento clínico, durante o tratamento terapêutico;
- Caracterizar o perfil de MVs de pacientes com LMC, ao diagnóstico e durante o tratamento;
- Investigar a associação entre o perfil de MVs com a resposta terapêutica e resistência ao tratamento nos pacientes com LMC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos:

Seguindo as normas da Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP/HEMOAM) e foi aprovado no dia 06 de julho de 2021 sob o n° de CAAE: 48463121.3.0000.0009 e n° de parecer:4.831.211.

4.2 Tipo e Área de estudo:

Trata-se de uma pesquisa descritiva e exploratória, do tipo bidirecional, que visa caracterizar as populações de MVs derivadas de células leucêmicas e leucócitos inflamatórios de pacientes diagnosticados com LMC, tratados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, localizada na cidade de Manaus, Amazonas.

4.3 População de estudo:

A população de estudo foi constituída por 15 pacientes, atendidos no serviço de hematologia da Fundação HEMOAM, diagnosticados com LMC no período de julho/2021 a junho/2022, com idade a partir dos 18 anos e de ambos os sexos.

Além dos pacientes, também foram recrutados 15 doadores de sangue, atendidos no serviço de hemoterapia da Fundação HEMOAM, como grupo controle para análise pareada por gênero com a população de pacientes estudados.

4.4 Critérios de inclusão, exclusão e não-inclusão:

Os critérios de inclusão utilizados em conjunto para os casos foram: pacientes admitidos no Serviço de Hematologia da Fundação HEMOAM, que foram diagnosticados com LMC no período de julho de 2021 a junho de 2022, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que aceitaram participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: material biológico insuficiente, coagulado, malconservado ou com contaminação, paciente com reação leucemoide e paciente diagnosticado com LMC em fase aguda. Os critérios de não-inclusão foram: diagnóstico diferente de LMC, e a não concordância do paciente em participar do estudo.

Os critérios de inclusão utilizados para o grupo controle foram: doadores de sangue atendidos no Serviço de Hemoterapia da Fundação HEMOAM, no período de julho/2022 a

agosto/2022, com idade entre 49 e 56 anos, que aceitaram participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e com sorologia negativa. Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: material biológico insuficiente, coagulado e malconservado ou com contaminação e doadores que tiveram sorologia positiva. Os critérios de não-inclusão foram: a não concordância do doador em participar do estudo.

4.5 Riscos e benefícios:

Esta pesquisa apresentou riscos mínimos aos participantes da pesquisa. Devido a coleta de amostras de sangue periférico ser um procedimento invasivo, alguns participantes tiveram desconforto devido a picada da agulha, mas nenhuma complicação maior foi observada.

Em relação a utilização dos dados e prontuários dos participantes da pesquisa para o desenvolvimento do estudo, foi garantido o sigilo dessas informações, protegendo-os por anonimato e usando as informações somente para fins investigativos.

Desta maneira, a participação do voluntário, nesta pesquisa, contribuirá com a comunidade científica para uma melhor compreensão das características das microvesículas nos pacientes com LMC, além de identificar o uso potencial das MVs como biomarcador, visando auxiliar o prognóstico da doença.

4.6 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais:

Os dados clínico-laboratoriais dos pacientes foram coletados a partir de registros do sistema iDoctor e de prontuários da Fundação HEMOAM, através do Setor de atendimento médico e estatístico (SAME), pelos registros do laboratório de Genômica e do laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM. As variáveis coletadas, foram: idade, sexo, procedência, hemograma, *BCR::ABL1* (qualitativo e quantitativo), citogenética. Os dados dos doadores de sangue para o grupo controle foram coletados a partir do sistema Hemosys do Setor de triagem e coleta da Fundação HEMOAM, sendo essas as variáveis coletadas: idade, gênero, procedência.

4.7 Obtenção das amostras biológicas:

Para realização do estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico (SP) de pacientes com LMC, as quais foram obtidas através de punção venosa. Foram coletados, de cada paciente, 2 tubos de 4mL de sangue periférico com sistema à vácuo, contendo

anticoagulante citrato de sódio. As amostras foram coletadas ao diagnóstico (D0), antes de iniciar o tratamento com o inibidor de tirosina-quinase – ITK (F1), com 3 meses (F2) e 6 meses após o início do tratamento com o ITK (F3), totalizando 4 coletas de amostras de cada paciente (Figura 14).

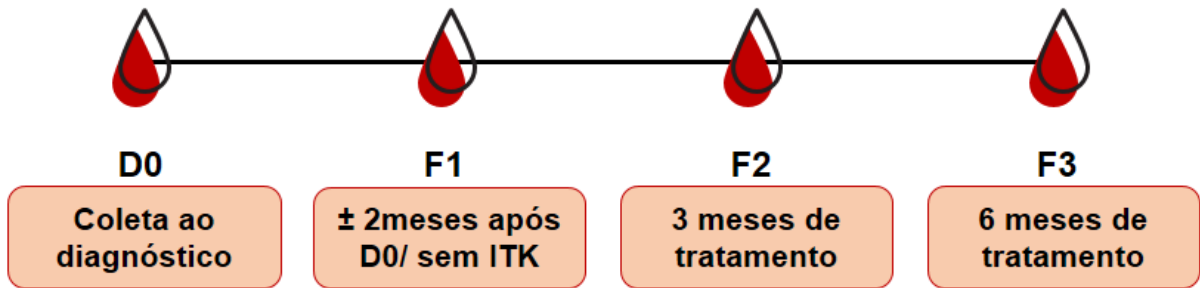


Figura 14. Linha do tempo para obtenção das amostras de sangue periférico.

D0 – coleta ao diagnóstico; F1 – Coleta aproximadamente 2 meses após o diagnóstico e sem tratamento com ITK; F2 – Coleta com 3 meses de tratamento com ITK; e F3 – Coleta com 6 meses de tratamento com ITK.

Para a obtenção das amostras biológicas dos doadores de sangue foram coletados 4 tubos de 4mL de sangue periférico com sistema à vácuo, contendo anticoagulante citrato de sódio, em apenas um momento. As amostras, tanto dos pacientes quanto do grupo controle foram identificadas com o código do projeto e foram centrifugadas a 400 x g por 15 min, no Laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM. Em seguida, o sobrenadante denominado Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi aliqotado e transferido para criotubos e armazenado no biorrepositório do laboratório, em freezer -80°C. As amostras selecionadas, foram utilizadas para a realização da caracterização de Microvesículas (Figura 15).

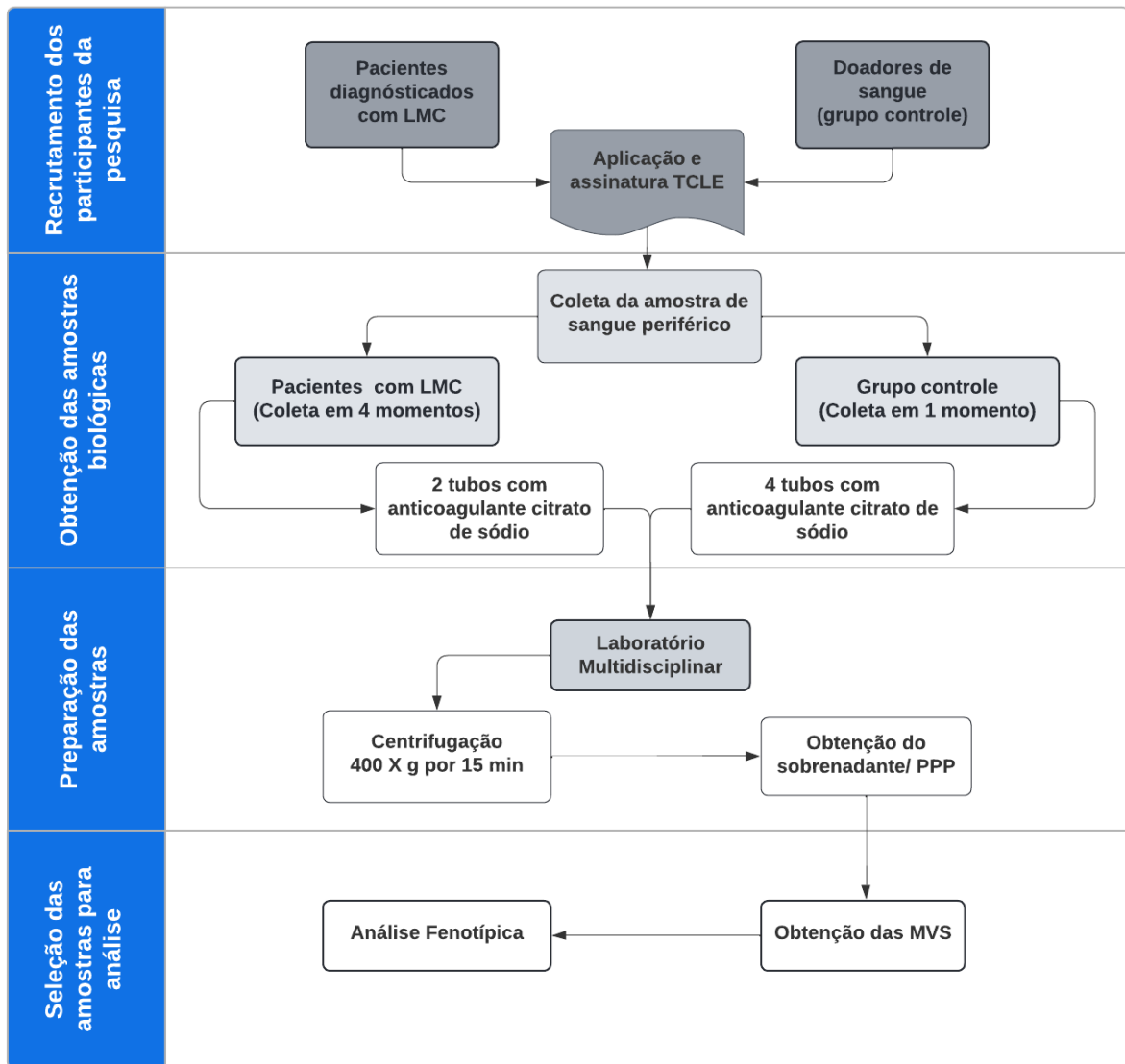


Figura 15. Fluxograma do desenvolvimento das atividades do projeto.

4.8 Obtenção das microvesículas (MVs):

As amostras de sobrenadante / PPP derivadas de Sangue Periférico (SP) foram descongeladas em banho-maria a 37°C, e aliqüotadas em microtubos. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a 21475 x g por 10 minutos em temperatura ambiente (TA) para obtenção do Plasma Livre de Plaquetas (PLP).

Posteriormente as amostras foram tratadas com tampão citrato-heparina, e novamente centrifugadas a 21475 x g por 90 min a 18°C, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em 100 µl de tampão anexina, e então foram distribuídos nos poços (placa)

contendo os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligam aos marcadores de superfície específicos presentes nas populações de MVs. As amostras foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz em TA. Após a incubação, foi aplicado 300 µL de tampão de ligação de anexina nos poços, e então os conteúdos foram transferidos para os microtubos de citometria de fluxo.

4.9 Análise fenotípica das Mvs:

A caracterização fenotípica das MVs para determinação de sua origem celular foi realizada a partir da incubação de 100 µL do PLP contendo as MVs, com anticorpos específicos. As amostras foram incubadas por 30 min, ao abrigo da luz. As MVs foram ressuspendidas em 100 µL do tampão de ligação de Anexina V com a adição de 5 µL de Anexina V-fluorescente.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter), um equipamento altamente sensível que permite a detecção e caracterização de MVs numa escala de 100-900nm através da utilização de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix. Estas microesferas possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) e são utilizadas como referência para caracterização de MVs. O método foi padronizado pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores – GIPB do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas. Foram adquiridos aproximadamente 1.000.000MV/amostra. Os resultados serão expressos em número de MVs/µL de amostra biológica. Para marcação das MVs foi utilizado o seguinte painel:

Quadro 8. Painel para imunofenotipagem das populações de MVs.

Tubo	MVs	FITC	PE	PerCP	PE-Cy5	APC
1	Controle (Anexina V)	Anex V	-	-	-	-
2	Granulócitos/Leucócitos	Anex V	CD66b	-	-	CD45
3	Cél. Endoteliais/ Eritrócitos	Anex V	CD51/CD61	-	CD235a	-
4	Cél. T/ Plaquetas/Cél. B	Anex V	CD3	CD41a	-	CD19
5	Neutrófilo/Monócitos/ Cél. Dendríticas	Anex V	CD16	CD14	CD11c	-
6	Células Progenitoras	Anex V	CD34	-	-	CD33

4.10 Análise descritiva e estatística:

Para realizar esta pesquisa, fez-se um pareamento metodológico em relação ao gênero do N amostral. A análise fenotípica foi realizada através do programa FlowJo e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 9.0.0. A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram descritos por meio da mediana e intervalo interquartil (IQR) de acordo com a distribuição das variáveis. Para comparação entre variáveis categóricas usou-se teste exato de Fisher. Devido aos parâmetros da distribuição dos dados, para a análise de grupos independentes foi realizado o teste de Mann-Whitney. Para análise de dois grupos pareados realizou-se o teste de Wilcoxon e para três grupos pareados utilizou-se o teste de Friedman, seguido do teste de Dunn's para múltiplas comparações. Os dados obtidos com o valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.11 Análise da Matriz de correlação e redes biológicas

Redes biológicas foram montadas para avaliar as associações entre as MVs dos pacientes em cada tempo do acompanhamento e do grupo controle. A associação entre os níveis quantitativos de MVs foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman no software GraphPad Prism 9.0.0, e a significância estatística foi considerada apenas se $p < 0,05$. Após a realização da análise de correlação entre as MVs, um banco de dados foi criado no programa Microsoft Excel 2013. Em seguida, as correlações significativas foram compiladas usando o software de acesso aberto Cytoscape (versão 3.10.0). Para representar cada população MV analisada usou-se nós circulares, cada tempo tem uma cor específica na rede e foram montados em layouts circulares. O tamanho do nó depende do número de interações entre as populações de MVs e a conexão dos nós indica a força da correlação como positiva forte ($r \geq 0,68$ =linha preta) e positiva moderada ($0,36 \geq r \leq 0,67$ =linha azul) conforme proposto por Taylor¹⁴⁰.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO ORIGINAL A SER SUBMETIDO EM REVISTA QUALIS CAPES A1

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS MICROVESÍCULAS CIRCULANTES DE PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA

Iandara Maíra Lopes de Souza^{1,2}, Miliane Araújo de Sousa^{1,2}, Emanuela Vitória Barbosa Alves^{1,2}, Erycka Alves de Mesquita^{1,2}, Deborah Canté de Aquino^{1,2}, Jhemerson Fernandes Paes^{1,2}, Bruno Eduardo Feitosa do Nascimento², Wanessa Horreda Laranjeira^{1,2}, Wivian da Conceição Costa da Silva^{1,2}, Geysa Adriana da Silva Soares^{1,2}, Armanda Barbosa³, Marina Malheiros Araújo Silvestrini³, Adriana Malheiro^{1,2,4}, Rosângela Santos de Abreu^{1,2}, Cristina Mesquita^{1,2}, Suely Meireles Rezende^{1,5}, Olindo Assis Martins-Filho^{1,3,6}, Andréa Teixeira-Carvalho^{1,3,6}, Allyson Guimarães da Costa^{1,2,4,7,8} e Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

² Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brasil

³ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou-FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brasil

⁵ Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brasil

⁷ Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brasil

⁸ Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brasil

* Correspondência para:

Andrea M. Tarragô, PhD, ORCID: 0000-0003-3125-580X

andrea_s_monteiro@hotmail.com

Allyson Guimarães da Costa, PhD, ORCID: 0000-0002-7312-6822

allyson.gui.costa@gmail.com

Resumo

As microvesículas são importantes mediadores de comunicação entre as células. Elas medeiam o efluxo de quimioterápicos promovendo a sobrevivência celular, e o número de MVs formadas após o tratamento com fármacos pode ter relação com sua resistência a medicação. Por isso caracterizar o perfil das MVs nos pacientes diagnosticados com LMC e durante o tratamento terapêutica se torna importante também para o estudo da resposta ao tratamento desses pacientes. Nesta pesquisa foi coletado sangue periférico de 15 pacientes (ao diagnóstico, em citorredução, em 3 meses e em 6 meses de tratamento com o ITK) e de 15 doadores de sangue (em momento único). Em seguida, foi realizada a imunofenotipagem das MVs por citometria de fluxo, utilizando os marcadores de superfície específicos para identificar células progenitoras, células mielóides, leucócitos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células T, células B, plaquetas, eritrócitos e células endoteliais. Esta pesquisa mostrou que os pacientes com LMC expressam mais MVs CD34+, CD16+, CD66b, CD11c, CD235a, CD51/61, em comparação aos doadores de sangue. Além disso, durante o tratamento com o inibidor tirosina quinase,

houve queda na expressão de todas as MVs aos 3 meses de tratamento. Porém, aos 6 meses de uso do ITK foi observado o aumento das MVs, e paralelamente, mais de 80% dos pacientes tiveram resposta terapêutica inadequada. Assim, pode-se sugerir que as MVs podem ser usadas como indicador de resistência terapêutica.

1. INTRODUÇÃO

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa [1–4] que se origina de uma célula-tronco hematopoiética [1,5] e apresenta, em 95% dos casos [6,7], o cromossomo Philadelphia (Ph+), que é resultado de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 t(9;22) (q34.1;q11.2)[1,2,5,8], e produz um gene de fusão BCR :: ABL1 [1,5,8,10] que traduz uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase aumentada [2,7,11]. Além disso, há outros efeitos celulares gerados na LMC, como por exemplo, desregulação da adesão celular, descontrole do ciclo celular e inibição da apoptose e autofagia [12]. O diagnóstico dos pacientes geralmente ocorre na fase crônica e se a doença não for tratada de forma eficaz, a LMC pode evoluir [13] e progredir para a crise blástica, fase que se assemelha à leucemia aguda [12,14].

O tratamento é realizado com inibidores tirosina quinase (ITK) [15,16]. Este medicamento age na proteína híbrida traduzida devido a translocação dos cromossomos 9 e 22 [17] e mostra uma rápida diminuição da carga da doença, abaixo do limite de detecção de ensaios, como na citogenética da medula óssea [18]. O principal objetivo de realizar a terapia com os ITK é atingir uma resposta citogenética completa. Esta acontece quando o cromossomo (Ph+) não é mais detectável na medula óssea [18], sendo relevante, portanto, o monitoramento dos pacientes com LMC em terapia, já que a resposta molecular fornece informações prognósticas e ajuda a determinar se um paciente está respondendo ao tratamento [19].

Visando ajudar no prognóstico da doença, tratamento e acompanhamento desses pacientes, estudar o papel das microvesículas (MVs) nos pacientes com LMC, se torna importante, pois elas são importantes mediadores de comunicação intercelular [20]. Um dos papéis principais das MVs na progressão do tumor é a habilidade de alterar o comportamento de outros tipos de células propiciando assim a sobrevivência das células tumorais. Dessa forma, as MVs podem facilitar a progressão da doença ao orientar a carga citotóxica para as células imunes circulantes [21]. Visto que estão envolvidas em processos angiogênicos e podem afetar a sobrevivência / apoptose celular em órgãos distantes como baço e fígado em doenças hematológicas, as MVs afetam também os processos metastáticos e o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas [22].

Sabe-se que as MVs medeiam o efluxo de quimioterápicos promovendo a sobrevivência celular, e o número de MVs formadas após o tratamento com fármacos demonstrou correlação com sua resistência quimioterápica [21], coincidindo com um aumento progressivo da gravidade da doença [23]. Como existe a possibilidade de surgir células resistente à terapia, intolerância ao tratamento, bem como efeitos adversos ou até mesmo evolução da doença para uma forma mais grave [12], é necessário que as

pesquisas continuem buscando alternativas, referentes ao tratamento dos pacientes com LMC com o propósito de melhorar o prognóstico da doença e a qualidades de vida desses pacientes.

Diante disso, foi proposto um estudo exploratório a fim de caracterizar o perfil de MVs em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica ao diagnóstico e no seguimento clínico durante o tratamento terapêutico através da imunofenotipagem por citometria de fluxo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo e local do estudo

Foi realizado um estudo descritivo e exploratório, do tipo bidirecional, visando caracterizar as populações de MVs derivadas de células leucêmicas e leucócitos inflamatórios em pacientes diagnosticados com LMC tratados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, HEMOAM, localizada na cidade de Manaus, AM, Brasil. O estudo foi realizado no período de julho de 2021 a Fevereiro de 2023. O processamento e as análises laboratoriais foram realizadas nos Laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM e no Laboratório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores - GIPB, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2.2 Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob o nº de parecer: 4.831.211. Todos os participantes aceitaram fazer parte do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), atendo a resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos.

2.3 População do Estudo

Trinta indivíduos, de ambos os sexos, com idade a partir de 18 anos, foram pareados por gênero e divididos em dois grupos: 15 pacientes com LMC (LMC) em fase crônica da doença, atendidos no serviço de hematologia da Fundação HEMOAM e 15 candidatos a doadores de sangue saudáveis considerados grupo controle (GC), com teste de triagem sorológica e tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (NAT HIV/HCV/HBV) não detectáveis, atendidos no serviço de hemoterapia da Fundação HEMOAM.

2.4 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínico-laboratoriais dos pacientes foram coletados a partir de registros do sistema iDoctor e de prontuários da Fundação HEMOAM, através do Setor de atendimento médico e estatístico (SAME), pelos registros do laboratório de Genômica e do laboratório de Análises Clínicas da Fundação

HEMOAM. As variáveis coletadas, foram: idade, sexo, procedência, hemograma, exame de monitoramento molecular por reação em cadeia da polimerase por Transcriptase reversa (RT-qPCR) BCR::ABL1 (qualitativo e quantitativo), citogenética. Os dados dos doadores de sangue para o grupo controle foram coletados a partir do sistema Hemosys do Setor de triagem e coleta da Fundação HEMOAM, sendo essas as variáveis coletadas: idade, sexo, procedência.

2.5 Amostras Biológicas

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa utilizando tubos com sistema à vácuo, contendo anticoagulante citrato de sódio. Amostras dos Pacientes foram coletadas em quatro momentos: no diagnóstico (Tempo 1 – D0), aproximadamente 2 meses após o diagnóstico, em citorredução (Tempo 2 – F1), aos três meses de tratamento com o ITK (Tempo 3 – F2) e aos 6 meses de uso do ITK (Tempo 4 – F3). Amostras do grupo controle foram coletadas em um único momento.

As amostras foram processadas após a coleta para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP) por centrifugação a 400 x g por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras de PPP foram aliquotadas e transferidas para criotubos e armazenadas no biorrepositório do Laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM, em freezer -80°C, até o momento da análise das MVs por citometria de fluxo.

2.6 Análise fenotípica de MVs circulantes por citometria de fluxo

A análise das MVs, por citometria de fluxo, foi realizada conforme descrito por Bode e Hickerson²⁴. As amostras de PPP foram descongeladas em banho-maria a 37°C, e em seguida, aliquotadas em microtubos e centrifugadas em alta velocidade a 21475 x g por 10 minutos para se obter o Plasma Livre de Plaquetas (PLP). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão citrato-heparina, e novamente centrifugadas a 21475 x g por 90 min a 15°C, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspendidos em tubos contendo 100 µl de tampão anexina e distribuídos nos poços (placa) contendo os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos distintos para identificar: CD34PE (células progenitoras), CD33APC (células mieloides), CD45APC (leucócitos), CD11cPE-Cy5 (células dendríticas), CD14PerCP (monócitos), CD16PE e CD66bPE (neutrófilos), CD3PE (células T), CD19APC (células B), CD41aPerCP (plaquetas), CD235aPE-Cy5 (eritrócitos), CD51/CD61PE (células endoteliais) e Anexina V-FITC, marcador de fosfatidilserina. Depois as amostras foram então incubados por 30 minutos ao abrigo de luz em TA. Como controle interno, a autofluorescência foi incluído em cada corrida experimental, na qual uma alíquota de suspensão de MV foi incubada na ausência de anticorpos monoclonais e Anexina V-FITC. Enquanto que alíquotas de anticorpos monoclonais e Anexina V-FITC foram incubadas na ausência de MV. Em seguida, adicionou-se 300 µl de tampão Anexina V nos poços, e então os conteúdos foram transferidos para os microtubos de citometria de fluxo. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter) com controle de volume aspirado/minuto. O equipamento é altamente sensível e possui um sistema de

injeção de amostra volumétrica que permite a contagem absoluta de partículas. A aquisição da amostra foi feita durante 2 min por amostra.

2.7 Análise descritiva e estatística

A análise fenotípica foi realizada através do programa FlowJo. Microesferas de calibração com tamanho padrão de 100nm a 900nm, chamadas de Gigamix, foram utilizadas como referência para caracterização das MVs. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 9.0.0. A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste de Shapiro-Wilk. Após a identificação da distribuição dos dados, descrevemos os resultados por meio da mediana e intervalo interquartil (IQR) de acordo com a distribuição das variáveis. Para comparação entre variáveis categóricas usou-se teste exato de Fisher. Devido aos parâmetros da distribuição dos dados, para a análise de grupos independentes, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Para análise de dois grupos pareados, realizou-se o teste de Wilcoxon e para três grupos pareados, utilizou-se o teste de Friedman, seguido do teste de Dunn's para múltiplas comparações. Os dados obtidos com o valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.8 Análise da Matriz de correlação e redes interativas

As Redes interativas foram montadas para avaliar as associações entre as MVs dos pacientes em cada tempo do acompanhamento e do grupo controle. A associação entre os níveis quantitativos de MVs foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman no software GraphPad Prism 9.0.0, e a significância estatística foi considerada apenas se $p < 0,05$. Em seguida, as correlações significativas foram compiladas usando o software de acesso aberto Cytoscape (versão 3.10.0). Para representar cada população de MV analisada, usou-se nós em forma de círculo, montados em layouts circulares, onde cada tempo tem uma cor específica na rede. O tamanho do nó depende do número de interações entre as populações de MVs e a conexão dos nós indica a força da correlação como positiva forte ($r \geq 0,68$ =linha preta) e positiva moderada ($0,36 \geq r \leq 0,67$ =linha azul) conforme proposto por Taylor [25].

3. RESULTADOS

3.1 Características da população do estudo

Tanto pacientes quanto o grupo controle possuem a mesma porcentagem em relação ao gênero, 60% são homens e 40% mulheres. Os pacientes apresentaram mediana de idade de 43 anos (IQR 39-57) e o grupo controle apresentou mediana de idade de 52 anos (IQR 51-53). Todos os participantes do grupo controle residiam na capital, enquanto que no grupo dos pacientes 33.33% eram procedentes de municípios do interior do Amazonas, e os demais pacientes viviam em Manaus (66,7%).

Todos os pacientes foram diagnosticados na fase crônica da LMC, e apresentavam o cromossomo Ph+ e /ou a proteína BCR::ABL1. Durante o período de diagnóstico, os pacientes apresentaram diversos sinais e sintomas clínicos. Entre eles, o mais observado foi a perda de peso (66,7%), seguido da esplenomegalia (60%), febre (53,3%), além das dores no corpo, costa, peito ou pescoço e fadiga/astenia (40%). Os demais sintomas estavam presentes em menos de 34% desses pacientes (Tabela 1).

A partir dos 3 meses de tratamento com ITKs, os pacientes iniciam o monitoramento molecular através da quantificação de transcritos provenientes de blastos leucêmicos por reação em cadeia da polimerase por Transcriptase reversa (RT-qPCR), mas neste estudo, foi analisado os exames a partir dos 6 meses de tratamento com o ITKs. Dos 15 pacientes, 20% não realizaram o exame no tempo estudado, e 80% dos pacientes realizaram o exame de monitoramento molecular (RT-qPCR). Dos 80% que realizaram o exame, 50% apresentaram falha ao tratamento (BCR::ABL >10%), 33,3% estavam em alerta (BCR::ABL \geq 1-10%) e 16,7% apresentaram resposta molecular ótima (BCR::ABL \leq 1%).

Tabela 1. Dados sociodemográficos e sinais clínicos da população estudada.

Características	GC N=15	LMC N=15	P value
Idade			
Mediana (IQR)	52 (51-53)	43 (39-57)	0,1073
Gênero N (%)			
Feminino	6 (40)	6 (40)	>0,9999
Masculino	9 (60)	9 (60)	
Procedência N (%)			
Manaus	15 (100)	10 (66,67)	0,0421
Interior do Amazonas [#]	0 (0)	5 (33,33)	
Manifestações Clínicas e laboratoriais N (%)			
Perda de peso	-	10 (66,7)	-
Esplenomegalia.	-	9 (60)	-
Febre	-	8 (53,3)	-
Dor em diversas partes do corpo	-	6 (40)	-
Fadiga/Astenia	-	6 (40)	-
Desconforto ou dor abdominal	-	5 (33,3)	-
Dor dos membros inferiores	-	4 (26,7)	-
Tontura	-	4 (26,7)	-
Calafrio	-	4 (26,7)	-
Cefaleia	-	3 (20)	-
Cansaço	-	3 (20)	-
Outros*	-	12 (80)	-

Resposta ao Tratamento(RT-qPCR)

RM - Ótima	2 (16,7)	-
Alerta	6 (50)	-
Falha	4 (33,3)	-

Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil - IQR, (%) e n° da amostragem - N. Os dados foram comparados usando o teste exato de Fisher para variáveis categóricas e para variáveis contínuas usou-se teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados com valor de $p < 0,05$ foram considerados significativo. # Municípios: Barreirinha (1), Caapiranga (1), Itacoatiara (1), Tapauá (1) e Tefé (1) * Sintomas apresentados por 2 ou apenas 1 paciente: Náusea; Tosse seca; Edema nos membros inferiores; Vertigem; Equimoses; Gengivorragia; Hepatomegalia; Diarreia; Priapismo; Falta de ar; Palidez; Falta de apetite; Constipação e flatulência; Rinorragia e Metrorragia; RM – Resposta molecular. Resposta Ótima BCR::ABL \leq 1%; Alerta, BCR::ABL \geq 1-10%; Falha, BCR::ABL $>$ 10%.

A mediana das contagem totais de glóbulos vermelhos (RBC) dos pacientes com LMC foi de 3,38 milhões/mm³ (2,85-3,87), isto é, abaixo dos valores de referência (3,9 -6,0) em D0. A plaquetose foi observada em 60% dos pacientes em D0 e a mediana da contagem total de Leucócitos (WBC) nesses pacientes foi muito maior em comparação ao valor de referência (3600-11000) em D0 e F1. Observa-se a presença exacerbada de células imaturas ao diagnóstico e também o aumento de outras células, como monócitos, eosinófilos e basófilos (Tabela 2). Observou-se que a medida que os pacientes aderiam ao tratamento os parâmetros hematológicos foram se restabelecendo (D0, F1, F2 e F3).

Tabela 2. Dados hematológicos dos pacientes com LMC ao diagnóstico e ao tratamento.

Hemograma	LMC				P value
	D0	F1	F2	F3	
RBC (X 10 ⁶ /mm ³)	3,38 (2,85-3,87)	3,77 (3,30-3,86)	4,19 (3,61-4,84)	4,03 (3,55-4,49)	^a >0,9999 ^b 0,0973 ^c 0,9999
WBC (cells/mm ³)	171600 (65410-279700)	27865 (21560-50800)	5200 (4100-7150)	4320 (3530-6040)	^a 0,2034 ^b <0,0001 ^c <0,0001
Blastos (cells/mm ³)	5159 (0-8150)	0 (0-570)	0 (0-0)	0 (0-0)	^a 0,0973 ^b 0,0088 ^c <0,0032
Promielócitos (cells/mm ³)	6324 (2161-11433)	529,5 (0-1481)	0 (0-0)	0 (0-0)	^a 0,1419 ^b 0,0001 ^c <0,0001
Mielócitos (cells/mm ³)	7849 (0-27970)	608,5 (0-3479)	0 (0-0)	0 (0-0)	^a 0,4626 ^b 0,0024 ^c <0,0011
Metamielócitos (cells/mm ³)	22820 (6541-33564)	1863 (0-4236)	0 (0-0)	0 (0-0)	^a 0,0349 ^b <0,0001 ^c <0,0001
Neutrófilos-Bastão (cells/mm ³)	20592 (5232-31620)	2462 (0-5080)	0 (0-0)	0 (0-0)	^a 0,0349 ^b <0,0001 ^c <0,0001
Neutrófilos Segmentado (cells/mm ³)	59254 (30958-116994)	15860 (11110-23468)	2667 (2276-4719)	2213 (1500-3382)	^a 0,2863 ^b <0,0001 ^c <0,0001
Linfócitos (cells/mm ³)	6860 (4322-9780)	2761 (2210-3990)	1852 (1588-2133)	2157 (1458-2365)	^a 0,0433 ^b <0,0001 ^c <0,0001
Monócitos (cells/mm ³)	1730 (0-3432)	758 (378-1656)	235 (180-254)	212,5 (143-250)	^a >0,9999 ^b 0,1419 ^c <0,0433
Eosinófilos (cells/mm ³)	6520 (1420-17300)	887,5 (431-2432)	196 (138-294)	99 (71-131)	^a >0,9999 ^b 0,0041 ^c <0,0001
Basófilos (cells/mm ³)	5594 (1420-8650)	382 (0-1124)	33 (18-116)	28 (17-35)	^a 0,5381 ^b 0,0433 ^c 0,0024
Plaquetas (cells/mm ³)	539000 (289000-981000)	521500 (390000-898000)	201000 (183000-434000)	233000 (184000-246000)	^a >0,9999 ^b 0,0655 ^c 0,0069

Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil - IQR, e n° da amostragem - N; D0 - Ao diagnóstico; F1 - follow-up/seguimento; F2 - follow-up/tratamento 3 meses com ITK; F3 - follow-up/tratamento 6 meses com ITK; ^aD0 vs F1; ^bD0 vs F2; ^cD0 vs F3; Os dados foram comparados usando o teste de Friedman, seguido do teste de Dunn's para múltiplas comparações. Os dados com valor de p<0,05 foram considerados significativo.

3.2 Perfil geral de microvesículas plasmáticas em pacientes diagnosticados com LMC em comparação com controles saudáveis

A Figura 1 apresenta a contagem absoluta de MVs circulantes do plasma de Pacientes com LMC ao diagnóstico e compara com o grupo controle. A análise dos dados revelou uma diferença entre os grupos, indicando que os pacientes com leucemia expressaram um maior número de MVs Anexina V++ (MVs totais) em comparação aos indivíduos saudáveis. Esse perfil aumentando nos pacientes com LMC e com significância estatística foi encontrado também nas MVs de CD34+ (Cel. Progenitoras), CD11c+ (Cel. Dendríticas), CD16+ e CD66b+ (Neutrófilos), CD235a+ (Eritrócitos) e CD51/61+ (Cel. Endoteliais) em comparação ao controle. Os marcadores das Células mieloide (CD33), de leucócitos totais (CD45), monócitos (CD14), Células T (CD3), e o marcador plaquetário (CD41a) estavam aumentados mas não mostraram diferença estatísticas entre os grupos na expressão dessas MVs. A única população de MV que apresentou uma diminuição em sua expressão foi a MV CD19+ (Células B), porém sem diferença significativa.

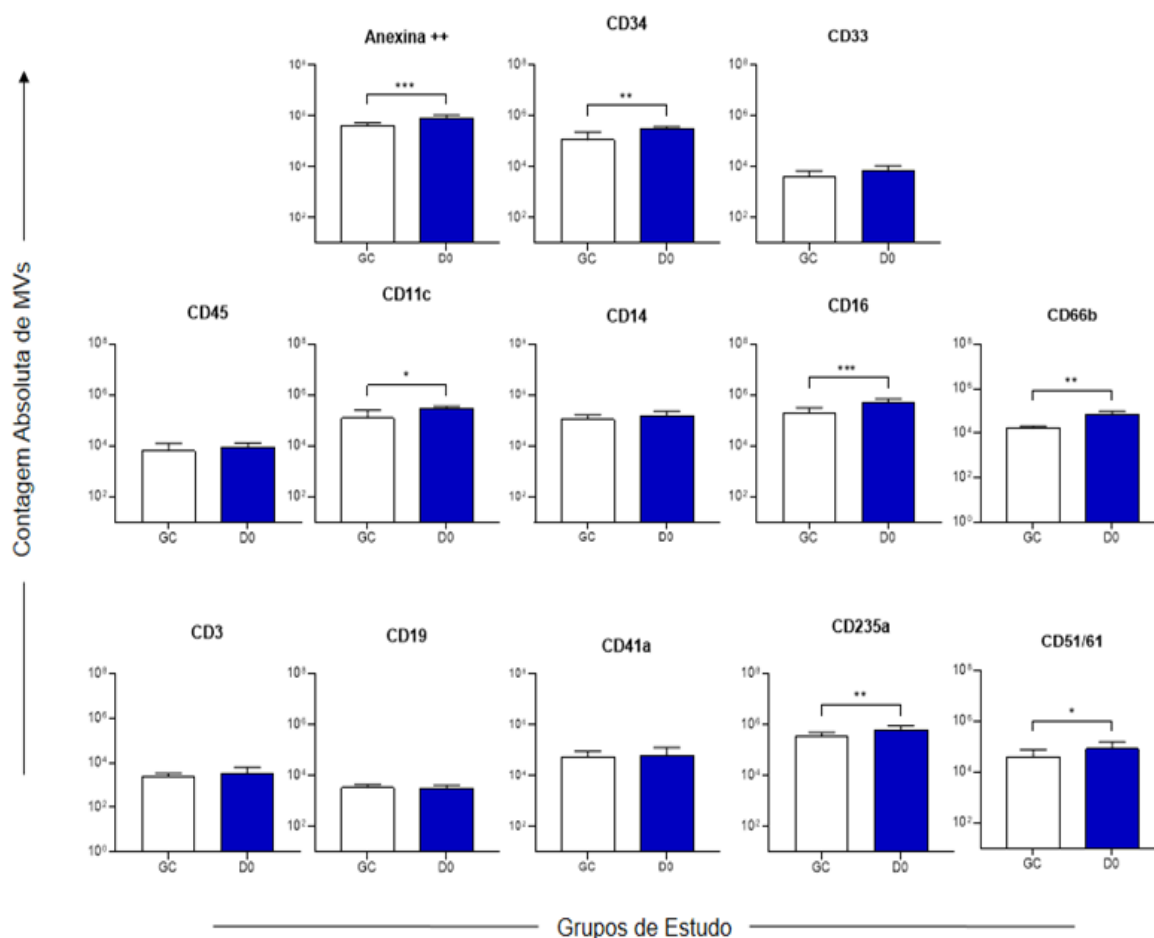


Figura 1. Perfil geral das MVs plasmáticas de pacientes com LMC ao diagnóstico comparados ao grupo controle. Os níveis de MVs foram quantificados por citometria de fluxo conforme descrito na metodologia. Comparação entre os níveis de MVs totais – Anexina ++; MVs derivadas de Progenitores – CD34; Mieloides – CD33; Leucócitos – CD45; Células dendríticas – CD11c; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66b; Células T – CD3; Células B – CD19; Plaquetas – CD41a; Eritrócitos – CD235a; e Células Endoteliais – CD51/61. Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, mostrando a mediana (intervalo interquartil) do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas foram destacadas por linha de conexão e asteriscos para p<0,001 (***) para p<0,01 (**) ou p<0,05 (*). Abreviação: GC – Grupo Controle; D0 – Pacientes com LMC ao diagnóstico.

3.3 Perfil panorâmico de microvesículas plasmáticas de pacientes diagnosticados com LMC e em tratamento com o Inibidor Tirosina Quinase

A Figura 2 apresenta a contagem absoluta de MVs circulantes do plasma de Pacientes com LMC ao diagnóstico (D0) comparados aos 3 meses (F2) e 6 meses (F3) de tratamento com o ITK. A Análise dos dados mostrou que há uma queda na expressão das MVs de Anexina V⁺⁺ (MVs totais) ao longo do tratamento com o ITK em 3 meses (F2) e em 6 meses (F3) quando comparado com as MVs produzidas ao diagnósticos (D0). Essa diferença significativa entre os tempos também foi vista nas MVs CD16⁺ e CD66b⁺ (Neutrófilos) e MVs CD3⁺ (Células T) (D0 vs F2 e D0 vs F3). Também houve queda significativa na expressão das MVs CD34⁺ (Células Progenitoras), MVs CD33⁺ (Células Mieloides), MVs CD45⁺ (Leucócitos), MVs CD11c⁺ (Células Dendríticas), MVs CD14⁺ (Monócitos), MVs CD19⁺ (Células B), MVs CD235a⁺ (Eritrócitos) e MVs CD51/61⁺ (Células Endoteliais), porém essa diferença significativa entre os grupos ocorreu entre D0 vs F2. As MVs derivadas de plaquetas (CD41a) não mostraram diferença alguma entre os tempos. Além disso, quando se compara os grupos no tempo F2 vs F3 não há significância estatística, porém é possível notar em quase todas as populações de MVs, um aumento no número de MVs em F3 em relação a F2, esse perfil só não é encontrado nas populações de MVs de CD3⁺ e CD19⁺ que estão diminuídas ao longo do tempo.

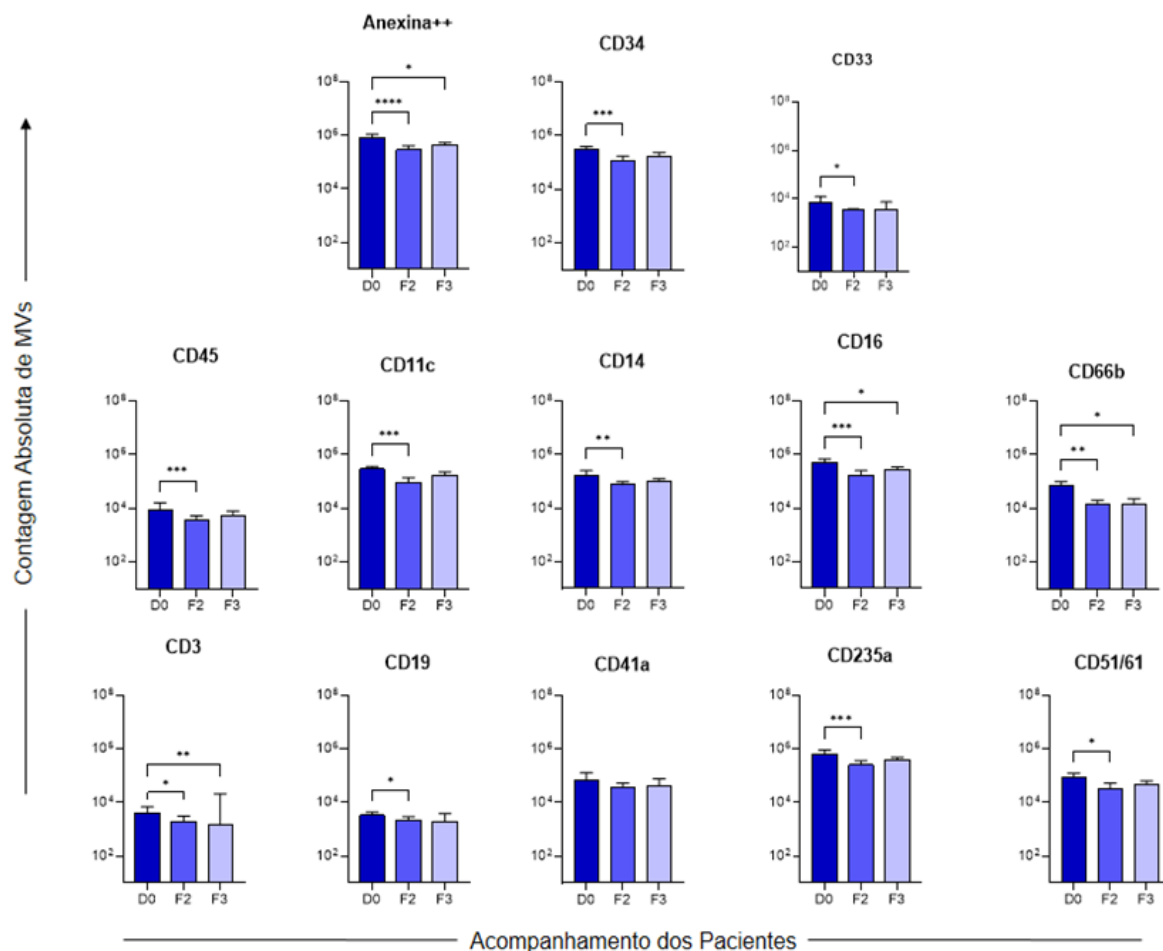


Figura 2. Perfil panorâmico de MVs plasmáticas de pacientes com LMC ao diagnóstico e em tratamento com ITK. Comparação ao longo do tempo (3 e 6 meses de tratamento) entre os níveis de MVs totais – Anexina ++; MVs derivadas de Progenitores – CD34; Mielóides – CD33; Leucócitos – CD45; Células dendríticas – CD11c; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66b; Células T – CD3; Células B – CD19; Plaquetas – CD41a; Eritrócitos – CD235a; e Células Endoteliais – CD51/61. Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, mostrando a mediana (intervalo interquartil) do número absoluto de MV/mm³ de plasma, (n=12 pacientes). A análise dos dados foi realizada através do teste de Friedman, seguido do teste de Dunn's para múltiplas comparações. Diferenças significativas foram destacadas por linha de conexão e asteriscos para p<0,0001 (****), para p<0,001 (***), para p<0,005 (**) ou p<0,05 (*). Abreviação: D0 – Pacientes com LMC ao diagnóstico; F2 – follow-up/tratamento – 3 meses com ITK; F3 – follow-up/tratamento – 6 meses com ITK.

3.3 Redes de interações de MVs circulantes dos Pacientes com LMC ao longo do tratamento e grupo controle

As redes construídas representam a interação entre as populações de MVs circulantes. Essa interação é ilustrada por meio das conexões entre uma população de microvesícula e outra, em cada tempo de tratamento dos pacientes com LMC e do grupo controle (Figura 3). Nota-se, em todas as redes de interação, que as conexões entre as populações de MVs possuem uma correlação positiva forte (linha preta), mas é possível observar que há também correlações moderadas (linha azul) entre algumas populações. Percebe-se uma menor interação das MVs em D0 em comparação ao grupo controle. Na rede D0, CD14 (monócitos) e CD45 (leucócitos) se correlacionaram com apenas um tipo de MV e CD66b (neutrófilo) interagiu com duas populações de MVs. CD41a (plaquetas) não interagiu com nenhuma outra MV e CD3, CD16 e CD34 foram as MVs que mais interagiram com outras populações de MVs, nessa rede. Enquanto que na rede

do controle, observa-se que as MVs de CD66b+ (neutrófilos) e CD33+ (células mieloides) apresentam um maior número de interações. CD19 (células B) se correlacionou apenas com uma população e CD3 (células T) não interagiu com população alguma de MVs. Na rede de F1, CD235a (eritrócitos), CD51/61(células endoteliais), CD34 (células progenitoras), CD11c (células dendríticas), CD14 (monócitos) e CD16 (neutrófilo) interagiram com todas as populações avaliadas. Em F2, CD19 (células B) e CD14 (monócitos) interagem entre si somente e CD11c não se correlacionou com nenhuma população. Na rede de F3, percebe-se que somente a população de CD235a (eritrócitos) se correlacionou com todas as MVs, além de ser a rede com menor número de interações moderadas

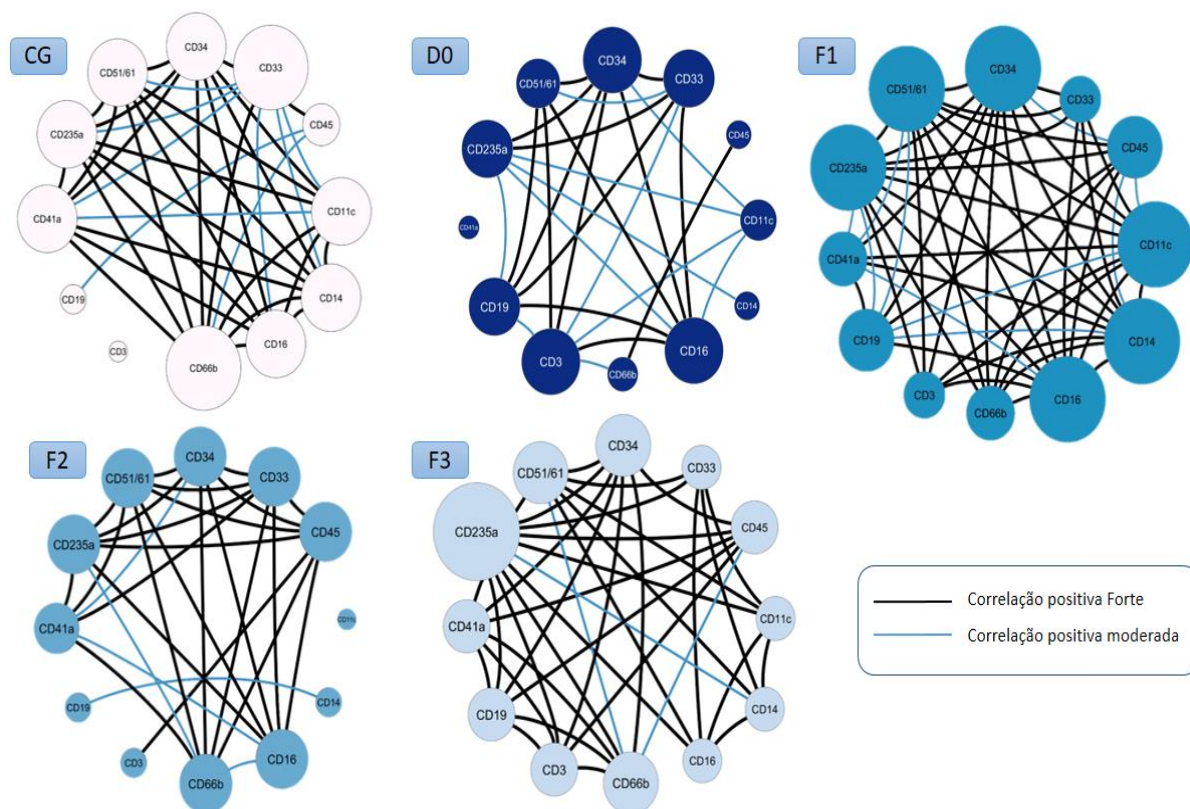


Figura 3. Redes de MVs circulantes dos pacientes com LMC ao diagnóstico e ao longo do tratamento e grupo controle. Redes de interação entre as populações de MVs derivadas de Células Progenitoras – CD34; Mieloides – CD33; Leucócitos – CD45; Células dendríticas – CD11c; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66b; Células T – CD3; Células B – CD19; Plaquetas – CD41a; Eritrócitos – CD235a; e Células Endoteliais – CD51/61 foram geradas para identificar a correlação entre as populações de MVs em todos os tempos de acompanhamento dos pacientes com LMC (D0, F1, F2 e F3) e em momento único no CG. O tamanho dos nós das redes tem a ver com o número de interações, quanto mais uma população de MVs interage com outras populações de MVs maior será o nó, se há poucas interações o nó será menor. As correlações de Spearman significativas em $p < 0,05$ são retratadas por linhas contínuas que indicam uma correlação positiva forte quando $r \geq 0,68$, a linha contínua é espessa e preta, quando a correlação positiva é moderada ($0,36 \leq r \leq 0,67$), a linha contínua é mais fina e azul.

Além das redes de interações, também foi criada uma matriz de correlação de cada tempo estudado. A matriz é um espelho da rede, e nos fornece uma visão mais simplificada, mostrando a força da correlação entre as populações de MVs. Na figura 3, é possível confirmar que todas as correlação foram positivas forte ou moderadas, e que de fato, no GC, a população de MVs de

CD3⁺ (Células T) não se correlacionou com nenhuma outra população de MVs. Em D0, o mesmo acontece com as MVs de CD41a⁺ (Plaquetas) enquanto que, a população de MVs de CD11c⁺ (Células Dendríticas) não se correlacionou com nenhuma outra população de MVs no tempo F2.

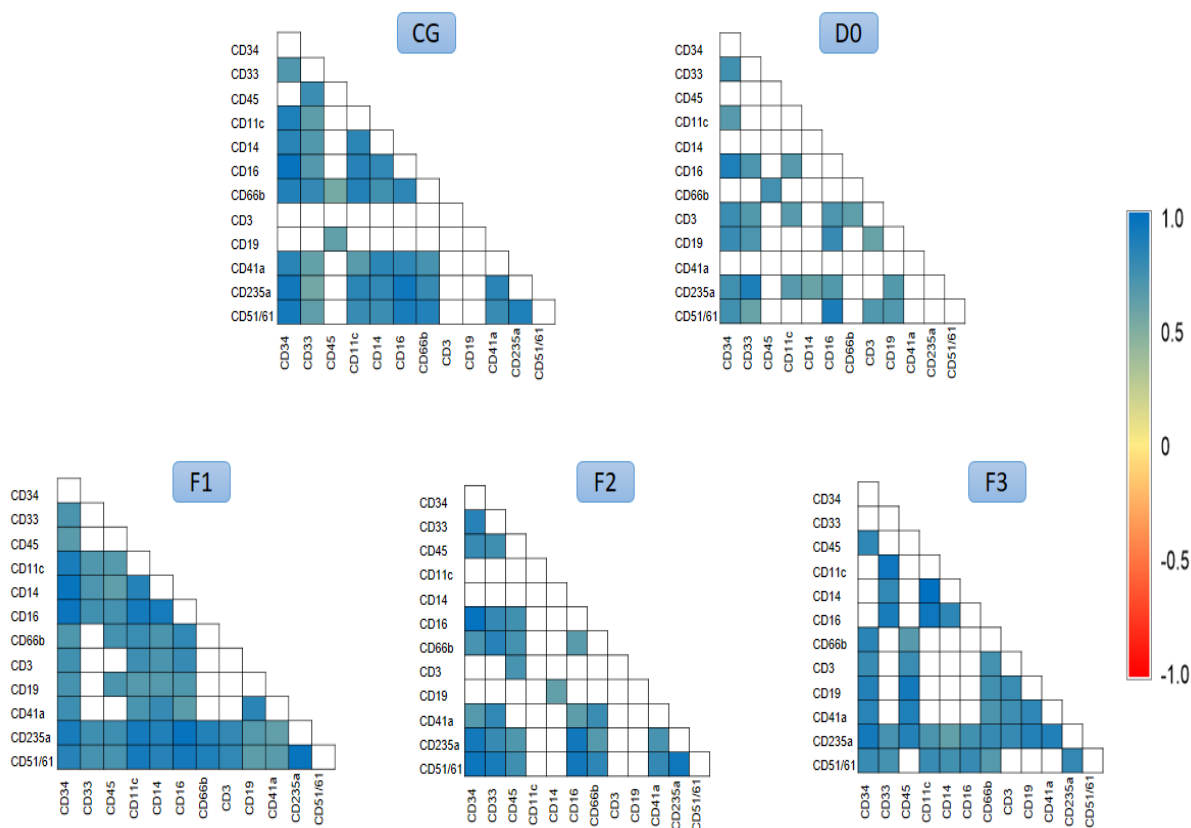


Figura 4. Matriz de correlações dos pacientes com LMC ao diagnóstico e ao longo do tratamento e grupo controle. Matrizes foram criadas para identificar a correlação entre as populações de MVs derivadas de Células Progenitoras – CD34; Mielóides – CD33; Leucócitos – CD45; Células dendríticas – CD11c; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66b; Células T – CD3; Células B – CD19; Plaquetas – CD41a; Eritrócitos – CD235a; e Células Endoteliais – CD51/61 em todos os tempos de acompanhamento dos pacientes com LMC (D0, F1, F2 e F3) e em momento único no CG. As matrizes de correlação exibem associação significativa ($p < 0,05$) entre pares de MVs com base nos índices de classificação, que são marcados pela escala de cores (azul correlação positiva/vermelho correlação negativa), variando de $-1,0$ a $1,0$ para enfatizar a força da correlação. Correlação positiva forte ($r \geq 0,68$); Correlação positiva moderada ($0,36 \leq r < 0,67$); Correlação positivo fraco ($r < 0,35$); Correlação negativa forte ($r \leq -0,68$); Correlação negativa moderada ($-0,67 \geq r \leq -0,36$); Correlação negativa fraca ($r > -0,35$)25.

4. DISCUSSÃO

Ao analisar a população de Pacientes com LMC, percebe-se que a mediana de idade (43 anos) desses pacientes é diferente das pesquisas realizadas com pacientes com LMC da Austrália (mediana de 52 anos) [26], da China (mediana de 28,5 anos) [27], e nos ensaios clínicos europeus (mediana de 46 anos a 51 anos) [28,29]. Um estudo na Santa Casa de São Paulo a mediana de idade foi igual a 42,3 anos na fase crônica [30]. Em João Pessoa, a mediana dos pacientes foi de 40,5 anos [31]. Já em um estudo de 2017, com pacientes com LMC em tratamento no Rio Grande do Sul, a mediana de idade foi de 55 anos [32] e na revisão publicada, em 2021, por Oliveira e colaboradores, a faixa etária acometida com a doença varia de 45 e 55 anos [33]. Assim, percebe-se que existe variações de idades nos pacientes com LMC entre as regiões brasileiras, e em todo

mundo, corroborando com os dados da OMS que afirma que a LMC pode ser diagnosticada em qualquer idade [1,8].

As manifestações clínicas apresentadas na tabela 1 corroboram com os dados da Organização Mundial da Saúde que diz que no diagnóstico os achados comuns incluem fadiga, mal-estar, perda de peso, suores noturnos e anemia, e cerca de 50% dos pacientes têm esplenomegalia palpável [1]. Segundo a literatura, aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com LMC são assintomáticos [1,12], porém neste estudo todos os pacientes apresentaram alguma manifestação clínica e 60% eram homens.

Esse resultado pode ter relação com os valores associados culturalmente à masculinidade que tendem a minimizar problemas de saúde e evitam procurar os serviços médicos [34], devido ao medo de descobrir uma doença grave, pois a falta de conhecimento pode ser encarada como um elemento "protetor" para os homens, além de evitarem falar sobre o que sentem, pois pode ser percebido como uma manifestação potencial de vulnerabilidade, o que pode levar a questionamentos acerca dessa masculinidade socialmente instituída [35]. Estima-se que mais de 50% dos homens só vão ao médico quando o sintoma já está avançado [36]. Além disso, para os pacientes do interior, existe a dificuldade do deslocamento dentro do estado do Amazonas, já que o transporte, para a maioria dos pacientes chegar a Manaus, é fluvial e as viagens podem durar mais de 24h. A distância pode atrasar o diagnóstico da doença, tornando mais difícil identificar pacientes assintomáticos.

Os parâmetros hematológicos encontrados neste trabalho foram similares ao encontrados por Sossela e Bonfim et al., em populações distintas, que descreveram que através do hemograma pode-se identificar anemia nos pacientes com LMC, trombocitose, e aumento de basófilos e de granulócitos [37,38]. Além de mostrar que na LMC, o hemograma pode ser utilizado como um exame laboratorial de triagem pela observação de leucocitose, com acentuado número de granulócitos com desvio a esquerda [33].

Além disso, sabe-se que o acompanhamento e monitoramento molecular também é importante para o controle da doença, pois os níveis de transcritos BCR-ABL $\leq 10\%$ a $\leq 1\%$ em 3 e 6 meses, é um prognóstico favorável a longo prazo [8,39]. Neste estudo, pouco mais de 16% dos pacientes tiveram uma resposta terapêutica ótima. Estudos apontam que entre 20% - 30% proporção significativa de pacientes terá uma resposta inadequada [29,40,41].

Apesar do grande conhecimento biológico e clínico sobre a LMC, pouco se sabe sobre as propriedades imunossupressoras e promotoras das MVs derivadas dessas células provenientes do sangue [42]. Essa neoplasia apresenta um estágio de comprometimento do sistema imunológico em pacientes no momento do diagnóstico e antes do início do tratamento com os ITK. Esse cenário favorece a progressão do tumor e dificulta a capacidade do organismo em desenvolver respostas imunológicas antileucêmicas [43,44].

Ao observar a figura suplementar, percebe-se que não há diferença na expressão de

microvesículas entre o diagnóstico e o uso da hidroxiuréia - HU (D0 x F1), ou seja, o sistema imune dos pacientes continuam com disfunção imunológica caracterizada pela doença, porque a HU não trata a doença. A razão para usar esta medicação em pacientes com leucemia é reduzir ou prevenir o crescimento de células sanguíneas imaturas [45,46]. Assim, ela induz a parada da proliferação celular na fase S do ciclo da célula [47–49] impedindo a célula de se reproduzir [47,50]. No estudo de Aswad [51] com MVs em pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose, também não foi encontrada diferenças significativas nos níveis de MVs dos pacientes em citorredução com Hidroxiuréia.

Qing Li et al. sugerem que as MVs derivadas do plasma de pacientes com LMC poderiam ser uma forma de monitoramento de pacientes com LMC [27,52]. As MVs carregam as proteínas, lipídios e ácidos nucleicos de suas células-mãe, fornecendo uma fonte potencial de biomarcadores relacionados a doenças [53,54]. Elas também interagem com os sistemas de imunidade inata e adaptativa, transmitindo fatores pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. A sua acumulação no sangue como resultado da estimulação celular e da expressão de marcadores específicos da doença, torna-as potenciais monitores de doenças ou fatores prognósticos [55,56].

Nessa pesquisa, mais de 80% dos pacientes estavam com uma resposta terapêutica inadequada em F3. Segundo Ehsanpour e colaboradores, o aumento das MVs após o tratamento pode ser pensado como um marcador de fase de recidiva durante uma doença. E por isso, avaliar essas MVs pode ser uma forma de fornecer um melhor entendimento das leucemias em relação a resistências à quimioterapia [57]. Sugere-se portanto, que o aumento das MVs em F3 possa ser um indicador de falha na resposta terapêutica desses pacientes.

Segundo Miljkovic-Licina e colaboradores, o CD34 é altamente expresso por blastos leucêmicos na maioria dos casos [58]. Em F2 e F3, as células blásticas não estão mais presentes no sangue periféricos dos pacientes em tratamento, provavelmente o aumento da expressão de MVs CD34+ em F3 pode ser influenciada por outras células. Estudos mostram que além das células hematopoiéticas, o CD34 também são expressos por células endoteliais, e representam uma ligação interessante entre angiogênese e hematopoiese [59] e também é expresso por plaquetas [60]. Esse marcador tem sido associada à inibição ou facilitação da adesão, proliferação celular e regulação da diferenciação [61]. É possível, portanto que ele sirva como um receptor de adesão devido as funções de auto agregação e adesão endotelial das plaquetas [60].

Harada e colaboradores analisaram as células imunes inatas da linhagem mielóide, como granulócitos e células dendríticas (DCs), bem como seus progenitores em pacientes com LMC. Eles confirmaram proporções aumentadas de granulócitos e proporções reduzidas de células dendríticas e revelaram ainda que o desenvolvimento de DC foi restrito a partir de estágios progenitores em pacientes com LMC [62]. Além disso, DCs podem ser geradas a partir de células progenitoras (CD34+) e são consideradas efetoras cruciais da resposta imune antileucêmica. Elas agem como um sistema de alerta precoce para a resposta das células T ou imunidade adaptativa

[43].

As DCs desempenham papéis críticos na captura e apresentação de antígenos às células T, um processo essencial para moldar as respostas imunes do hospedeiro contra infecções e câncer. Seu reconhecimento precoce de patógenos e a rápida produção de citocinas ativam células imunes inatas para limitar a disseminação de patógenos até que a imunidade adaptativa possa ser iniciada. À medida que nossa compreensão de cada tipo de célula que atua dentro desse sistema aumenta, torna-se cada vez mais evidente que as DCs atuam como os reguladores centrais da resposta imune [63].

O papel das MVs derivadas de eritrócitos em condições de homeostase não foi totalmente compreendido. No entanto, MVs presentes na circulação de indivíduos saudáveis tem sido associada a diminuição da formação de trombina, indicando um papel anticoagulante [55,64]. Ainda, nas MVs em neoplasias mieloproliferativas negativas (NMPs), o eritrócito pode contribuir para a fisiologia pró-trombótica, aumentando a exposição da fosfatidilserina, fosfolípido pró-coagulante, levando a liberação de MVs [65,66] que iniciam a geração de trombina pois elas contêm fatores pró-coagulantes, que podem ativar a via intrínseca da coagulação [67,68]. O estado hipercoagulável está presente no câncer. As células sanguíneas circulantes estão aumentadas e são anormais no NMPs, resultando em aumento do risco trombótico [65,69]. As NMP apresentam maior frequência de eventos trombóticos ao diagnóstico mas o risco persiste ao longo da vida do paciente [70,71]. Já na LMC não há evidências que episódios trombóticos estejam presentes nesses pacientes [72].

As MVs derivadas de neutrófilos aumentam a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como IL-6 e moléculas de adesão em células endoteliais [73]. De acordo com o estado das células progenitoras e seu microambiente, as MVs derivados de neutrófilos podem exercer efeitos pró-coagulantes e pró- ou anti-inflamatórios [55]. Durante processos fisiopatológicos o aumento da expressão de dessas MVs poderia ser um indicador diagnóstico de inflamação [74]. Craver e colaboradores afirmam que os pacientes com LMC exibem um perfil inflamado em comparação ao controle, e os pacientes com falha na resposta ao tratamento aos 3 meses com imatinibe, possuem o fator transformador de crescimento alfa (TGF α) exclusivamente elevado, sendo o preditor mais significativo na falha do que IL-6 [75].

Essas MVs são enriquecidas para várias quimiocinas e, portanto, foram propostos para guiar os leucócitos ao local da inflamação [76,77]. Os neutrófilos da LMC possuem características imunossupressoras, como expressão aumentada de genes relacionados a espécies reativas de oxigênio. Além disso, monócitos e basófilos, que estão significativamente aumentados em pacientes com LMC, expressaram altos níveis de PD-L1, sugerindo que essas células podem suprimir a imunidade antitumoral [62]. Logo, esses achados podem explicar o aumento das MVs derivadas de células pró-inflamatórias e um número significativo de pacientes com falha terapêutica no tempo F3 em nosso estudo. Contudo, existe uma escassez de estudos disponíveis

na literatura para confirmar esses achados.

Hsieh et al. mostrou uma visão geral do perfil imunológico na LMC. As células imunossupressoras contribuem para a disfunção das células T e progressão da doença na LMC, expandindo no diagnóstico e reduzindo após a terapia com ITK [43]. Em nossa pesquisa, percebe-se que as MVs derivadas de Células T (CD3+) e células B (CD19+) estavam diminuídas ao longo do tratamento com o ITK (Figura 2). Porém, a maioria das MVs provenientes de células progenitoras, células T ou B apresentam expressões altas em distúrbios hematológicos do espectro da leucemia [55]. Kornek et. Al mostraram que as MVs derivadas de células T estavam aumentadas no sangue de pacientes com hepatite C ativa [78]. Caivano et al. observaram maiores quantidades de MVs CD19+ em leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma não-Hodgkin (NHL) e em macroglobulinemia de Waldenstrom (MW) quando comparadas aos controles testados [79].

A LMC é caracteriza por imunossupressão da linhagem linfoide e expansão da linhagem mieloide [80], e os ITKs têm um modo de ação duplo com um efeito inibitório direto na tirosina quinase BCR::ABL1 e efeitos imunomoduladores ou supressores [43]. A liberação de MVs (sua abundância ou escassez) é afetada por vários cenários patológicos locais ou sistêmicos, onde prevalecem os estresses oxidativo, mecânico e metabólico, bem como a inflamação. Nesses casos, as MVs constituem uma resposta celular ao estresse, um mecanismo de defesa para restaurar a homeostase da membrana e da célula e garantir a sobrevivência [55].

A análise da rede biológica e da matriz de correlação demonstrou resultados interessantes ao longo do acompanhamento e tratamento. Porém, não há relatos na literatura sobre a regulação positiva ou negativa das interações das MVs em pacientes com LMC. O que podemos sugerir é que o aumento das correlações positivas entre as populações de MVs em F1 pode estar diretamente ligada a diminuição do número de células com o uso da HU, provavelmente porque o ciclo celular de todas as células é afetado devido a inibição da proliferação celular, em vista disso, há aumento da apoptose e aumento das MVs no meio circundante. O tratamento com ITK induzem alterações imunomoduladores e o aumento do número de correlações positivas em F3 em comparação com F2 pode estar ligada a disfunção imunológica devido a resposta molecular inadequada da maioria dos pacientes.

Embora alguns estudos sobre MVs de células da LMC tenham surgido, o foco da maioria dos estudos sobre VEs de LMC é voltado pra carga das VEs, análise dos ácidos nucléicos, transformações de linhagens celulares pelo transcritos BCR::ABL1 [27,42,81–88]. Caivano e colaboradores estudou várias neoplasias hematológicas e identificou que MVs CD13+ de pacientes com LMC foram significativamente maior comparados aos indivíduos saudáveis. Porém, nesta pesquisa, o CD13 não entrou no painel de imunofenotipagem.

Percebe-se portanto, o desafio de identificar um possível fenótipo único de antígeno de superfície celular em células leucêmicas de LMC [89], pois o único biomarcador para o diagnóstico e prognóstico da LMC, até o momento, é o BCR-ABL [90]. Imagina-se que um alvo

de antígeno de superfície celular útil deve estar nas células doentes, mas não em células-tronco normais ou células de leucemia mais diferenciadas, ou deve ter um padrão de expressão, densidade ou distribuição diferente, além de ser expresso de forma estável na superfície das células leucêmicas de LMC [89].

Para definir MVs como novos biomarcadores tumorais, seria apropriado avaliar a associação e combinação de múltiplos componentes. Como contagem de MVs, fenótipo e conteúdo molecular, possivelmente identificando um painel combinado dos seguintes parâmetros: número, antígenos de superfície e conteúdo de RNA/DNA/proteína. Somente uma caracterização detalhada e profunda de todos esses parâmetros, de forma simultânea, seria possível discriminar uma MV como biomarcador decorrentes de uma doença específica [84].

O impacto do tratamento com ITK e a progressão da doença no metaboloma de pacientes com LMC não está totalmente compreendido. Almeida e colaboradores dizem que o uso de uma nova ferramenta, como a metabolômica, pode ser útil para identificar novas vias metabólicas relacionadas à progressão da doença e à resposta ao ITK. Os metabólitos são resultados do metabolismo celular e molecular que respondem pela expressão e atividade de genes, transcritos e proteínas e podem ajudar a compreender os processos ligados à patogênese e progressão da LMC e à resposta do paciente aos ITK [90]. Nesse contexto, um objetivo importante na prática clínica é a identificação de novos biomarcadores, sensíveis e representativos da heterogeneidade tumoral, que possam melhorar o diagnóstico e o monitoramento da doença [84].

Nosso estudo é exploratório e devido aos poucos casos de LMC diagnosticados por ano na Fundação HEMOAM, estamos ciente que o número amostral de participantes é um limitador da nossa pesquisa. Além de não ter tantos estudos sobre as caracterização de MVs derivadas da LMC, também não segregamos as MVs de acordo com suas dimensões nanométricas. Como o nosso estudo focou na imunofenotipagem das MVs, é necessário que outras pesquisas com o número maior de participantes validem nossos achados, além de associarem MVs com outros parâmetros no estudo, como expressão de citocinas, quimiocinas, fator de risco, resposta terapêutica e carga da MV, dentre outros.

5. CONCLUSÃO

As MVs derivadas das células do sangue periférico de pacientes com LMC, carregam características da célula que lhe deu origem, e podem influenciar e modular respostas imunes tanto no início da doença como ao longo do tratamento.

Esta pesquisa sugere que os pacientes com LMC ao diagnóstico apresentam maior expressão de MVs CD34+, CD16+, CD66b, CD11c, CD235a, CD51/61 comparados ao indivíduos saudáveis. Nos primeiros meses de tratamento com ITK a expressão de todas as MVs diminui, e quando o paciente não responde bem ao tratamento essas MVs começam a aumentar

novamente.

Assim, as MVs podem contribuir para avaliação de resposta a tratamento antes mesmo do paciente apresentar altos níveis de transcritos. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para que as MVs possam ser considerados biomarcadores de resposta ao tratamento para LMC.

6. CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Andréa M. Tarragô idealizou, supervisionou e conseguiu arrecadar fundos para a realização do estudo; Iandara Maíra L. de Souza, Allyson G. da Costa e Andréa M. Tarragô participaram da elaboração do manuscrito e da pesquisa bibliográfica; Iandara Maíra L. de Souza, Miliane A. de Sousa, Emanuela Vitória B. Alves, Erycka A. de Mesquita, Jhemerson F. Paes, Deborah C. de Aquino, Bruno Eduardo F. do Nascimento, Wanessa H. Laranjeira, Armanda Barbosa, Wivian da C. Costa da Silva, Geysa Adriana da S. Soares, Adriana Malheiro, Allyson G. da Costa e Andréa M. Tarragô realizaram a interpretação formal dos dados; Iandara Maíra L. de Souza, Wivian da C. Costa da Silva, Geysa Adriana da S. Soares, Marina Malheiros Araújo Silvestrini, Andréa Teixeira-Carvalho, Allyson G. da Costa e Andréa M. Tarragô realizaram as análises estatísticas. Andréa M. Tarragô, Allyson G. da Costa, Andréa Teixeira-Carvalho, Olindo Assis Martins-Filho, Adriana Malheiro, Rosângela Santos de Abreu, Cristina Mesquita e Suely Rezende revisaram e editaram o manuscrito. Todos os autores revisaram o manuscrito.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe de apoio do Laboratório de Genômica (HEMOAM), e ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores - GIPB, (FIOCRUZ-Minas).

8. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) Programa Pró-Estado — nº 002/2008, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) nº 007/2018 e nº 005/2019; Programa POSGRAD — nº 005/2022, Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD Amazônia).

Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar, ou preparação do manuscrito.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization. 2017.
2. Santos VM dos, Leite RG de M, Ferreira KF, Miranda T do A, Aguiar CN. Diagnóstico de leucemia mieloide crônica em fase acelerada: relato de caso. *Brasília Médica*. 2018;55:22–6.
3. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2022;97:1236–56.
4. Vieira F da C, Bonito D, Borducchi DM, del Giglio A, Bollmann PW. Desfecho e preditores de resposta aos inibidores de Tirosinoquinase de 2ª geração em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica resistentes ao Imatinibe. *Clin Oncol Lett*. 2018;3(01–02):45–52.
5. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* [Internet]. 2015;385(9976):1447–59. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62120-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62120-0)
6. Azevedo LD, Bastos MM, Oliveira AP de, Boechat N. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Quim Nov* [Internet]. 2017;40(7):791–809. Available at: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170027>
7. Bonavigo AG, Sarturi PR. Comparação entre o diagnóstico citogenético e por biologia molecular das leucemias mieloides crônicas (LMC): uma revisão bibliográfica Comparison between cytogenetic and molecular biology diagnosis of chronic myeloid leukemias (CML): a bibliographic r. *RBAC*. 2018;50:47–50.
8. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, et al. Chronic myeloid leukemia, version 2.2021. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2020;18(10):1385–415.
9. Bruford EA, Antonescu CR, Carroll AJ, Chinnaiyan A, Cree IA, Cross NCP, et al. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) recommendations for the designation of gene fusions. *Leukemia*. 2021;35:3040–3.
10. Leukemia WHO Classification of Haematolymphoid Tumours, 5th edition, 2022 [Internet]. Springer Nature. 2022. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01625-x%0AINTRODUCTION>
11. Martins P, Andrade RJ. Tratamento da leucemia mieloide crônica com inibidores da tirosino quinase. *Rev Thêma Sci*. 2018;8(no 1E):161–71.
12. Sampaio MM et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. In: *World Journal of Clinical Oncology*. 2021. p. 69–94.
13. Hu Y, Li Q, Hou M, Peng J, Yang X, Xu S. Magnitude and temporal trend of the chronic myeloid leukemia: on the basis of the global burden of disease study 2019. *JCO Glob Oncol*. 2021;(7):1429–41.
14. Bavaro L, Martelli M, Cavo M, Soverini S. Mechanisms of disease progression and resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: An update. *Int J Mol Sci*.

2019;20:1–23.

15. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2020;34(4):966–84. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>

16. Ribeiro AC de A, Pratti JES, Nogueira TA, Cordeiro BC. Acompanhamento farmacoterapêutico e a detecção de reações adversas a inibidores de tirosinoquinase utilizados no tratamento da leucemia mielóide crônica / Pharmacotherapeutic follow-up and detection of adverse reactions to tyrosinokinase inhibitors used in. *Brazilian J Heal Rev.* 2020;3(6):19438–54.

17. Dingli D, Traulsen A, Pacheco JM. Chronic Myeloid Leukemia: Origin, Development, Response to Therapy, and Relapse. *Clin Leuk.* 2008;2(2):133–9.

18. Moisiu V, Teodorescu P, Parajdi L, Pasca S, Zdrenghea M, Dima D, et al. Assessing measurable residual disease in chronic myeloid leukemia. BCR-ABL1 IS in the avant-garde of molecular hematology. *Front Oncol.* 2019;9(September):1–8.

19. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(5):999–1003.

20. Cavalcanti, Heloísa Nelson; Silva Fiho, Tiago João; Queiroz LMG. Vesículas extracelulares: o que sabemos até agora. *Clin Lab Res Dent.* 2021;1–8.

21. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic.* 2018;19(5):319–27.

22. Aharon A, Rebibo-Sabbah A, Tzoran I, Levin C. Extracellular vesicles in hematological disorders. *Rambam Maimonides Med J.* 2014;5(4):e0032.

23. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* [Internet]. 2018;28(8):R435–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>

24. Bode AP, Hickerson DHM. Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets.* 2000;11(5):259–71.

25. Taylor R. Interpretation of the correlation coefficients: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr.* 1990;6(1):35–9.

26. Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White DL, Hughes TP, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood.* 2017;129(9):1166–76.

27. Li Q, Zhong Z, Zeng C, Meng L, Li C, Luo Y, et al. A clinical observation of chinese chronic myelogenous leukemia patients after discontinuation of tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget.* 2016;7(36):58234–43.

28. García-Suárez J, Gil-Fernández JJ. Epidemiología de la leucemia mieloide crónica en España y sus posibles implicaciones terapéuticas. *Rev Clin Esp* [Internet]. 2016;216(6):311–2. Available

at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2016.05.003>

29. Harrington P, Dillon R, Radia D, McLornan D, Woodley C, Asirvatham S, et al. Chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and resistant to tyrosine kinase inhibitor therapy display exhausted T-cell phenotype. *Br J Haematol.* 2022;198:1011–5.
30. Alves R de CS. Análise de pacientes com leucemia mieloide crônica com resistência primária ou secundária ao mesilato de imatinibe. *Rev Bras Hematol e Hemoterapia.* 2009;31(3):166–77.
31. Albuquerque PMS de, Ximenes DIJ, Diniz M de FFM. Avaliação da qualidade de vida de portadores de leucemia mieloide crônica em João Pessoa-PB no período de 2015 a 2016. *Rev Eletrônica Acervo Saúde / Electron J Collect Heal REAS/EJCH.* 2019;11(14):1–8.
32. Dal Ponte ES, Wagner SC, Linden R, Schirmer H. Study of correlation between imatinib mesylate plasma levels and hematological profile of patients undergoing treatment for chronic myeloid leukemia. *J Bras Patol e Med Lab.* 2017;53(3):159–64.
33. Oliveira RF, Maia MM, Sousa RD. Leucemia Mieloide Crônica (LMC): aspectos fisiopatológicos, diagnóstico e tratamentos. *Rev FIMCA.* 2021;8(1):12–8.
34. Himmelstein MS, Sanchez DT. Masculinity impediments: internalized masculinity contributes to healthcare avoidance in men and women. *J Health Psychol.* 2016;21(7):1283–92.
35. Gomes R, Nascimento EF do, Araújo FC. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior Why do men use health services less than women? Explanations by men with low versus higher education. *Cad Saúde Publica - Rio Janeiro.* 2007;23(3):565–74.
36. Lucena R. Os homens (ainda) não vão ao médico [Internet]. *Diário de Pernambuco.* 2019. Available at: <https://www.diariodepernambuco.com.br/noticia/opiniaio/2019/10/os-homens-ainda-nao-vao-ao-medico.html>
37. Sossela FR, Zoppas BC de A, Weber LP. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. *Rev Bras Análises Clínicas.* 2017;49(2):127–30.
38. Bonfim ACS, Anjos BS, França KFC, Couto LA, Santos RWF, Santana VHS, et al. O papel da citogenética e da biologia molecular no diagnóstico da leucemia mieloide crônica. *Brazilian J Heal Rev.* 2022;5(2):5153–64.
39. Viganò I, Di Giacomo N, Bozzani S, Antolini L, Piazza R, Gambacorti Passerini C. First-line treatment of 102 chronic myeloid leukemia patients with imatinib: A long-term single institution analysis. *Am J Hematol.* 2014;89(10):E184–7.
40. Yang H, Zhou H, Huang Z, Tao K, Huang N, Peng Z, et al. Induction of CML-specific immune response through cross-presentation triggered by CTP-mediated BCR-ABL-derived peptides. *Cancer Lett.* 2020;482:44–55.
41. Jabbour E, Saglio G, Hughes TP, Kantarjian H. Suboptimal responses in chronic myeloid leukemia: Implications and management strategies. *Cancer.* 2012;118(5):1181–91.

42. Bernardi S, Farina M. Exosomes and extracellular vesicles in myeloid Neoplasia: The multiple and complex roles played by these “magic bullets”. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):1–24.
43. Hsieh YC, Kirschner K, Copland M. Improving outcomes in chronic myeloid leukemia through harnessing the immunological landscape. *Leukemia [Internet]*. 2021;35(5):1229–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-021-01238-w>
44. Hughes A, Yong ASM. Immune effector recovery in chronic myeloid leukemia and treatment-free remission. *Front Immunol*. 2017;8(469):1–12.
45. Al-amleh EK, Al-sanabra OM, Alqaisi KM, Alqaraleh M, Al-nahal J, Hamadneh L, et al. Investigation of the effect of imatinib and hydroxyurea combination therapy on hematological parameters and gene expression in chronic myeloid leukemia (CML) patients. *J Clin Med*. 2022;11(4954):1–15.
46. Cortes J, Kantarjian H. How I treat newly diagnosed chronic phase CML. *Blood [Internet]*. 2012;120(7):1390–7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916560/>
47. Kapor S, Čokić V, Santibanez JF. Mechanisms of hydroxyurea-induced cellular senescence: an oxidative stress connection? *Oxid Med Cell Longev [Internet]*. 2021;2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8545575/>
48. Huang M, Facca C, Fatmi Z, Baille D, Bénakli S, Vernis L. DNA replication inhibitor hydroxyurea alters Fe-S centers by producing reactive oxygen species in vivo. *Sci Rep*. 2016;6(29361):1–12.
49. Santos SS, dos Santos IG, Silva CV da, Cazedey ECL. Qualitative Analysis of Hydroxyurea. *Drug Anal Res [Internet]*. 2020;4(1):18–21. Available at: <https://seer.ufrgs.br/index.php/dar/article/view/100682/58267>
50. Singh A, Xu Y. The Cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes (Basel)*. 2016;7(99):1–15.
51. Aswad MH, Kissova J, Ovesna P, Rihova L, Penka M. The clinical significance of circulating microparticles concerning thrombosis in BCR/ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *In Vivo (Brooklyn)*. 2021;35:3345–53.
52. Zhu X, You Y, Li Q, Zeng C, Fu F, Guo A, et al. BCR-ABL1-positive microvesicles transform normal hematopoietic transplants through genomic instability: Implications for donor cell leukemia. *Leukemia*. 2014;28(8):1666–75.
53. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’Souza-Schorey C. Microvesicles: Mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010;123(10):1603–11.
54. Taylor DD, Gercel-taylor C. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet*. 2013;4(142):1–12.
55. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood cell-derived microvesicles in hematological diseases and beyond. *Biomolecules*. 2022;12(803):1–30.

56. Pelissier Vatter FA, Cioffi M, Hanna SJ, Castarede I, Caielli S, Pascual V, et al. Extracellular vesicle- and particle-mediated communication shapes innate and adaptive immune responses. *J Exp Med*. 2021;218(8):1–14.
57. Ehsanpour A, Saki N, Bagheri M, Behzad MM, Abroun S. The expression of microvesicles in leukemia: Prognostic approaches. *Cell J*. 2018;21(2):115–23.
58. Miljkovic-Licina M, Arraud N, Zahra AD, Ropraz P, Matthes T. Quantification and phenotypic characterization of extracellular vesicles from patients with acute myeloid and B-cell lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022;14(1).
59. Lin G, Finger E, Gutierrez-ramos JC. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol*. 1995;25:1508–16.
60. Kaplan D, Husel W, Lewandowska K. CD34 expression on platelets. *Platelets*. 2003;14(2):83–7.
61. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy S, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells*. 2014;32:1380–9.
62. Harada I, Sasaki H, Murakami K, Nishiyama A, Nakabayashi J. Compromised anti - tumor – immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients. *Nat Portf*. 2021;11:1–10.
63. Durai V, Murphy KM. Functions of murine dendritic cells. *Immunity*. 2016;45(4):719–36.
64. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85(4):639–46.
65. Reeves BN, Beckman JD. Novel pathophysiological mechanisms of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2021;16(3):304–13.
66. Hasselbalch HC, Elvers M, Schafer AI. The pathobiology of thrombosis, microvascular disease, and hemorrhage in the myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021;137(16):2152–60.
67. Van Der Meijden PEJ, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, Renné T, Ten Cate H. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1355–62.
68. Tissot J, Rubin O, Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(6):571–7.
69. Tuzovic M, Herrmann J, Iliescu C, Marmagkiolis K, Ziaieian B, Yang EH. Health Research Alliance. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2018;20(5).
70. Moliterno AR, Ginzburg YZ, Hoffman R. Clinical insights into the origins of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021;137(9):1145–53.
71. Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf AR, Kristinsson SY, et al. Risk of Arterial and Venous Thrombosis in Patients with Myeloproliferative Neoplasms: A population-based cohort study. *Ann Intern Med*. 2018;168(5):317–25.

72. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32(4):308–16.
73. Kolonics F, Kajdacsi E, Farkas VJ, Veres DS, Khamari D, Kittel A, et al. Neutrophils produce proinflammatory or anti-inflammatory extracellular vesicles depending on the environmental conditions. *J Leukoc Biol.* 2021;109(4):793–806.
74. Johnson III BJ, Kuethe JW, Caldwell CC. Neutrophil Derived Microvesicles: Emerging Role of a Key Mediator to the Immune Response. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2014;14(3):210–7.
75. Craver BM, Alaoui K El, Scherber RM, Fleischman AG. The Critical role of inflammation in the pathogenesis and progression of myeloid malignancies. *Cancers (Basel).* 2018;10(104):1–18.
76. Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR, Dellar ER, Pantazi P, et al. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo. *J Extracell vesicles.* 2022;11(1).
77. Lim K, Hyun Y, Lambert-emo K, Capece T, Bae S, Miller R, et al. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8 + T cells in the airways. *Science (80-).* 2015;349(6252).
78. Kornek M, Popov Y, Libermann TA, Afdhal NH, Schuppan D. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2011;53(1):230–42.
79. Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumor Biol.* 2015;36(12):9739–52.
80. Brück O, Blom S, Dufva O, Turkki R, Chheda H, Ribeiro A, et al. Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML. *Leukemia.* 2018;32:1643–56.
81. Raimondo S, Corrado C, Raimondi L, De Leo G, Alessandro R. Role of extracellular vesicles in hematological malignancies. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
82. Cai J, Wu G, Tan X, Han Y, Chen C, Li C, et al. Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice. *PLoS One.* 2014;9(8):1–11.
83. Fu FF, Zhu XJ, Wang HX, Zhang LM, Yuan GL, Chen ZC, et al. BCR-ABL1-positive microvesicles malignantly transform human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin [Internet].* 2017;38(11):1475–85. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.116>
84. Trino S, Lamorte D, Caivano A, De Luca L, Sgambato A, Laurenzana I. Clinical relevance of extracellular vesicles in hematological neoplasms: from liquid biopsy to cell biopsy. *Leukemia [Internet].* 2021;35(3):661–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-01104-1>
85. Kang K, Jung J, Hur W, Park J, Shin H, Choi B, et al. The potential of exosomes derived from

- chronic myelogenous leukaemia cells as a biomarker. *Anticancer Res.* 2018;38:3935–42.
86. Bernardi S, Malagola M, Polverelli N, Russo D. Exosomes in chronic myeloid leukemia: are we reading a new reliable message? *Acta Haematol.* 2020;143:509–10.
87. Ghafouri-fard S, Niazi V, Taheri M. Contribution of extracellular vesicles in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Heliyon.* 2021;7(e06030).
88. Zhang J, Zhao A, Sun L, Chen W, Zhang H, Chen Z, et al. Selective surface marker and miRNA profiles of CD34+ blast-derived microvesicles in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Lett.* 2017;14(2):1866–74.
89. Houshmand M, Simonetti G, Circosta P, Gaidano V, Cignetti A, Martinelli G, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia.* 2019;33:1543–56.
90. de Almeida FC, Berzoti-Coelho MG, Toro DM, Cacemiro M da C, Bassan VL, Barretto GD, et al. Bioactive lipids as chronic myeloid leukemia's potential biomarkers for disease progression and response to tyrosine kinase inhibitors. *Front Immunol.* 2022;13(840173):1–8.

MATERIAL SUPLEMENTAR

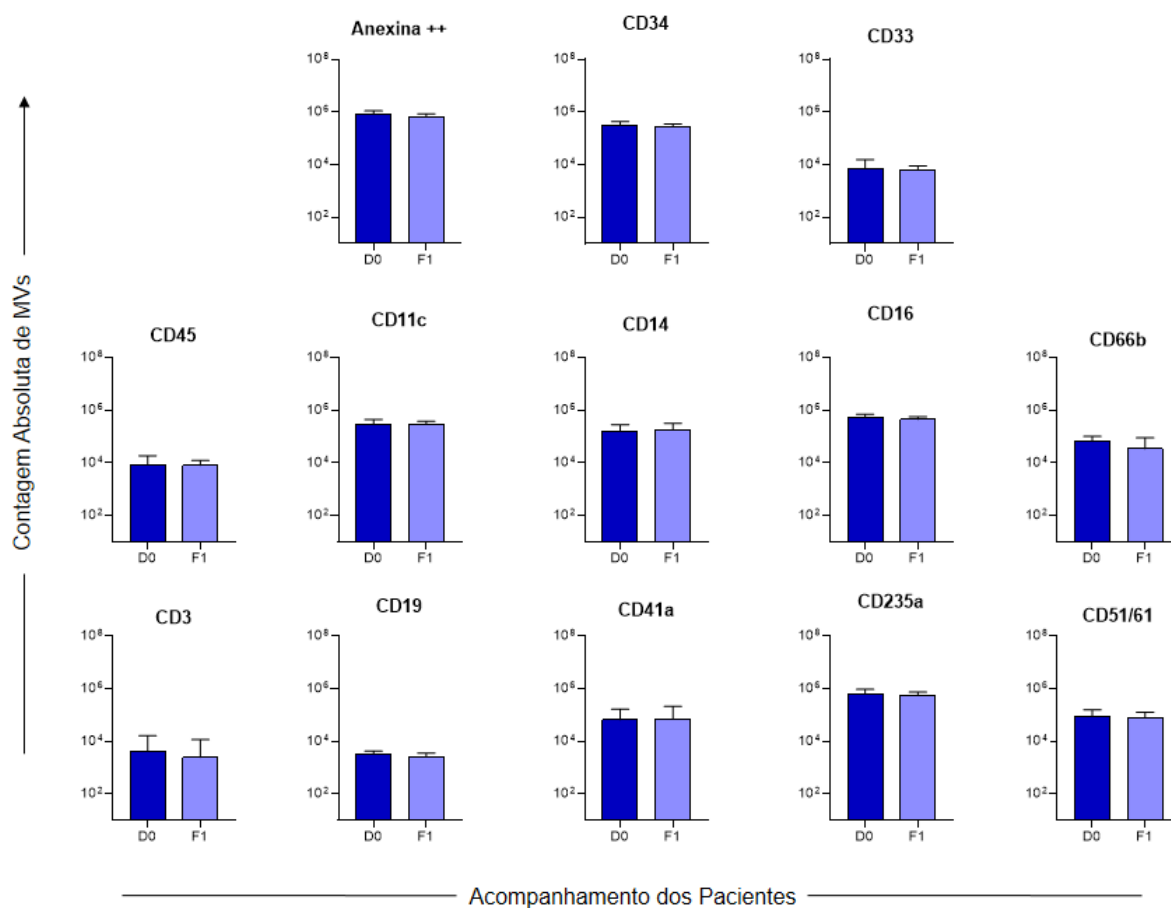


Figura suplementar. Perfil das MVs de Pacientes com LMC ao diagnóstico e no seguimento clínico. Comparação das MVs ao diagnóstico e antes de iniciar o tratamento com o ITK, paciente tomando hidroxiuréia (citorredutor), níveis de MVs totais – Anexina ++; MVs derivadas de Progenitores – CD34; Mielóides – CD33; Leucócitos – CD45; Células dendríticas – CD11c; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66b; Células T – CD3; Células B – CD19; Plaquetas – CD41a; Eritrócitos – CD235a; e Células Endoteliais – CD51/61. Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, mostrando a mediana (intervalo interquartil) do número absoluto de MV/mm³ de plasma. A análise dos dados foi realizada através do teste de Wilcoxon. Gráfico não apresentou diferença significativa. Abreviação: D0 – Pacientes com LMC ao diagnóstico; F1 – follow-up/seguimento

6. CONCLUSÃO

A população estudada nesta pesquisa é majoritariamente do sexo masculino com idade em torno da quarta década de vida. Ademais, apresentaram diversas manifestações clínicas ao diagnóstico.

Apesar do baixo número amostral, os resultados da pesquisa mostraram que as microvesículas liberadas de células progenitoras (CD34), neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a), células dendríticas (CD11c) e células endoteliais (CD51/61) são significativamente mais expressas nos pacientes com LMC em comparação ao grupo controle.

Ao iniciar o tratamento com ITK, a expressão das MVs começam a diminuir, com exceção das plaquetas. Pode -se observar ainda que quando os pacientes não estão respondendo bem ao tratamento as MVs tendem a subir novamente, exceto as MVs derivadas de células T e B que continuam diminuindo.

São necessárias investigações futuras com um número maior de participantes por um período maior de acompanhamento para assim validar esses achados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization. 2017.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018;93(3):442–59.
3. Leukemia WHO Classification of Haematolymphoid Tumours, 5th edition, 2022 [Internet]. Springer Nature. 2022. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01625-x%0AINTRODUCTION>
4. Hu Y, Li Q, Hou M, Peng J, Yang X, Xu S. Magnitude and temporal trend of the chronic myeloid leukemia: on the basis of the global burden of disease study 2019. *JCO Glob Oncol*. 2021;(7):1429–41.
5. Sampaio MM et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. In: *World Journal of Clinical Oncology*. 2021. p. 69–94.
6. Cavalcanti, Heloísa Nelson; Silva Fiho, Tiago João; Queiroz LMG. Vesículas extracelulares : o que sabemos até agora. *Clin Lab Res Dent*. 2021;1–8.
7. Sedgwick AE, D’Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*. 2018;19(5):319–27.
8. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
9. Słomka A, Urban SK, Lukacs-Kornek V, Żekanowska E, Kornek M. Large extracellular vesicles: Have we found the holy grail of inflammation? *Front Immunol*. 2018;9(December).
10. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’Souza-Schorey C. Microvesicles: Mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010;123(10):1603–11.
11. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Dev*. 2013;140(12):2463–7.
12. Chapman J, Zhang Y. Histology , Osteocytes Histochemistry and Cytochemistry. *StatPearls* [Internet]. 2022;23–6. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558990/>
13. Instituição Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. INCA, organizador. Rio de Janeiro; 2019. 122 p.
14. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.

15. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 6 ed. Revista Atual. Rio de Janeiro: INCA; 2020. p. 114.
16. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
17. Ho YH, Méndez-Ferrer S. Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging. *Haematologica.* 2020;105(1):38–46.
18. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do Câncer. 5ª. Rio de Janeiro: Revista, atualizada e ampliada; 2019. 111 p.
19. Instituto nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. INCA, organizador. Rio de Janeiro; 2022.
20. Calefi KAC, Rocha V, Nabhan SK, Maftum MA, Kalinke LP, Mantovani MF. Qualidade de vida do paciente com neoplasia hematológica submetido à quimioterapia. *Reme Rev Min Enferm.* 2014;18(1):41–7.
21. Oliveira MD, Souza RF, Canuto DKS, Machado AM, Machado AR da SR. Avaliação do perfil epidemiológico das neoplasias onco-hematológicas de pacientes atendidos pelo instituto de câncer de três lagoas, no período de 2014 a 2018. *Brazilian J Dev.* 2020;6(2):7301–14.
22. Melo N. Trajetória da incidência e mortalidade das neoplasias hematológicas no Brasil. *Obs Oncol* [Internet]. 2019; Available at: <https://observatoriodeoncologia.com.br/trajetoria-da-incidencia-e-mortalidade-das-neoplasias-hematologicas-no-brasil/>
23. Tebbi CK. Etiology of acute leukemia: a review. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021;13(9):1–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13092256>
24. World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer. Leukaemia: Globocan 2020. The global cancer observatory [Internet]. 2020 [citado 10 de julho de 2021]. p. 1–2. Available at: <https://gco.iarc.fr/>
25. Brasil. Estimativas da população residente no Brasil [Internet]. IBGE. 2021. Available at: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html?=&t=downloads>
26. Associação Brasileira de Linfomas e Leucemia. Pandemia reduziu diagnósticos e evidenciou desigualdade nos tratamentos do câncer [Internet]. Abrale na Mídia. 2021. Available at: <https://www.abrale.org.br/abrale-na-midia/pandemia-reduziu-diagnosticos-e-evidenciou-desigualdade-nos-tratamentos-do-cancer/>
27. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and

- predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(8):1–16.
28. Azevedo LD, Bastos MM, Oliveira AP de;, Boechat N. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Quim Nov* [Internet]. 2017;40(7):791–809. Available at: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170027>
 29. Instituto Nacional de Câncer. Leucemia - tipos e subtipos. Ministério da Saúde. 2022.
 30. Santos VM dos, Leite RG de M, Ferreira KF, Miranda T do A, Aguiar CN. Diagnóstico de leucemia mieloide crônica em fase acelerada: relato de caso. *Brasília Médica*. 2018;55:22–6.
 31. Vieira F da C, Bonito D, Borducchi DM, del Giglio A, Bollmann PW. Desfecho e preditores de resposta aos inibidores de Tirosinoquinase de 2ª geração em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica em fase crônica resistentes ao Imatinibe. *Clin Oncol Lett*. 2018;3(01–02):45–52.
 32. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* [Internet]. 2015;385(9976):1447–59. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62120-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62120-0)
 33. Bonavigo AG, Sarturi PR. Comparação entre o diagnóstico citogenético e por biologia molecular das leucemias mieloides crônicas (LMC): uma revisão bibliográfica Comparison between cytogenetic and molecular biology diagnosis of chronic myeloid leukemias (CML): a bibliographic r. *RBAC*. 2018;50:47–50.
 34. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, et al. Chronic myeloid leukemia, version 2.2021. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2020;18(10):1385–415.
 35. Martins P, Andrade RJ. Tratamento da leucemia mieloide crônica com inibidores da tirosina quinase. *Rev Thêma Sci*. 2018;8(nº 1E):161–71.
 36. Nussbaum RL, McInnes RR WH. Thompson & Thompson genética médica. 8 ed. Rio de Janeiro: GEN Grupo Editorial Nacional. Selo Editora Guanabara Koogan Ltda.; 2021.
 37. Sazawal S, Chhikara S, Singh K. Distribution of common BCR-ABL fusion transcripts and their impact on treatment response in imatinib treated CML patients: A study from India. *Indian J Pathol Microbiol*. 2019;62(2):256–60.
 38. Zuo S, Sun L, Wang Y, Chen B, Wang J, Ge X, et al. Establishment of a novel mesenchymal stem cell-based regimen for chronic myeloid leukemia differentiation therapy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021;(12). Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-03499-w>
 39. Silva AVB de A, Neto EMR, Junior FJG, Araújo P mesquita C, Viana EDRN, Fonteles MM de F. Acompanhamento farmacoterapêutico em leucemia mieloide crônica: avaliação das intervenções farmacêuticas Pharmacotherapeutic accompaniment in chronic myeloid leukemia: evaluation of pharmaceutical intervention. *Bol Inf GEUM*.

- 2016;7(nº1):82–92.
40. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595–606.
 41. Sillaber C, Mayerhofer M, Agis H, Sagaster V, Mannhalter C, Sperr WR, et al. Chronic myeloid leukemia: Pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts. *Wien Klin Wochenschr*. 2003;115(13–14):485–504.
 42. Dingli D, Traulsen A, Pacheco JM. Chronic Myeloid Leukemia: Origin, Development, Response to Therapy, and Relapse. *Clin Leuk*. 2008;2(2):133–9.
 43. Minciacchi VR, Kumar R, Krause DS. Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. *Cells*. 2021;10(1):1–23.
 44. Gonon-Demoulian R, Goldman JM, Nicolini FE. Historique de la leucémie myéloïde chronique: Un paradigme de traitement du cancer. *Bull Cancer* [Internet]. 2014;101(1):56–67. Available at: <http://dx.doi.org/10.1684/bdc.2013.1876>
 45. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25:85–109.
 46. Cortes J, Pavlovsky C, Saubele S. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2021;398(10314):1914–26.
 47. Torres DG, Paes J, Costa AG, Malheiro A, Silva G V, Souza LP De, et al. JAK2 variant signaling : genetic , hematologic and immune implication in chronic myeloproliferative neoplasms. *Biomolecules*. 2022;12(291).
 48. Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2015;6(6):403–12.
 49. Bavaro L, Martelli M, Cavo M, Soverini S. Mechanisms of disease progression and resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: An update. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1–23.
 50. Chen Y, Peng C, Li D, Li S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2010;1(2):124–32.
 51. Souza C a, Pagnano KB., Bendit I, Conchon M, Freitas CMMM, Moellmann, a; Funke V a. M, et al. Leucemia mieloide crônica. *Rev Assoc Médica Bras*. 2013;9(3):220–32.
 52. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2020;34(4):966–84. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>
 53. Brasil. Ministerio da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde. Portaria Conjunta n. 4 de 01/03/2021 - PCDT da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto [Internet]. 2021. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticas->

- pcdt/arquivos/2021/leucemia-mieloide-cronica-do-adulto-pcdt.pdf
54. Ribeiro AC de A, Pratti JES, Nogueira TA, Cordeiro BC. Acompanhamento farmacoterapêutico e a detecção de reações adversas a inibidores de tirosinoquinase utilizados no tratamento da leucemia mielóide crônica / Pharmacotherapeutic follow-up and detection of adverse reactions to tyrosinokinase inhibitors used in. *Brazilian J Heal Rev.* 2020;3(6):19438–54.
 55. Moisoiu V, Teodorescu P, Parajdi L, Pasca S, Zdrenghia M, Dima D, et al. Assessing measurable residual disease in chronic myeloid leukemia. BCR-ABL1 IS in the avant-garde of molecular hematology. *Front Oncol.* 2019;9(September):1–8.
 56. Feriotto G, Tagliati F, Giriolo R, Casciano F, Tabolacci C, Beninati S, et al. Caffeic acid enhances the anti-leukemic effect of imatinib on chronic myeloid leukemia cells and triggers apoptosis in cells sensitive and resistant to imatinib. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1–12.
 57. Cortes J, Rea D, Lipton JH. Treatment-free remission with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol.* 2019;94(3):346–57.
 58. Chereda B, Melo J V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol.* 2015;94(2):107–21.
 59. Instituto Oncoguia. Terapia Alvo para Leucemia Mieloide Crônica [Internet]. São Paulo: oncoguia; 2015. Availbre from: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/terapia-alvo-para-leucemia-mieloide-cronica-lmc/1652/338/>. 2015.
 60. Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia. Tratamento. [Internet]. São Paulo: abrale; 2020. Availbre from: <https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lmc/tratamento/>. 2020.
 61. Silva AMB da, Moreira-Nunes CA, Lemos JAR de. Expressão do gene ABCA7 como indicador de adesão terapêutica ao Mesilato de Imatinib em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica / Expression of the ABCA7 gene as adherence indicator to Imatinib Mesylate in patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Brazilian J Heal Rev.* 2021;4(1):1829–40.
 62. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(5):999–1003.
 63. Stagno F, Breccia M, Di Raimondo F. On the road to treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: what about ‘the others’? *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2020;20(12):1075–81. Available at: <https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1829483>
 64. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia : 2022 update on diagnosis , therapy , and monitoring. *Am J Hematol.* 2022;97:1236–56.
 65. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Ph D, et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.*

- 2017;376(10):917–27.
66. Hehlmann R. The new ELN recommendations for treating CML. *J Clin Med*. 2020;9(3671).
 67. Hsieh YC, Kirschner K, Copland M. Improving outcomes in chronic myeloid leukemia through harnessing the immunological landscape. *Leukemia* [Internet]. 2021;35(5):1229–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-021-01238-w>
 68. Kreutzman A, Yadav B, Brummendorf TH, Gjertsen BT, Hee Lee M, Janssen J, et al. Immunological monitoring of newly diagnosed CML patients treated with bosutinib or imatinib first-line. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019;8(9):1–13. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1638210>
 69. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähteenmäki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108–16.
 70. Van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(4):213–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
 71. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* [Internet]. 2013;200(4):373–83. Available at: https://rupress.org/jcb/article-pdf/200/4/373/1262520/jcb_201211138.pdf
 72. Nikoloff JM, Saucedo-espinoza MA, Kling A, Dittrich PS. Identifying extracellular vesicle populations from single cells. *PNAS*. 2021;118(38).
 73. Izadirad M, Huang Z, Jafari F, Hamidieh AA, Gharehbaghian A, Li YD, et al. Extracellular vesicles in acute leukemia: A mesmerizing journey with a focus on transferred microRNAs. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(October):1–15.
 74. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* [Internet]. 2018;28(8):R435–44. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
 75. Teng F, Fussenegger M. Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering. *Adv Sci*. 2021;8(1):1–17.
 76. Raimondo S, Corrado C, Raimondi L, De Leo G, Alessandro R. Role of extracellular vesicles in hematological malignancies. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
 77. Forte D, Barone M, Palandri F, Catani L. The “vesicular intelligence” strategy of blood cancers. *Genes (Basel)*. 2021;12(3).
 78. Litwińska Z, Łuczowska K, Machaliński B. Extracellular vesicles in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018;0(0):1–8. Available at: <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1459606>
 79. Aharon A, Rebibo-Sabbah A, Tzoran I, Levin C. Extracellular vesicles in hematological disorders. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0032.

80. Trino S, Lamorte D, Caivano A, De Luca L, Sgambato A, Laurenzana I. Clinical relevance of extracellular vesicles in hematological neoplasms: from liquid biopsy to cell biopsy. *Leukemia* [Internet]. 2021;35(3):661–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-020-01104-1>
81. Bernardi S, Farina M. Exosomes and extracellular vesicles in myeloid Neoplasia: The multiple and complex roles played by these “magic bullets”. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):1–24.
82. Zhang J, Zhao A, Sun L, Chen W, Zhang H, Chen Z, et al. Selective surface marker and miRNA profiles of CD34+ blast-derived microvesicles in chronic myelogenous leukemia. *Oncol Lett*. 2017;14(2):1866–74.
83. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Węglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(7):808–18.
84. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: Potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*. 2006;20(1):1–26.
85. Ehsanpour A, Saki N, Bagheri M, Behzad MM, Abroun S. The expression of microvesicles in leukemia: Prognostic approaches. *Cell J*. 2018;21(2):115–23.
86. Pando A, Reagan JL, Quesenberry P, Fast LD. Extracellular vesicles in leukemia. *Leuk Res* [Internet]. 2018;64(November 2017):52–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.11.011>
87. Cai J, Wu G, Tan X, Han Y, Chen C, Li C, et al. Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice. *PLoS One*. 2014;9(8):1–11.
88. Zhu X, You Y, Li Q, Zeng C, Fu F, Guo A, et al. BCR-ABL1-positive microvesicles transform normal hematopoietic transplants through genomic instability: Implications for donor cell leukemia. *Leukemia*. 2014;28(8):1666–75.
89. Karantanou C, Minciacchi VR, Karantanos T. Extracellular vesicles in myeloid neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
90. Rzepiel A, Kutszegi N, Sági JC, Andrea K, Semsei ÁF, Buzás E, et al. Extracelluláris vesiculák és Hematológiai malignitásokban játszott szerepök. *Orv Hetil*. 2016;157(35):1379–84.
91. CUSABIO. What Is The Cell Surface Marker? [Internet]. CUSABIO TECHNOLOGY. 2022. Available at: https://www-cusabio-com.translate.google.com/Cell-Marker/Cell-Surface-Marker.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt-BR&_x_tr_pto=sc
92. Ståhl A, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in

- normal physiology , pathophysiology , and renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2019;34:11–30.
93. Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PR, Dellar ER, Pantazi P, et al. In sickness and in health : The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo. *J Extracell vesicles.* 2022;11(1).
 94. Ekström K, Crescitelli R, Pétursson HI, Johansson J, Lässer C, Bagge RO. Characterization of surface markers on extracellular vesicles isolated from lymphatic exudate from patients with breast cancer. *BMC Cancer.* 2022;22(50):1–17.
 95. Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Ochiya T, Yoshioka Y, et al. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracellul vesicles* [Internet]. 2013;2:1(20420). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498139/>
 96. Lv Y, Tan J, Miao Y, Zhang Q. The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2019;(23):7894–904. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6850934/pdf/JCMM-23-7894.pdf>
 97. Clancy JW, Schmidtman M, D’Souza-Schorey C. The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances.* 2021;3:399–406.
 98. Gurunathan S, Kang M, Qasim M, Khan K, Kim J-H. Biogenesis , membrane trafficking , functions , and next generation nanotherapeutics medicine of extracellular vesicles. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:3357–83.
 99. Kim W, Ryu CJ. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep* [Internet]. 2017;50(6):285–98. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498139/>
 100. Al Barashdi MA, Ali A, McMullin MF, Mills K. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *J Clin Pathol.* 2021;74(9):548–52.
 101. Bonilla H, Hampton D, Marques de Menezes EG, Deng X, Montoya JG, Anderson J, et al. Comparative analysis of extracellular vesicles in patients with severe and mild myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Front Immunol.* 2022;13(March):1–6.
 102. Miljkovic-Licina M, Arraud N, Zahra AD, Ropraz P, Matthes T. Quantification and phenotypic characterization of extracellular vesicles from patients with acute myeloid and B-cell lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel).* 2022;14(1).
 103. Vagida MS, Arakelyan A, Lebedeva AM, Shpektor A V, Margolis LB. Analysis of extracellular vesicles using magnetic nanoparticles in Blood of Patients with Acute Coronary Syndrome: extracellular vesicles in ischemic heart disease. *Biochem (mosc).* 2016;81(4):382–91.
 104. Caramori PRA, Casco JR, Zago AJ, Adelman AG. Inibição do receptor plaquetário

- glicoproteína (GP) IIb/IIIa em síndromes isquêmicas agudas e intervenções coronárias. *Arq Bras Cardiol.* 1998;71(5):725–34.
105. Bio-Rad Laboratories. The T cell marker , CD3 antigen and antibodies mini - review. In: Biorad [Internet]. 2016. p. 1–5. Available at: <https://www.bio-rad-antibodies.com/minireview-cd3-antibody.html>
 106. Ngoenkam J, Schamel WW, Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor–CD3 complex. *Immunology.* 2018;153(1):42–50.
 107. National Library of Medicine - National Center for Biotechnology Information. CD19 molecule [Homo sapiens (human)] [Internet]. 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/930#bibliography>
 108. Scheuermann RH, Racila E. CD 19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk Lymphoma.* 1995;18:385–97.
 109. LeicaBiosystems. CD19 - IHC Primary Antibodies [Internet]. 2023. Available at: <https://shop.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/ihc-primary-antibodies/pid-cd19>
 110. Zhou L, Shi H, Shi W, Yang L, Zhang Y, Xu M, et al. Durable molecular remission in a lymphoid BP-CML patient harboring T315I mutation treated with anti-CD19 CAR-T therapy. *Onco Targets Ther.* 2019;12:10989–95.
 111. Antwi-Baffour SS. Molecular characterisation of plasma membrane-derived vesicles. *J Biomed Sci.* 2015;22(68):1–7.
 112. Tóké-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *Int J COPD.* 2018;13:3749–57.
 113. Kalina T, Fišer K, Pérez-Andrés M, Kužílková D, Cuenca M, Bartol SJW, et al. CD maps—dynamic profiling of CD1–CD100 surface expression on human leukocyte and lymphocyte subsets. *Front Immunol.* 2019;10(OCT).
 114. Schneider L, Marcondes NA, Hax V, da Silva Moreira IF, Ueda CY, Piovesan RR, et al. Flow cytometry evaluation of CD14/CD16 monocyte subpopulations in systemic sclerosis patients: a cross sectional controlled study. *Adv Rheumatol.* 2021;61(1).
 115. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2019;10(AUG):1–13.
 116. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood cell-derived microvesicles in hematological diseases and beyond. *Biomolecules.* 2022;12(803):1–30.
 117. Wu J, Wu H, An J, Ballantyne CM, Cyster JG. Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *PNAS.* 2018;115(26):6786–91.

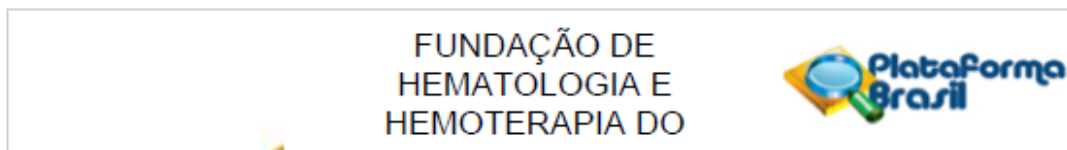
118. Durai V, Murphy KM. Functions of murine dendritic cells. *Immunity*. 2016;45(4):719–36.
119. Sadhu C, Ting HJ, Lipsky B, Hensley K, Garcia-martinez LF, Simon SI, et al. CD11c / CD18 : novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1395–403.
120. Beckman Coulter Life Sciences. CD 11 c Antibodies [Internet]. 2023. Available at: <https://www.mybeckman.com.br/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd11c>
121. Wu J, Wu H, An J, Ballantyne CM, Cyster JG. Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *PNAS*. 2018;115(26).
122. Biolegend Enabling Legendary Discovery. PE anti-human CD51 / 61 Antibody. In: AB_314442 (BioLegend Cat No 304406). 2012.
123. Boer S De, Bowman M, Notley C, Mo A, Lima P, Jong A De, et al. Endothelial characteristics in healthy endothelial colony forming cells ; generating a robust and valid ex vivo model for vascular disease. *J Thromb Haemost*. 2020;18:2721–31.
124. Hu S, Zhang H, Zhang Q, Xiu R. CD51 / CD61 + endothelial microparticles decrease in diabetes patients with hypertension. *Int J Sci Basic Appl Res*. 2020;51(2):88–94.
125. Samsel L, McCoy Jr JP. Imaging flow cytometry for the study of erythroid cell biology and pathology. *J Immunol Methods*. 2016;423:52–9.
126. Aoki T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell. *Membranes (Basel)*. 2017;7(56):1–19.
127. Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer G V., Hansen JK, Motto DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood*. 2013;121(18):3733–41.
128. Suades R, Padró T, Vilahur G, Martin-Yuste V, Sabaté M, Sans-Rosello J, et al. Growing thrombi release increased levels of CD235a + microparticles and decreased levels of activated platelet- derived microparticles . Validation in ST-elevation myocardial infarction patients. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1776–86.
129. El-Menshawey N, Eissa M, Farag R, Aboalyazed A. CD235a (Glycophorin-A) is the most predictive value among different circulating cellular microparticles in thrombocytopenic human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(3):235–43.
130. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Grogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2022;342(2):200–9.
131. Brandel V, Schimek V, Göber S, Hammond T, Brunthaler L, Schrottmaier WC, et al. Hepatectomy-induced apoptotic extracellular vesicles stimulate neutrophils to secrete

- regenerative growth factors. *J Hepatol.* 2022;77:1619–30.
132. Mckenna E, Mhaonaigh AU, Wubben R, Dwivedi A, Hurley T, Kelly LA, et al. Neutrophils : Need for Standardized Nomenclature. *Front Immunol.* 2021;12.
 133. Timár CI, Lőrincz ÁM, Csépanyi-kömi R, Vályi-nagy A, Nagy G, Buzás EI. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood.* 2013;121(3):510–8.
 134. Lim K, Hyun Y, Lambert-emo K, Capece T, Bae S, Miller R, et al. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8 + T cells in the airways. *Science (80-).* 2015;349(6252).
 135. Kong X, Guan J, Ma W, Li Y, Xing B, Yang Y. CD34 Over-Expression is associated with gliomas ' higher WHO grade. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):1–7.
 136. Marvasti TB, Alibhai FJ, Weisel RD, Li R. CD34+ Stem Cells: promising Roles in Cardiac Repair and Regeneration. *Can J Cardiol [Internet].* 2019; Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.05.037>
 137. Hernández-Caselles T, Martínez-Esparza M, Pérez-Oliva AB, Quintanilla-Cecconi AM, García-Alonso A, Alvarez-López DMR, et al. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol.* 2006;79:46–58.
 138. Huang Y, Lee J, Fan W, Hsu C, Tsai N, Lu C, et al. A CD33 frameshift variant is associated with neuromyelitis optica spectrum disorders. *Biomed J [Internet].* 2021;44(6):S93–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.07.007>
 139. Lajaunias F, Dayer J, Chizzolini C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol.* 2005;35:243–51.
 140. Taylor R. Interpretation of the correlation coefficients: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr.* 1990;6(1):35–9.

8. ANEXOS E APÊNDICES

8.1 Parecer consubstanciado do CEP/HEMOAM

8.1.1 Parecer da primeira submissão do Projeto



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Pesquisador: IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48463121.3.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.831.211

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo analítico, do tipo longitudinal prospectivo para caracterização das populações de microvesículas derivadas de células leucêmicas e leucócitos inflamatórios em pacientes diagnosticados com Leucemia Mieloide Crônica, tratadas na Fundação HEMOAM, localizada na cidade de Manaus-Amazonas. Para realização do estudo, serão utilizadas amostras sangue periférico de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica. Os dados clínico-laboratoriais serão coletados a partir de registros do laboratório de marcadores celulares e de prontuários da Fundação HEMOAM.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

- Caracterizar o perfil de MVs em pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico.

Objetivos Específicos

- Descrever as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico no período de 1 ano;
- Investigar a associação entre o perfil de MVs com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.831.211

- Investigar a associação entre o perfil de MVs com a resposta terapêutica e resistência ao tratamento nos pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A avaliação dos riscos e benefícios atende a legislação vigente, conforme descrito a seguir:

3.5 Riscos e benefícios: Os riscos que podem ocorrer são: desconforto com o exame invasivo, divulgação de dados confidenciais, risco a segurança dos prontuários, uso da amostra para novas pesquisas sem a autorização do participante. Para minimizar os riscos, é garantido ao participante da pesquisa que todo e qualquer exame a ser realizado será feito com o seu consentimento, por profissionais qualificados assegurando o melhor atendimento. O acesso aos prontuários será limitado ao máximo de 02 pesquisadores da equipe da pesquisa e apenas pelo tempo, quantidade e qualidade das informações específicas para a pesquisa. Nesta pesquisa não haverá benefícios diretos ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas contribuirá com a sociedade científica para uma melhor compreensão das características das microvesículas e seu potencial uso como biomarcador, visando ajudar no prognóstico da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresenta relevância científica e exequível dentro do cronograma proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória para avaliação ética foram apresentados e atendem a legislação vigente.

Recomendações:

Vide conclusões e/ou pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências éticas, sendo assim, não há impedimento para o início da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto é executável e importante para caracterizar o perfil de MVs em pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico. O projeto é viável do ponto de vista ético e está de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Diante do exposto, esse CEP julga o projeto APROVADO. Salvo melhor juízo é o parecer.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.631.211

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1733339.pdf	23/06/2021 23:11:43		Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	23/06/2021 23:08:19	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	23/06/2021 23:06:39	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	23/06/2021 23:01:27	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Garantia.pdf	23/06/2021 23:00:46	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Lattes_landara.pdf	23/06/2021 22:58:16	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Ressarcimento.pdf	23/06/2021 22:55:40	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Declaração de concordância	Responsabilidade.pdf	23/06/2021 22:54:39	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	23/06/2021 22:53:34	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	TCUD.pdf	23/06/2021 22:48:24	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Setores.pdf	23/06/2021 22:46:41	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Pesquisadores.pdf	23/06/2021 22:43:40	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado.doc	23/06/2021 22:34:10	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.docx	23/06/2021 22:30:10	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	23/06/2021 22:20:14	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



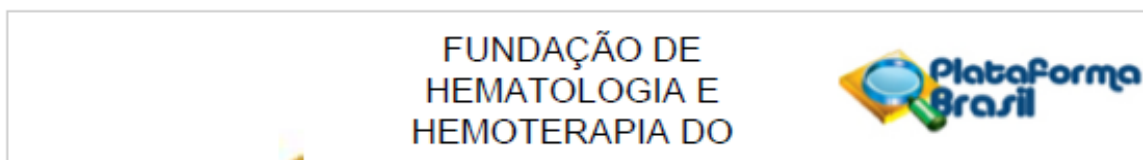
Continuação do Parecer: 4.831.211

MANAUS, 06 de Julho de 2021

Assinado por:
SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

8.1.2 Parecer da segunda submissão: Emenda



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Pesquisador: IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48463121.3.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.520.298

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda do estudo analítico, do tipo longitudinal prospectivo para caracterização das populações de microvesículas derivadas de células leucêmicas e leucócitos inflamatórios em pacientes diagnosticados com Leucemia Mieloide Crônica, tratadas na Fundação HEMOAM, localizada na cidade de Manaus-Amazonas. Para realização do estudo, serão utilizadas amostras sangue periférico de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica. Os dados clínico laboratoriais serão coletados a partir de registros do laboratório de marcadores celulares e de prontuários da Fundação HEMOAM.

Objetivo da Pesquisa:

- Caracterizar o perfil de MVs em pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico. Objetivos Específicos
- Descrever as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico no período de 1 ano;
- Investigar a associação entre o perfil de MVs com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico.
- Investigar a associação entre o perfil de MVs com a resposta terapêutica e resistência ao tratamento nos pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.520.298

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A avaliação dos riscos e benefícios atende a legislação vigente, conforme descrito a seguir:

Riscos e benefícios: Os riscos que podem ocorrer são: desconforto com o exame invasivo, divulgação de dados confidenciais, risco a segurança dos prontuários, uso da amostra para novas pesquisas sem a autorização do participante. Para minimizar os riscos, é garantido ao participante da pesquisa que todo e qualquer exame a ser realizado será feito com o seu consentimento, por profissionais qualificados assegurando o melhor atendimento. O acesso aos prontuários será limitado ao máximo de 02 pesquisadores da equipe da pesquisa e apenas pelo tempo, quantidade e qualidade das informações específicas para a pesquisa. Nesta pesquisa não haverá benefícios diretos ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas contribuirá com a sociedade científica para uma melhor compreensão das características das microvesículas e seu potencial uso como biomarcador, visando ajudar no prognóstico da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores solicitaram a emenda de projeto para este comitê solicitando a inclusão de um grupo controle para comparar as possíveis diferenças e semelhanças entre esses grupos. O Recrutamento do grupo controle será através da aplicação do TCLE aos doadores de sangue da Fundação HEMOAM. Estima-se convidar 60 doadores de sangue para fazer parte desse grupo. Na plataforma foram anexados o TCLE que será aplicado ao grupo controle e também o projeto com as alterações em amarelo referente a esta emenda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória para avaliação ética foram apresentados e atendem a legislação vigente.

Recomendações:

Não existem pendências éticas, sendo assim, não há impedimento para o início da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é executável e importante para caracterizar o perfil de MVs em pacientes com LMC ao diagnóstico e nas avaliações clínicas durante o tratamento terapêutico. O projeto é viável do ponto de vista ético e está de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.520.298

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1954304_E1.pdf	15/06/2022 20:04:25		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	15/06/2022 20:02:18	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Anuencia_ciclodossangue.pdf	15/06/2022 19:55:19	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGrupocontrole.doc	15/06/2022 19:54:48	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEmenda.docx	15/06/2022 19:54:03	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	CartaJustificativaCEP.pdf	24/05/2022 15:26:09	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	23/06/2021 23:08:19	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	23/06/2021 23:06:39	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	23/06/2021 23:01:27	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Garantia.pdf	23/06/2021 23:00:46	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Lattes_landara.pdf	23/06/2021 22:58:16	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Ressarcimento.pdf	23/06/2021 22:55:40	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Declaração de concordância	Responsabilidade.pdf	23/06/2021 22:54:39	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Declaração de	Infraestrutura.pdf	23/06/2021	IANDARA MAIRA	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 5.520.298

Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	22:53:34	LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	TCUD.pdf	23/06/2021 22:48:24	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Setores.pdf	23/06/2021 22:46:41	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Outros	Pesquisadores.pdf	23/06/2021 22:43:40	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado.doc	23/06/2021 22:34:10	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.docx	23/06/2021 22:30:10	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	23/06/2021 22:20:14	IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 11 de Julho de 2022

Assinado por:

SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)

Bairro: Chapada

CEP: 69.050-002

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3655-0114

Fax: (92)3655-0112

E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

8.2 Termo de Consentimento livre e esclarecido - TCLE

8.2.1 TCLE: Paciente

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Centro de Pesquisa: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Projeto: Caracterização de microvesículas circulantes e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Pesquisador Responsável: Iandara Maíra Lopes de Souza

Pesquisadores colaboradores: Andréa Monteiro Tarragô (coordenadora da pesquisa); Allyson Guimarães da Costa; Adriana Malheiro Alle Marie; Fábio Magalhães da Gama; Luciana Cassa Araujo Barbosa; Nadja Pinto Garcia; e Rechfy Kasen Abou Ali

Você está sendo convidado para participar da Pesquisa sobre a Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

A sua participação é voluntária e se não concordar em participar do estudo ou se em alguma etapa não quiser mais fazer parte da pesquisa, tudo bem, o seu acompanhamento, como paciente, não será prejudicado. Você tem todo o tempo que quiser para decidir e discutir a situação com pessoas de sua confiança. Você pode fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Estamos aqui para esclarecer o projeto.

OBJETIVOS DO ESTUDO

É investigar as características das microvesículas, que são pequenas estruturas liberadas pelas células do sangue na corrente sanguínea, nos pacientes diagnosticados com Leucemia mieloide Crônica, durante as avaliações clínicas ao diagnóstico e durante o tratamento terapêutico.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar do estudo, será coletada amostras de seu sangue (2 tubos de 4ml contendo citrato de sódio) para a caracterização das Microvesículas ao diagnóstico, depois mais três coletas conforme indicação médica de acordo com seu tratamento.

Os registros médicos referentes a você poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do HEMOAM e pela nossa equipe de pesquisadores envolvidos.

Coletaremos apenas informações específicas para o desenvolvimento da pesquisa em seu prontuário, tais como os dados dos exames de hemograma, mielograma e idade. Seu nome não será revelado em nenhum momento ainda que

as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que poderão ocorrer.

RISCOS

Os riscos de participação neste projeto estão relacionados ao desconforto da punção da veia para a coleta das amostras. Durante a coleta, o senhor, poderá sentir nervosismo, tremores, dormência nos lábios, e desconforto no local da coleta. Uma mancha vermelha poderá aparecer no local, mas é uma reação normal a coleta de amostras de sangue.

BENEFÍCIOS

Nesta pesquisa não haverá benefícios diretos ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos das microvesículas e seu potencial uso como biomarcador, visando ajudar no prognóstico da doença.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Pedimos sua autorização para armazenamos uma amostra de seu sangue e plasma para uma nova avaliação, se precisar, ou para outros exames que porventura sejam necessários para o estudo, e que não estejam aqui previstos. O sangue e plasma coletado ficarão armazenados no biorrepositório da Fundação HEMOAM para futuras análises ligadas ao projeto.

ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Se houver alguma intercorrência, você deverá falar imediatamente com alguém da equipe, ou, em caso de emergência, poderá contatar diretamente as pesquisadoras do estudo, landara Maira Lopes de Souza, através do telefone (92)99240-3546/ e Dra. Andréa Tarragô (92)99136-0001. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita que seja necessária para garantir seu bem-estar, caso venha a sofrer quaisquer danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, no decorrer de sua participação na pesquisa, previstos ou não neste Termo de consentimento.

Você tem total liberdade para recusar a participação ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Seu tratamento e acompanhamento médico acontecerão independentemente de sua participação neste estudo. Diante disso, se você decidir que quer interromper a participação no estudo, você deverá informar a equipe e as coletas de material referentes à pesquisa serão interrompidas imediatamente.

CUSTOS E INDENIZAÇÃO

Você não terá qualquer custo ou qualquer forma de pagamento/remuneração por sua participação neste estudo. Todos os procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer gasto para você. O seu acompanhamento após a primeira coleta continuará sendo realizado na Fundação HEMOAM. Se necessário, você receberá um ressarcimento pelos custos relacionados à sua participação no estudo. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não estará renunciando a nenhum de seus direitos legais, garantidos na regulação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

ESCLARECIMENTOS

Para obter mais informações sobre esta pesquisa, reclamações ou saber sobre seus direitos como participante, por favor, entre em contato com as pesquisadoras do estudo, através do telefone (92)99240-3546 (landara), (92)991360001 (Andréa) , e-mail: [mairaiandara@gmail.com/](mailto:mairaiandara@gmail.com) andrea_s-monteiro@hotmail.com Endereço: Av. Constantino Nery, 4397 - Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13, Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus-AM. Se você ainda tiver perguntas com relação a seus direitos como participante deste estudo, também pode contar com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), pelo telefone (92) 3655-0114 ou e-mail: cep@hemoam.am.gov.br, endereço na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13, CEP-HEMOAM, Manaus-AM. O horário de funcionamento do CEP é de 9 às 13 horas, de segunda à sexta.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Eu, _____
 informo que li este documento ou que o mesmo foi lido para mim, fico ciente e concordo em ser Participante da Pesquisa e fazer a doação. Além disso, eu:

- Tive oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo e recebi informações suficientes sobre ele;
- Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais;
- Autorizo o processamento de minhas amostras de sangue e informações;
- Entendo que receberei uma via deste Termo;
- Entendo que não receberei de forma alguma qualquer compensação monetária por minha participação neste estudo; e
- Entendo que minha participação é voluntária e que tenho a liberdade de retirar meu consentimento e concluir minha participação:
 1. Em qualquer momento.
 2. Sem dar explicação.
 3. Sem que prejudique meu tratamento posterior.

Por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Manaus, ____ / ____ / ____

 Assinatura do Doador/Participante da Pesquisa

 Assinatura da Testemunha

 Assinatura do Pesquisador/ Equipe da Pesquisa



Impressão do dedo polegar
 Caso não saiba assinar

8.2.2 TCLE: Doador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Centro de Pesquisa: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

Projeto: Caracterização de microvesículas circulantes e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Pesquisador Responsável: Iandara Maíra Lopes de Souza

Pesquisadores colaboradores: Andréa Monteiro Tarragô (coordenadora da pesquisa); Allyson Guimarães da Costa; Adriana Malheiro Alle Marie; Fábio Magalhães da Gama; Luciana Cassa Araujo Barbosa; Nadja Pinto Garcia; e Rechfy Kasen Abou Ali

Doador, você está sendo convidado para participar da Pesquisa como parte do grupo controle para ajudar o desenvolvimento do estudo sobre a Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

A sua participação é voluntária e se não concordar em participar do estudo ou se em alguma etapa não quiser mais fazer parte da pesquisa, tudo bem. Você pode fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Estamos aqui para esclarecer o projeto.

OBJETIVOS DO ESTUDO

É investigar as características das microvesículas, que são pequenas estruturas produzidas e liberadas por vários tipos células. Todas as pessoas liberam microvesículas de suas células, porém queremos estudar e entender como elas se comportam em pacientes diagnosticados com Leucemia mieloide Crônica, e por isso precisamos de um grupo controle de pessoas saudáveis para compararmos essas possíveis diferenças e semelhanças.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar do estudo, será coletada 01 única vez amostras de seu sangue (4 tubos de 4ml contendo citrato de sódio, 2 tubo de 4ml contendo EDTA e 1 tubo com gel separador) para a caracterização das Microvesículas. Os registros de doação referentes a você poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do HEMOAM e pela nossa equipe de pesquisadores envolvidos. Coletaremos apenas informações específicas para o desenvolvimento da pesquisa em seu prontuário, tais como os dados dos exames de hemograma, idade e sexo. Seu nome não será revelado em nenhum momento ainda que as informações de seu registro de doador sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que poderão ocorrer.

RISCOS

Os riscos de participação neste projeto estão relacionados ao desconforto da punção da veia para a coleta das amostras. Durante a coleta, o (a) senhor(a), poderá sentir nervosismo, e desconforto no local da coleta, é possível que apareça uma mancha vermelha no local, mas é uma reação normal a coleta de amostras de sangue.

BENEFÍCIOS

Nesta pesquisa não haverá benefícios diretos ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos das microvesículas e seu potencial uso como biomarcador, visando ajudar no prognóstico de pacientes diagnosticados com LMC.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Pedimos sua autorização para armazenarmos uma amostra de seu sangue e plasma para uma nova avaliação, se precisar, ou para outros exames que porventura sejam necessários para o estudo, e que não estejam aqui previstos. O sangue e plasma coletado ficarão armazenados no biorrepositório da Fundação HEMOAM para futuras análises ligadas ao projeto.

ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Se houver alguma intercorrência em relação ao projeto de pesquisa, você deverá falar imediatamente com alguém da equipe, ou, em caso de emergência, poderá contatar diretamente as pesquisadoras do estudo, Iandara Maíra Lopes de Souza, através do telefone (92)99240-3546/ e Dra. Andréa Monteiro Tarragô (92)99136-0001. Você tem total liberdade para recusar a participação ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa. Se você decidir que quer interromper a participação no estudo, você deverá informar a equipe e as coletas de material referentes à pesquisa serão interrompidas imediatamente.

CUSTOS E INDENIZAÇÃO

Você não terá qualquer custo ou qualquer forma de pagamento/remuneração por sua participação neste estudo. Todos os procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer gasto para você. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não estará renunciando a nenhum de seus direitos legais, garantidos na regulação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

ESCLARECIMENTOS

Para obter mais informações sobre esta pesquisa, entre em contato com as pesquisadoras do estudo, através do telefone (92)99240-3546 (Iandara), (92)991360001 (Andréa), e-mail: mairaiandara@gmail.com/ andrea_smonteiro@hotmail.com . Caso tenha perguntas sobre seus direitos como participante deste estudo, também pode contar com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), pelo telefone (92) 3655-0114 ou e-mail: cep@hemoam.am.gov.br, endereço na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13, CEP-HEMOAM, Manaus-AM. O horário de funcionamento do CEP é de 9 às 13 horas, de segunda à sexta.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Eu, _____ concordo em ser Participante da Pesquisa e fazer a doação. Além disso, eu tive oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo e recebi informações suficientes sobre ele; Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais; Autorizo o processamento de minhas amostras de sangue e informações; Entendo que receberei uma via deste Termo; Entendo que não receberei de forma alguma qualquer compensação monetária por minha participação neste estudo; E entendo que minha participação é voluntária e que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento.

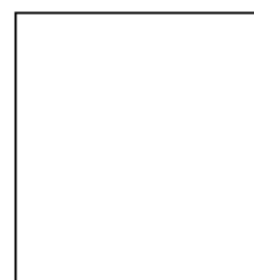
Por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Manaus, ____/____/____

Assinatura do Doador/Participante da Pesquisa

Assinatura da Testemunha

Assinatura do Pesquisador/ Equipe da Pesquisa



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar