



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Thiago Henrique Meinicke Vieira

**Estudo da matriz na Leucemia Mieloide Crônica:
Análise da expressão do Hialuronano (HA),
das enzimas hialuronano sintases e do CD44
para predição de casos resistentes ao Imatinibe (IMB)**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Ciências –
Área de Patologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

Botucatu

2025

Thiago Henrique Meinicke Vieira

Estudo da matriz na Leucemia Mieloide Crônica:
Análise da expressão do Hialuronano (HA), das enzimas
hialuronano sintases e do CD44 para predição de casos
resistentes ao Imatinibe (IMB)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Ciências - Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

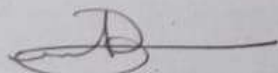
Botucatu

2025

V658e	<p>Vieira, Thiago Henrique Meinicke</p> <p>Estudo da matriz na leucemia mieloide crônica: análise da expressão do hialuronano (HA), das enzimas hialuronano sintases e do CD44 para predição de casos resistentes ao Imatinibe (IMB) / Thiago Henrique Meinicke Vieira. -- Botucatu, 2025</p> <p>111 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu</p> <p>Orientadora: Maria Aparecida Custódio Domingues</p> <p>Coorientador: Lucas Tadeu Bidinotto</p> <p>1. Leucemia mieloide de fase crônica. 2. Medula óssea. 3. Imuno-histoquímica. 4. Ácido hialurônico. 5. Antígenos CD44. I. Título.</p>
-------	--

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE THIAGO HENRIQUE MEINICKE VIEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 9h, no(a) Depto. de Patologia - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de THIAGO HENRIQUE MEINICKE VIEIRA, intitulada **Estudo da matriz na Leucemia Mieloide Crônica: Análise da expressão do Hialuronano (HA), das enzimas hialuronano sintases e do CD44 para predição de casos resistentes ao Imatinibe (IMB)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARIA APARECIDA CUSTODIO DOMINGUES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Patologia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. MARCELO PADOVANI DE TOLEDO MORAES (Participação Presencial) do(a) Depto. de Patologia / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. POLLYANNA DOMENY DUARTE (Participação Virtual) do(a) Universidade Tiradentes (Unit) / Aracaju, Profa. Dra. KARINA MUNHOZ DE PAULA ALVES COELHO (Participação Virtual) do(a) Centro de Diagnósticos Anátomo Patológicos (CEDAP) / Joinville, Profa. Dra. CAROLINA BONET BUB (Participação Virtual) do(a) Setor de Imuno-Hematologia do Banco de Sangue / Hospital Israelita Albert Einstein. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. MARIA APARECIDA CUSTODIO DOMINGUES

Título da tese: Estudo da matriz na Leucemia Mieloide Crônica: Análise da expressão do Hialuronano (HA), das hialuronano sintases e do CD44 para predição de casos resistentes ao Imatinibe (IMB)

Impacto científico esperado: Identificação de parâmetros morfológicos e/ ou imuno-histoquímicos a partir da análise de biópsias de medula óssea no momento do diagnóstico de LMC que sejam capazes de predizer o risco de desenvolvimento de quimiorresistência à terapia com inibidores de tirosina quinase.

Impacto social: Redução da refratariedade à terapia com os inibidores de tirosina quinase e consequente prevenção do impacto negativo na qualidade de vida, sofrimento dos pacientes e desfecho desfavorável que a resistência ocasiona. Dessa forma, há manutenção da boa evolução clínica e sobrevida prolongada.

Impacto econômico: A prevenção da deficiência de abastecimento e a redução do impacto financeiro no Sistema Único de Saúde são benefícios diretos da adoção de estratégias que otimizam o uso de inibidores de tirosina quinase, cuja disponibilidade é limitada. A identificação precoce de casos com potencial resistência permite uma mudança na conduta terapêutica, direcionando o tratamento para um inibidor mais potente e específico. Dessa forma, evita-se o uso sucessivo de múltiplos inibidores até a obtenção da resposta clínica adequada, garantindo a continuidade do fornecimento e minimizando prejuízos financeiros ao sistema público de saúde.

Dedicatória

Dedico esta tese a:

A meus pais Tania e Carlos, que sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos durante toda a minha trajetória acadêmica. Continuo me inspirando em vocês e seguindo seus ensinamentos para ter sucesso e alcançar os meus objetivos.

A minha irmã Vivian, minha grande amiga e companheira, que está sempre ao meu lado e me guia e fortalece nos momentos de que necessito.

Aos meus amados avós Milda (*in memorian*), Cerly e João (*in memorian*) pelos quais sempre tive muito carinho, respeito e consideração.

À Dra. Maria, minha orientadora, por todo o auxílio na elaboração e execução desse trabalho. Agradeço por estar sempre disponível para me atender seja durante o dia ou a noite. Seus conselhos, orientações e ensinamentos com certeza contribuíram para o meu amadurecimento como pesquisador.

À Direção do Hospital de Amor Amazônia, por conceder em diversas ocasiões períodos de licença para que eu pudesse desenvolver esse trabalho com a dedicação e atenção necessárias.

Às minhas amigas e colegas patologistas Flávia, Flora e Walquíria, que me ajudaram na coleta de dados, etapa fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Às minhas amigas e biomédicas Anayane, Letícia e Carla, que se empenharam para realizar as reações de imuno-histoquímica mesmo desconhecendo os protocolos dos anticorpos de pesquisa utilizados, e cortar os diversos blocos de parafina.

Às minhas amigas Patrícia e Alenira, por realizarem as colorações de impregnação argêntica.

Ao meu colega patologista Jefferson, por tornar possível realizar parte das reações de imuno-histoquímica em seu laboratório e por conceder permissão para fotografar as lâminas em seu microscópio.

À minha amiga Cícera, pela ajuda na coleta dos dados iniciais.

Aos colegas Eduardo e Fernando, pelos cortes dos diversos blocos de parafina.

“A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros; só é preciso se lembrar de acender a luz.”

(J. K. Rowling, 2000)

Resumo

Introdução: A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada pela expansão do setor mieloide a partir da célula-tronco pluripotente. Foi a primeira doença definida por metodologia citogenética através da identificação do cromossomo Philadelphia, originado a partir da t(9;22)(q34;q11.2). O desenvolvimento dos inibidores de tirosina quinase (ITQ) como Imatinibe (IMB) revolucionou a história natural da LMC, contudo uma porção dos pacientes apresenta resistência à terapia, sendo necessário o uso de ITQ mais potentes. A elucidação da patogênese da LMC a partir da compreensão do papel do remodelamento dos nichos da medula óssea pode contribuir para a identificação de preditores de risco aumentado de evolução para resistência.

Objetivos: Analisar a expressão do hialuronano, das enzimas hialuronano sintases e do CD44 nos casos de LMC resistentes ao IMB juntamente com as características morfológicas da medula óssea; entender o papel desses marcadores no mecanismo de quimioressistência; identificar possíveis fatores preditores do risco de evolução para resistência.

Materiais e métodos: Seleção de 161 pacientes com diagnóstico de LMC provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Hospital de Amor de Barretos e Hospital de Amor Amazônia. Realizada divisão em 3 grupos: LMC resistente (116 casos), LMC não resistente (25 casos) e LMC intolerante (20 casos). Foram resgatadas as biópsias de medula óssea de cada grupo para análise morfológica e imuno-histoquímica com os marcadores CD44, hialuronano e hialuronano sintases (HAS1, HAS2 e HAS3).

Resultados: A análise morfológica identificou que a presença de quantidade moderada de micromegacariócitos pode corresponder a um fator protetor contra a resistência. Na análise imuno-histoquímica, houve intensa expressão de CD44 no grupo resistente em fase crônica quando comparado com o grupo não resistente, no qual a intensidade de expressão foi baixa. Foi identificada perda de expressão de HAS2 celular nos nichos perivascular e peritrabecular na LMC resistente juntamente com ausência de expressão estromal como consequência da intensificação do remodelamento dos nichos na quimiorresistência.

Conclusão: A resistência na LMC permanece um desafio terapêutico, apesar dos contínuos avanços no aprimoramento dos ITQ. O remodelamento dos nichos proporciona a manutenção da leucemogênese com desenvolvimento de resistência. A análise de CD44 e HAS2 em biópsias de medula óssea por exame imuno-histoquímico no momento do diagnóstico de LMC pode constituir uma abordagem eficaz na identificação de casos que evoluirão com resistência, evitando o impacto socioeconômico negativo que a quimiorresistência acarreta.

Palavras chave: LMC, resistência, medula óssea, nicho, CD44, hialuronano, hialuronano sintases, remodelamento.

Abstract

Introduction: Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative neoplasm characterized by the expansion of the myeloid sector from the pluripotent stem cell. It was the first defined disease by cytogenetic methodology through the identification of the Philadelphia chromosome, originating from t(9;22)(q34;q11.2). The development of tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as Imatinib (IMB) revolutionized the natural history of CML, however, a portion of patients are resistant to therapy, which requires the use of more potent TKI. Elucidating the pathogenesis of CML by understanding the role of remodeling of bone marrow niches may contribute to the identification of predictors of increased risk of progression to resistance

Objectives: Analyze the expression of hyaluronan, hyaluronan synthase enzymes and CD44 in cases of CML resistant to IMB together with the morphological characteristics of the bone marrow; understand the role of these markers in the chemoresistance mechanism; identify possible factors that predict the risk of progression to resistance.

Materials and methods: Selection of 161 patients diagnosed with CML from the Hospital das Clínicas of Botucatu Medical School, Hospital de Amor de Barretos and Hospital de Amor Amazônia. Division into 3 groups: resistant CML (116 cases), non-resistant CML (25 cases) and intolerant CML (20 cases). Bone marrow biopsies from each group were retrieved for morphological and immunohistochemical analysis with the markers CD44, hyaluronan and hyaluronan synthases (HAS1, HAS2 and HAS3).

Results: Morphological analysis identified that the presence of a moderate amount of micromegakaryocytes may correspond to a protective factor against resistance. In the immunohistochemical analysis there was intense expression of CD44 in the resistant group in the chronic phase compared to the non-resistant group in which the expression intensity was low. Loss of cellular HAS2 expression was identified in the perivascular and peritrabecular niches in resistant CML along with the absence of stromal expression as a consequence of the intensification of niche remodeling in chemoresistance.

Conclusion: Resistance in CML remains a therapeutic challenge despite continuous advances in improving TKI. Niche remodeling provides maintenance of leukemogenesis with the development of resistance. The analysis of CD44 and HAS2 in bone marrow biopsies by immunohistochemical examination at the time of CML diagnosis may

constitute an effective approach in identifying cases that will develop resistance, avoiding the negative socioeconomic impact that chemoresistance entails.

Keywords: CML, resistance, bone marrow, niche, CD44, hyaluronan, hyaluronan synthases, remodeling.

Lista de siglas e abreviaturas

4-UM: 4-methylumbelliferone

AB: Domínio de ligação à actina

ABL1: Abelson murine leukemia 1

ACA: Alterações citogenéticas adicionais

AKT: Protein kinase B

ATP: Adenosine triphosphate

BAP1: BRCA1-associated protein 1

BAD: Bcl-2-associated death promoter

BCL2: B-cell lymphoma 2

BCL_{XL}: B-cell lymphoma-extra large

BCR: Breakpoint cluster region

CAR: CXCL12-abundant reticular

CC: Domínio de oligomerização coil-coiled

CDK6: Cyclin-dependent kinase 6

CDKN1A/B: Cyclin-dependent kinase 1A/B

C/EBP α : CAAT enhancer binding protein α

CSF3: Colony-stimulating factor 3

CTH: Células-tronco hematopoiéticas

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4

CXCL4: Platelet factor 4

CXCL12: C-X-C motif chemokine ligand 12

CXCL14: C-X-C motif chemokine ligand 14

DB: Domínio de ligação

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGFR: Epidermal growth factor receptor

EUTOS: European treatment and outcome study

ELTS: EUTOS Long-term survival

EZH2: Enhancer of zeste 2

FC: Fase crônica

FCA: Fase crônica de alto risco

FDA: Food and drug administration

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente

GAP: GTPase-activating protein

G-CSF: Granulocyte colony stimulating factor

GDP: Guanosine diphosphate

G:E: Relação das séries granulocítica e eritroide

GEF: Guanine nucleotide exchange factors

GLUT1: Glucose transporter type 1

GMI-1271: E-selectin inhibitor

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GTP: Guanosine triphosphate

HA: Hialuronano

HAS: Hialuronano sintase 1

HAS2: Hialuronano sintase 2

HAS3: Hialunorano sintase 3

HE: Hematoxilina-eosina

HIF: Hypoxia-inducible factor

HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

IA: Impregnação argêntica

ICAM-1: Inter cellular adhesion molecule 1

IGH: Immunoglobulin heavy locus

IL-1 β : Interleukin-1 β

IL-6: Interleukin-6

IL-8: Interleukin-8

IMB: Imatinibe

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IRIS: International randomized study of interferon

ITQ: Inibidores de tirosina quinase

IKZF1: IKAROS family zinc finger 1

JAK: Janus kinase

Kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

KIT: KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

LepR+: Leptin Receptor-expressing

LLA: Leucemia linfoblástica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MDR1: Multidrug resistance protein 1

MF: Fibrose reticulínica

miR-92a: microRNA 92a

MO: Medula óssea

Myc: MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor

NF-Kb: Nuclear Factor Kappa B

NGS: Next-generation sequencing

NK: Natural killer

NTS: Nuclear translocation signal

OB: Osteoblástico

OCT1: Organic cation transporter-1

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPN: Osteopontina

PAX5: Paired box 5

PKM2: Pyruvate kinase isoform M2

PDGFR: Platelet-derived growth factor

PDGF: Platelet-derived growth factor

PI-3kinase: Phosphatidylinositol 3-kinase

Ph: Cromossomo Philadelphia

PT: Peritrabecular

PV: Perivascular

RHAMM: hyaluronic acid-mediated motility:

Rho: Ras homology

RMM: Resposta molecular maior

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

SCL/TAL1: Stem cell leukemia T-cell acute lymphoblastic leukemia-1 protein

SCF: Stem cell factor

SFRP 1/2: Secreted frizzled-related protein 1/2

SH1: Src homology 1 domain

SH2: Src homology 2 domain

SH3: Src homology 3 domain

SIT1: Signaling threshold-regulating transmembrane adapter 1

STAT: Signal transducer and activator of transcription

STK: Serine/threonine protein kinase

TCR: T-cell receptor

TGF- β : Transforming growth factor- β

TNF: Tumor necrosis factor

Tyr: Tyrosine

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VLA-4: Very late antigen-4

VLA-5: Very late antigen-5

Wnt5A: Wnt family member 5A

Sumário

Capítulo I.....	24
Revisão da Literatura.....	25
1. Introdução.....	26
2. Perspectiva histórica.....	26
3. Epidemiologia.....	27
4. Etiologia.....	28
5. História natural e manifestações clínicas.....	28
6. Estrutura molecular do gene <i>BRC::ABL1</i>	30
7. Patogênese da LMC.....	33
8. Anormalidades citogenéticas adicionais (ACAs).....	35
9. Diagnóstico.....	35
9.1 Considerações gerais.....	35
9.2 Citogenética clássica (cariótipo).....	36
9.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	37
9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	38
9.5 Biópsia de medula óssea (histopatologia da LMC).....	38
10. Tratamento.....	40
10.1 Estratificação de risco.....	40
10.2 Inibidores de tirosina quinase (ITQ).....	41
10.3 Orientações para tratamento.....	42
10.4 Intolerância/ Toxicidade.....	43
10.5 Alvos de tratamento.....	43
10.6 Transplante de medula óssea.....	44
11. LMC resistente.....	45
12. Nichos da medula óssea.....	45
12.1 Introdução.....	45
12.2 Remodelamento dos nichos da medula óssea.....	50
12.3 Remodelamento maligno dos nichos da medula óssea nas neoplasias....	52
12.4 Remodelamento maligno dos nichos da medula óssea na LMC.....	53
13. CD44.....	55
13.1 Estrutura molecular.....	55
13.2 Funções biológicas.....	56
13.3 CD44 nas neoplasias e na LMC.....	57
14. Hialuronano.....	59
14.1 Estrutura molecular.....	59
14.2 Funções biológicas.....	60
14.3 Hialuronano nas neoplasias e na LMC.....	60
15. Conclusão.....	62
Referências.....	63
Capítulo II.....	74
Artigo Científico.....	75
Resumo.....	76

1. Introdução	77
2. Materiais e Métodos	79
3. Resultados.....	81
4. Discussão	91
Referências	96
Anexos.....	99
Conclusão final	110

1. Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) corresponde a uma neoplasia mieloproliferativa crônica maligna em que há a expansão clonal da célula-tronco hematopoiética pluripotente. Foi a primeira doença relacionada a uma anormalidade citogenética, caracterizada pela translocação $t(9;22)(q34;q11.2)$, que origina o gene de fusão *BCR::ABL1* com atividade constitutiva de tirosina quinase. A leucemogênese é desencadeada pela ativação anômala e contínua do ciclo celular independente da ação de citocinas aliada à geração de sinais apoptóticos aberrantes ^(1,2).

2. Perspectiva histórica

Os primeiros registros de leucemia ocorreram no século XIX por volta de 1840 por David Craigie, John Hughes Bennet e Rudolph Virchow através de autópsias de pacientes com hepatoesplenomegalia, febre e leucocitose. Todos os casos apresentavam um aspecto incomum no sangue, que foi designado inicialmente como sangue espesso por Alfred Velpeau. Acreditava-se que essa característica era decorrente de etiologia infecciosa sendo atribuída posteriormente a descrição de purulento ao aspecto do sangue identificado nesses pacientes ^(3,4). Entretanto, somente em 1845 Virchow estabeleceu que a característica era decorrente de alterações hematopoiéticas que promoviam aumento na quantidade de células brancas no sangue, descrito assim como sangue branco e consagrando o termo leucemia em 1847, que foi reconhecida posteriormente como entidade distinta de natureza neoplásica. Em 1872, Ernst Neumann reconheceu que a origem da leucemia estava centrada na medula óssea ^(3,5,6).

Com o desenvolvimento da coloração de panótico em 1891 por Paul Ehrlich, foi elaborada a classificação dos principais tipos de leucemia em virtude da caracterização detalhada das diferenças morfológicas entre as células mieloides e linfoides, sendo que até o momento a distinção era feita somente com base em células não coradas com formatos nucleares diferentes. Em decorrência do advento das colorações citológicas, foi possível a identificação da LMC como entidade nosológica distinta, denominada de leucemia granulocítica crônica nesse momento ⁽⁵⁾.

Aproximadamente meio século depois, a LMC foi associada à anormalidade cromossômica pelos citogeneticistas David Hungerford e Peter Nowell em 1960, por identificarem um pequeno cromossomo acrocêntrico alterado em dois casos de LMC, que

foi então chamado de cromossomo Philadelphia. Foi a primeira vez na história em que se estabeleceu associação entre uma doença oncológica e alteração cromossômica ⁽³⁾. Em 1973, com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, Janet Rowley concluiu que esse cromossomo era decorrente de uma translocação cromossômica equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, configurando a t(9;22)(q34;q11.2), o grande marco citogenético da LMC ^(3,7). Posteriormente, alterações citogenéticas foram identificadas na leucemia mieloide aguda. Os estudos citogenéticos então começaram a fornecer evidências de que as malignidades estavam relacionadas a perturbações genéticas nas células ⁽⁵⁾.

O início da identificação do gene de fusão *BCR::ABL1* ocorreu com a descoberta do oncogene *v-Abl*, por Herbert Abelson e Louise Rabstein em 1970, em um vírus murino capaz de induzir leucemia em camundongos. Em 1982, foi evidenciado que a translocação que originava o cromossomo Philadelphia envolvia a vertente humana normal do protooncogene *c-Abl* do cromossomo 9 para o cromossomo 22. No ano seguinte foi então descoberto o ponto de quebra no cromossomo 9 no gene *ABL*, que envolvia uma região genômica grande, e, em 1984, o ponto de quebra no cromossomo 22, que correspondia a uma região genômica relativamente pequena com agrupamento de 5,8 kb. A região foi denominada de *breakpoint cluster region*. Posteriormente, descobriu-se que essa região na verdade correspondia a uma porção específica de um gene, que foi então denominado de *BCR* ^(4,5,7). A partir da identificação dos pontos de quebra em ambos os cromossomos, foi possível, em 1985, a descoberta do produto de fusão *BCR::ABL1* e constatação da atividade constitutiva de tirosina quinase ^(3,5).

3. Epidemiologia

A LMC apresenta uma incidência anual mundial em torno de 1-2 casos por 100.000 habitantes com discreto predomínio no sexo masculino e idade média de acometimento em torno da quinta e sexta décadas de vida, podendo ocorrer em qualquer faixa etária inclusive na infância, embora seja incomum ⁽⁸⁾.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o triênio 2023-2025 em 100.000 habitantes 11.540 casos novos de leucemia por ano, na região Sudeste 4.610 casos de leucemias e na região Norte 790 casos. No estado de São Paulo, a estimativa foi de 2.600 casos de leucemias e no estado de Rondônia 80 casos ⁽⁹⁾.

4. Etiologia

Os fatores etiológicos são desconhecidos, porém a exposição à radiação ionizante constitui fator de risco conforme observado nos sobreviventes das explosões de bombas atômicas no Japão em 1945. O pico de incidência ocorre cerca de 5 a 12 anos após a exposição e é dose-dependente ⁽⁸⁾.

5. História natural e manifestações clínicas

A LMC é habitualmente dividida em três fases (crônica, acelerada e crise blástica), que exibem diferentes apresentações clínicas e critérios diagnósticos ⁽¹⁰⁾.

A fase crônica é caracterizada por um início insidioso em que aproximadamente 90-95% dos pacientes são diagnosticados, sendo frequentemente assintomáticos até que a doença seja encontrada em exame físico de rotina ou através de hemograma evidenciando leucocitose. Os sinais e sintomas, quando presentes, são decorrentes de anemia e esplenomegalia e incluem principalmente fadiga, perda de peso, mal-estar, suores noturnos e dor no quadrante superior esquerdo. Manifestações raras incluem sangramentos, trombose, gota e priapismo. Esplenomegalia é o achado de exame físico mais encontrado enquanto que a hepatomegalia é menos frequente ^(3,10,11). Dependendo do volume da esplenomegalia, pode ocorrer compressão de vísceras ocas, resultando em distúrbios digestivos e saciedade precoce. É possível a ocorrência de infarto esplênico e, quando apresentar localização subcapsular, pode ocasionar dor devido à periesplenite ⁽¹²⁾. Linfadenopatia e infiltração da pele ou outros tecidos são raras e quando presentes sugerem fase acelerada ou crise blástica da LMC ⁽¹⁰⁾.

Na história natural da LMC sem tratamento, há evolução da fase crônica para fases avançadas em um período de cerca de 3 a 5 anos após o diagnóstico ⁽¹¹⁾. Na fase acelerada, a sintomatologia é mais severa e inclui dores ósseas, infiltração cutânea e agravamento da anemia e esplenomegalia. Febre, perda de peso, sudorese noturna, artralgia e dor abdominal também podem ocorrer ^(3,10,12).

Na quinta edição da Organização Mundial da Saúde (OMS) para classificação dos tumores hematolinfoides, houve a omissão da fase acelerada, consolidando a doença como portadora de um curso bifásico caracterizado apenas pela fase crônica e crise

blástica. A justificativa consiste no fato de que o conceito de fase acelerada foi estabelecido no período em que o alvo terapêutico era a resposta hematológica, entretanto com o advento da terapia com os inibidores de tirosina quinase (ITQ) houve mudança nesse paradigma e hoje é notório o curso bifásico da doença. Contudo, deve-se ressaltar a importância do conceito referente às características de alto risco como nomenclatura alternativa para a fase acelerada visto que nessa nova edição foi introduzida a denominação de fase crônica de alto risco em substituição à fase acelerada. As características de alto risco correspondem em geral às mesmas características utilizadas anteriormente para definição da fase acelerada, sendo que essas características devem ser diferenciadas em relação ao momento de sua detecção, ou seja, se no momento do diagnóstico ou no decorrer do tratamento ⁽¹¹⁾.

As características que indicam risco aumentado de progressão de doença na fase crônica estão dispostas no **Quadro 1** ⁽¹¹⁾:

Características da fase crônica de alto risco
<u>Ao diagnóstico ou durante o tratamento</u>
≥ 10% de blastos no sangue periférico e/ ou medula óssea
≥ 20% de basófilos no sangue periférico
Anormalidades citogenéticas adicionais em células Ph+*
<u>Durante o tratamento</u>
Resistência aos inibidores de tirosina quinase
Aparecimento de anormalidades citogenéticas adicionais**
Mutações no domínio quinase de <i>BCR::ABL1</i>

Ph*: Cromossomo Philadelphia; Anormalidades citogenéticas adicionais**: rearranjo 3q26.2; monossomia do cromossomo 7, trissomia do cromossomo 8, rearranjo 11q23; isocromossomo 17q; trissomia do cromossomo 19; trissomia do cromossomo 21; cromossomo Philadelphia adicional e/ou cariótipo complexo definido como duas ou mais anormalidades cromossômicas adicionais. Fonte: WHO Classification of Tumours Editorial Board (2024).

A crise blástica se manifesta como uma leucemia aguda e agravamento dos sintomas prévios. Pode ocorrer infiltração de qualquer sítio extramedular com predileção para baço, fígado, linfonodos, pele e partes moles ⁽³⁾. É incomum a manifestação primária da LMC em crise blástica, sendo necessário nessas situações o diagnóstico diferencial com a leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfoblástica aguda (LLA) visto que as estratégias terapêuticas são distintas. Alguns pacientes apresentam reversão para nova fase crônica após o tratamento (12). A crise blástica pode exibir fenótipos mieloide (70%),

pré-linfoide (25%) ou indeterminado (5%), sendo que o imunofenótipo B é mais comum que o T ^(13,14).

Os critérios diagnósticos para a crise blástica da LMC estão dispostos no **Quadro 2** ⁽¹¹⁾:

Critérios diagnósticos para a crise blástica da LMC
Detecção de $\geq 20\%$ de blastos mieloides no sangue periférico ou medula óssea, ou
Presença de proliferação blástica extramedular, ou
Detecção de linfoblastos no sangue periférico ou medula óssea (mesmo que $< 10\%$)

Fonte: WHO Classification of Tumours Editorial Board (2024).

Anteriormente ao advento da terapia alvo, a LMC apresentava um curso bifásico ou trifásico, que consistia em uma fase crônica indolente inicial seguida para progressão para fase acelerada e/ou crise blástica, contudo após a terapia alvo, houve decréscimo na incidência de progressão para fases avançadas de modo que a média de sobrevida em 10 anos é em torno de 80-90% ⁽¹¹⁾.

A progressão para crise blástica constitui um processo complexo que envolve mutações somáticas e desregulação epigenética. A justificativa para a crise blástica poder apresentar fenótipo mieloide ou linfoide é que o *BCR::ABL1* afeta a célula-tronco leucêmica. O aumento na expressão do oncogene está relacionado à parada da maturação, sendo que o aumento pode ser decorrente de uma segunda cópia do cromossomo Philadelphia ⁽¹³⁾.

6. Estrutura molecular do gene *BCR::ABL1*

O oncogene *BCR::ABL1* é proveniente da translocação t(9;22)(q34;q11.2), que origina o cromossomo Philadelphia ⁽¹⁵⁾. Os pontos de quebra para que ocorra a translocação ocorrem preferencialmente nas regiões intrônicas dos genes *ABL1* e *BCR*. No gene *ABL1*, as quebras ocorrem geralmente entre os éxons 1b e 1a, porém também podem ocorrer *upstream* do éxon 1b ou *downstream* do éxon 1a ⁽¹⁶⁾. A partir do ponto de quebra no gene *BCR* no cromossomo 22, podem ser originadas três isoformas de *BCR::ABL1*: 190 kDa, 210 kDa e 230 kDa ^(15,16). Os pontos de quebra ocorrem mais frequentemente na região M-bcr entre os éxons e13 e e14 ou entre e14 e e15. Também podem ocorrer quebras na região m-bcr entre os éxons e1 e e2, e na região μ -bcr entre os éxons e19 e e20. A ampla variedade de recombinações de *BCR* e *ABL1* resulta em uma variedade de híbridos de RNAm ⁽¹⁶⁾. Os transcritos alternativos e13a2/e14a2 (ou b2a2/b3a2) são provenientes da justaposição dos éxons 13 ou 14 de *BCR* (localizados na região M-bcr) com o éxon 2 de

ABL1, produzindo uma proteína de 210 kDa, identificada em mais de 90% dos casos de LMC, sendo portanto a isoforma característica da doença ^(16,17). A isoforma e14a2 possui 25 aminoácidos a mais do que a isoforma e13a2 devido aos aminoácidos adicionais que são codificados pelo éxon 14 de *BCR*, sendo que essa corresponde à isoforma predominante. Aproximadamente 10% dos casos expressam ambas isoformas ⁽¹⁸⁾. O transcrito e1a2, proveniente da justaposição do éxon e1 de *BCR* localizado na região m-bcr com o éxon a2 de *ABL1*, está relacionado à isoforma p190, que é infrequente na LMC, porém comum na LLA. A proteína p230, isoforma rara encontrada na LMC, é originária do transcrito e19a2, proveniente da justaposição do éxon e19 de *BCR* localizado na região μ -bcr com o éxon a2 de *ABL1*. Foi descrito inicialmente em associação com leucemia neutrofílica crônica e raramente está presente na LMC ^(16,17).

A **Figura 1** ilustra os diferentes transcritos encontrados nas leucemias Ph+ ⁽¹⁹⁾.

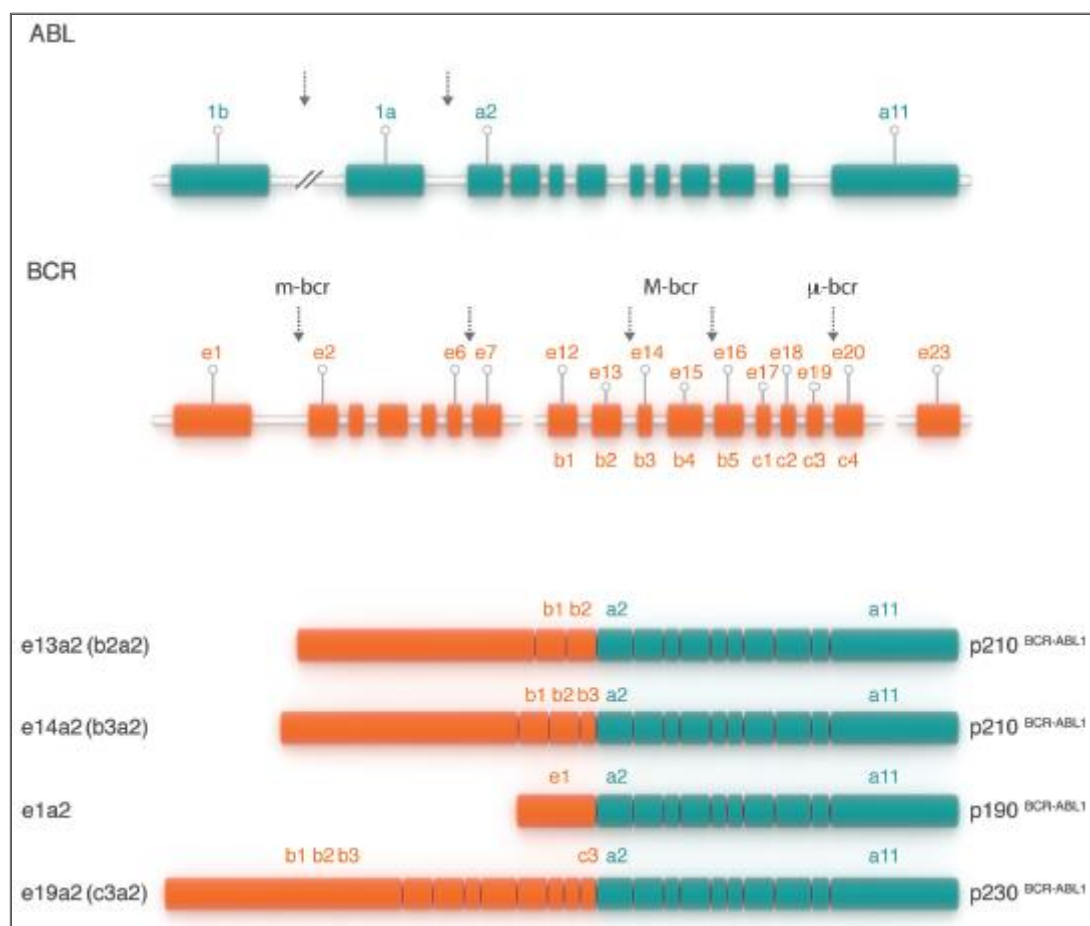


Figura 1 - A estrutura normal dos genes *BCR* e *ABL1* e os diferentes transcritos encontrados nas leucemias Ph+. Diferentes pontos de quebra resultam nas isoformas p190, p210 e p230. Os pontos de quebra no gene *ABL1* geralmente ocorrem nos íntrons entre os éxons 1b e 1a, evidenciados pelas setas verticais. Os pontos de quebra no gene *BCR* na LMC geralmente ocorrem entre os éxons e13 (b2) e e14 (b3) ou entre e14 (b3) e e15 (b4) na região M-bcr, conforme evidenciado

pelas setas verticais. Na maioria dos casos de LLA Ph⁺, o ponto de quebra ocorre entre os éxons e1 e e2 na região m-bcr, conforme evidenciado pela seta vertical. Quatro possíveis transcritos de RNAm de *BCR::ABL1* estão dispostos abaixo. Os dois primeiros (e13a2 e e14a2, respectivamente) são característicos de LMC. O transcrito e1a2 é identificado na maioria dos casos de LLA Ph⁺ e o transcrito e19a2 raramente é observado na LMC. Fonte: Mughal et al. (2016).

Na porção N-terminal de BCR há um domínio responsável pela oligomerização e ativação constitutiva de *BCR::ABL1*. Em *ABL1*, são preservados os domínios SH1, SH2 e SH3 sendo que o domínio SH1 contém o sítio catalítico responsável pela iniciação das vias de sinalização que resultam em proliferação celular desordenada e resistência à apoptose ⁽¹⁵⁾.

A **Figura 2** ilustra a estrutura de *BCR::ABL1* ⁽¹⁵⁾.

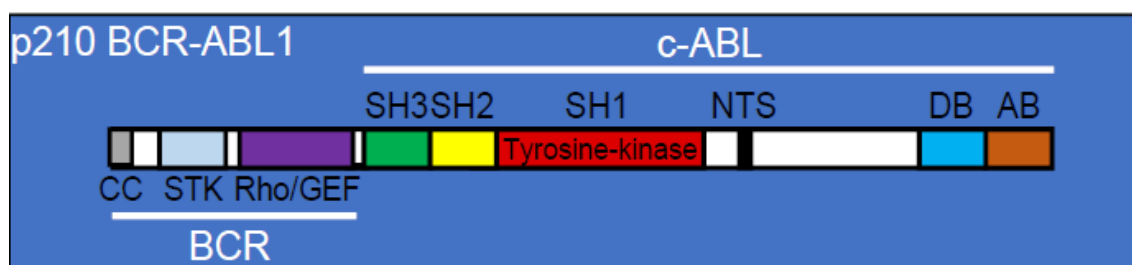


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura linear de *BCR::ABL1* em sua isoforma p210 evidenciando os domínios de BCR e ABL na proteína: CC (domínio de oligomerização *coil-coiled*); STK (domínio serina/treonina quinase); domínio Rho/GEF; SH (domínios de homologia SRC) 1, 2 e 3; NTS (sinal de translocação nuclear); DB (domínio de ligação ao DNA); AB (domínio de ligação à actina). Fonte: Amarante-Mendes et al. (2022).

A região BCR é responsável pela regulação da atividade enzimática e fornece sítios de ligação. O domínio *coil-coil* da porção N-terminal de BCR proporciona oligomerização e ativação constitutiva de *BCR::ABL1*. O componente *ABL1* contém um domínio SH2, um domínio SH3 e um domínio de quinase. A proteína *ABL1*, quando não fusionada à BCR, apresenta um domínio miristolado N-terminal, que resulta em autoinibição da atividade de quinase, entretanto esse domínio é perdido quando ocorre a fusão. O domínio de quinase de *BCR::ABL1* apresenta motivadores chave responsáveis por sua atividade como a alça ligante de fosfato (*p-loop*), o sítio de contato (ATP/IM), o domínio catalítico e a alça de ativação (*A-loop*). A ativação de *BCR::ABL1* ocorre quando o ATP se liga ao domínio quinase de *ABL1* e transfere um grupamento fosfato para o substrato *ABL1*. Os inibidores de tirosina quinase competem pelo sítio de ligação do ATP ^(17,20).

A perda do domínio autoinibitório miristolado N-terminal contribui para a ativação constitutiva de *BCR::ABL1*. A ativação ainda é potencializada pelo domínio de

oligomerização *coiled-coil*, localizado na porção N-terminal de BCR::ABL1. Outra contribuição de BCR para a leucemogênese é a presença de um resíduo de tirosina no aminoácido na posição 177 (Tyr-177), que é fosforilado. Há interação com os domínios SH2 e SH3, resultando em ativação de vias de sinalização ⁽²¹⁾.

Os 2 motivadores chave do primeiro éxon de BCR são a tirosina 177 e o domínio *coiled-coil* envolvendo os aminoácidos 1 a 63. A tirosina 177 fosforilada forma um sítio de ligação para Grb-2 (uma molécula adaptadora que conecta o BCR à via RAS), contribuindo dessa forma para a indução da leucemogênese. O domínio *coiled-coil* é importante para a dimerização de BCR::ABL1, que é necessária para a ativação da tirosina quinase de ABL1 e oncogenicidade de BCR::ABL1 ⁽²²⁻²⁴⁾.

7. Patogênese da LMC

O principal mecanismo através do qual o oncogene *BCR::ABL1* é responsável por ocasionar a leucemogênese consiste em uma cascata de vias de sinalização dependentes de tirosina quinase. A ativação de BCR::ABL1 se inicia a partir da dimerização ou tetramerização proporcionada pelo domínio *coiled-coil*. Após a dimerização, ocorre a autofosforilação por uma tirosina regulatória no *loop* de ativação de quinase em ABL1, que é seguida pela fosforilação do domínio SH2. Dessa forma, há aumento no número de resíduos de fosfotirosina na proteína BCR::ABL1 e consequentemente aumento dos sítios de ligação para domínios homólogos como por exemplo SH2 em que proteínas se associam para ativação de vias de sinalização celular. A partir da fosforilação de SH2 ocorre a ruptura da interação inibitória existente entre SH2 e SH3, resultando em ativação completa da atividade de quinase de BCR::ABL1 e formação de clones neoplásicos ^(15,22,25).

Há ativação de vias de sinalização como RAS/MAPK, JAK-STAT e PI-3 quinase, que resultam em transformação e proliferação celulares ⁽²⁶⁾. A ativação da via RAS/ MAPK ocorre inicialmente a partir da autofosforilação da tirosina 177, que gera um sítio de ligação para a molécula adaptadora Grb-2 no domínio SH2. Consequentemente, há a conversão da forma inativa de Ras vinculada ao GDP para a forma ativa associada ao GTP. O resultado final é a ativação de uma cascata de sinalização pela via MAPK, ocasionando proliferação celular desordenada ⁽²²⁾.

Também por intermédio da interação com o domínio SH2, ocorre ativação da via JAK, que é uma via responsável pela regulação do ciclo celular e proliferação celular. A partir da associação direta entre as proteínas STATs e o domínio SH2, ocorre a ativação da via JAK com formação do complexo JAK-STAT e desregulação da proliferação celular^(15,27).

A ativação da via PI3K/AKT promove aumento da sobrevivência celular através de mecanismos antiapoptóticos a partir da fosforilação de proteínas como Bcl2 e Bcl-x_L. O BCR::ABL1 promove o bloqueio da liberação do citocromo C pela mitocôndria. Em condições habituais, a liberação é necessária para a ativação da caspase-3 e início do processo de apoptose. A ativação da via PI-3 quinase aciona a proteína Akt, que possui atividade antiapoptótica. Um substrato de Akt é a proteína proapoptótica Bad. Na via da apoptose, Bad se liga às proteínas Bcl-2 e Bcl-x_L, inibindo-as e gerando morte celular. A partir da fosforilação de Bad por Akt há um bloqueio na ligação de Bad a essas proteínas com consequente supressão da apoptose^(22,28). Logo, a resistência à apoptose é decorrente do bloqueio mitocondrial na liberação do citocromo C para o citoplasma e consequente inativação de caspases efetoras. Como não ocorre a liberação do citocromo C, as caspases não são ativadas e a via de sinalização de morte celular programada não é iniciada. O aumento na sobrevivência além de promover a perpetuação do clone maligno ainda propicia condições para obtenção de mutações sequenciais⁽¹⁵⁾.

O protooncogene *Myc* também é alvo de BCR::ABL1. *Myc* converte sinais de estímulo à mitose em alterações de expressão gênica sendo que seus alvos incluem genes relacionados ao ciclo celular e apoptose. A partir da interação entre o domínio SH2 de BCR::ABL1 e a porção C-terminal com *Myc* e em associação com Jak2, há a ativação completa de *Myc* e consequente estabelecimento de atividade oncogênica^(22,29).

Há sinais independentes de atividade de tirosina quinase do BCR::ABL1, que permitem a sobrevivência das células neoplásicas, resultando em outro mecanismo que justifique a transformação maligna. Foi demonstrado que o bloqueio da atividade catalítica não ocasiona a completa dissociação do complexo molecular do cromossomo Philadelphia, justificando dessa forma a resistência desenvolvida aos inibidores de tirosina quinase em uma parcela de casos. Há geração de eventos sinalizadores, que asseguram a sobrevivência das células neoplásicas mesmo na ausência de atividade de tirosina quinase conforme é observado em casos de resistência ao Imatinibe (IMB)^(15,30).

8. Anormalidades citogenéticas adicionais (ACAs)

A maioria das ACAs correspondem a alterações cromossômicas não balanceadas e podem ser divididas em rota maior e rota menor. As alterações de rota maior são trissomia do cromossomo 8 (8+), isocromossomo 17q (i17q), trissomia do cromossomo 19 (19+) e um segundo cromossomo Philadelphia (Ph+). As alterações de rota menor incluem perda do cromossomo Y (-Y), monossomia do cromossomo 7 (-7), monossomia do cromossomo 17 (-17), trissomia do cromossomo 21 (+21) e t(3;21)(q26;q22) ^(31,32).

A divisão das ACAs em rota maior e rota menor foi estabelecida em 1993 com base na frequência em que eram detectadas na fase acelerada e crise blástica. Posteriormente, estudos demonstraram que as anormalidades de rota maior estão associadas com impacto negativo na sobrevida, no entanto foi constatado que algumas alterações de rota menor conferem alto risco como por exemplo o rearranjo 3q26, que está associado com resistência aos ITQs e mau prognóstico ^(13,33).

As anormalidades cromossômicas mais comuns em ordem de frequência são: trissomia do cromossomo 8 (34%), segundo cromossomo Philadelphia (30%), isocromossomo 17q (20%), trissomia do cromossomo 19 (13%), perda do cromossomo Y (8%), trissomia do cromossomo 21 (7%), monossomia do cromossomo 17 (5%) e monossomia do cromossomo 7 (5%) ^(31,32).

A presença de ACAs de rota maior ao diagnóstico indica risco de progressão de doença e configura critério para a fase crônica de alto risco/ fase acelerada. A presença de ACAs de rota maior ou rota menor no decorrer do tratamento também configura critério de fase acelerada, pois indica evolução clonal e falha terapêutica ^(9,11,34).

9. Diagnóstico

9.1 Considerações gerais

A maioria dos pacientes é assintomática e o diagnóstico ocorre a partir de exames rotineiros evidenciando leucocitose persistente e inexplicada. A investigação diagnóstica deve então ser iniciada pela anamnese e exame físico com especial atenção à presença de hepatoesplenomegalia. A avaliação laboratorial inicial é realizada através do hemograma, que evidencia leucocitose em geral superior a 25.000/ mm³. A contagem diferencial evidencia acentuada granulocitose com desvio à esquerda, caracterizada por neutrófilos

em diversos estágios de maturação, aumento de mielócitos, metamielócitos sem displasia. Anemia e basofilia assim como plaquetopenia ou plaquetose podem estar presentes no momento do diagnóstico ^(3,35).

O aspirado de medula óssea é necessário para a avaliação citogenética e mielograma. O mielograma fornece informações necessárias para a definição da fase em que a doença se encontra a partir da contagem de blastos e basófilos ⁽¹⁾.

9.2 Citogenética clássica (cariótipo)

O diagnóstico da LMC consiste na identificação citogenética do cromossomo Philadelphia e molecular do transcrito *BCR::ABL1* ⁽¹⁾. A citogenética clássica por intermédio do cariótipo constitui a técnica padrão ouro para evidenciar a presença do cromossomo Philadelphia em $\geq 95\%$ das metáfases analisadas em uma quantidade mínima recomendada de 20 metáfases. Dessa forma, é essencial para o diagnóstico e também para a identificação de alterações citogenéticas adicionais, que podem implicar em pior prognóstico, sendo que o cariótipo corresponde à única técnica de rotina capaz de identificá-las. Preferencialmente, o cariótipo deve ser realizado no material obtido através do aspirado medular, contudo é possível a realização no sangue periférico exceto se a indicação for para monitoramento da doença em que deve ser feito apenas no aspirado de medula óssea ^(3,18,26). O exame apresenta limitações pelo fato de ser um procedimento invasivo devido à necessidade de realização de aspirado medular e pela ausência de obtenção de metáfases suficientes em aproximadamente 5% das amostras ^(18,26).

A **Figura 3** abaixo ilustra um cariótipo com presença do cromossomo Philadelphia ⁽²⁶⁾.

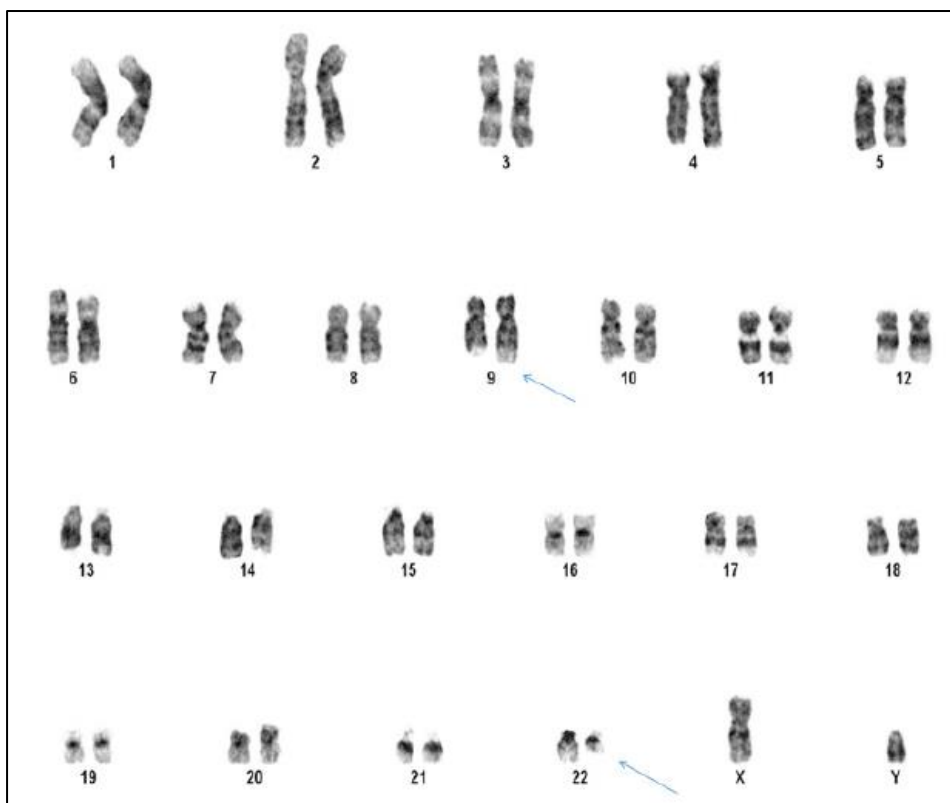


Figura 3: Cariótipo de um paciente do sexo masculino com presença do cromossomo Philadelphia originado como resultado da translocação recíproca entre o braço longo do cromossomo 9 na região 3 banda 4 e o braço longo do cromossomo 22 na região 1 banda 1. 46,XY,t(9;22)(q34;q11). Fonte: Ankathil et al. (2020).

Em 90% dos casos é observada a translocação característica, entretanto em aproximadamente 5% é detectado um cromossomo Philadelphia variante, envolvendo outros cromossomos além dos cromossomos 9 e 22. O prognóstico e a resposta ao tratamento com ITQ nesses casos são semelhantes aos casos em que a translocação é clássica ^(1,26).

9.3 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

O exame de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) consiste em uma técnica de citogenética molecular capaz de detectar essencialmente todos os tipos de rearranjo do *BCR::ABL1* independente do ponto de quebra, entretanto não é possível a identificação de alterações citogenéticas adicionais visto que são utilizadas sondas específicas para a translocação t(9;22) ⁽¹⁸⁾.

Em alguns centros, a técnica de FISH é utilizada de maneira rotineira para o diagnóstico de LMC enquanto que o cariótipo é destinado à detecção de anormalidades citogenéticas

adicionais, entretanto pode ser o exame alternativo caso não haja número suficiente de metáfases na análise do cariótipo ou quando as metáfases apresentam baixa qualidade, inviabilizando a correta avaliação citogenética ^(18,26).

9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção e monitoramento dos níveis do oncogene. Na LMC, é utilizada a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa), que consiste em técnica adequada para o diagnóstico visto que detecta o transcrito do gene de fusão, que pode ser qualitativa ou quantitativa. Se for empregada na forma qualitativa, o objetivo é o diagnóstico de LMC a partir da constatação do transcrito de fusão do gene *BCR::ABL1* enquanto que a forma quantitativa é utilizada para monitoramento dos níveis dos transcritos no decorrer da terapia. O princípio de ambas as formas é o mesmo com a diferença de que na RT-PCR quantitativa a quantificação dos níveis dos transcritos é feita por intermédio da mensuração da emissão de fluorescência durante a PCR ^(1,26).

9.5 Biópsia de medula óssea (histopatologia da LMC)

A biópsia de medula óssea na LMC em fase crônica exibe hiper celularidade global e acentuada hiperplasia granulocítica com manutenção da diferenciação e perda das células adiposas. Não deve ser observada displasia nessa linhagem. Frequentemente é constatado um aumento na quantidade de granulócitos imaturos peritrabeculares, formando camadas em torno de 5-10 células ao contrário de uma medula óssea normal em que são observadas camadas contendo apenas em torno de 2-3 células ^(11,36,37). A maturação granulocítica ocorre em direção ao centro dos espaços intertrabeculares de forma que é possível a presença de eventuais blastos entre as células granulocíticas maduras no meio dos espaços intertrabeculares, entretanto a presença de agregados de blastos nessa localização não é característica da fase crônica ^(11,38). Eosinofilia e basofilia podem ser identificadas ^(11,36). A série eritroide é tipicamente hipocelular, porém morfolologicamente normal com maturação preservada. Diante da hiper celularidade granulocítica e hipocelularidade eritroide, a relação G:E é aumentada ^(37,38).

A série megacariocítica é hiper celular com presença de formas pequenas e hipossegmentadas, caracterizando os “megacariócitos anões”, entretanto não correspondem aos verdadeiros micromegacariócitos observados na neoplasia mielodisplásica. A presença de numerosos micromegacariócitos semelhantes aos

observados na neoplasia mielodisplásica deve levantar a suspeita para progressão de doença ^(11,38). Pode ocorrer a formação de pequenos agrupamentos de megacariócitos e identificação de formas ectópicas isoladas peritrabeculares ⁽³⁷⁾.

Em aproximadamente 30% dos casos, são identificadas as células pseudo-Gaucher, que correspondem a macrófagos grandes com citoplasma xantomatoso e núcleo excêntrico lobulado ^(36,37). Essas células contêm glicolipídios fagocitados e hemossiderina, decorrente do elevado *turnover* celular provocado pela doença. São carreadoras do gene *BCR::ABL1* por serem progenitoras da célula-tronco leucêmica ^(37,38). Aumento no número de mastócitos e plasmócitos em localização perivascular é frequentemente visto ⁽³⁷⁾.

A fibrose reticulínica pode ser identificada em torno de 30% dos casos, correlacionando-se com a quantidade de megacariócitos, contudo a fibrose acentuada é incomum. Raramente a fibrose reticulínica é significativa a ponto de ocasionar confusão diagnóstica com mielofibrose primária ^(11,13,37). O aumento na deposição de fibras reticulínicas pode estar presente no momento do diagnóstico, entretanto é mais frequente na fase acelerada e na crise blástica ⁽³⁷⁾.

Os blastos tipicamente perfazem menos de 5% da celularidade medular de forma que quantidades superiores a 10% indicam progressão para fases subsequentes ⁽³⁸⁾. A biópsia de medula óssea pode ser realizada para identificar eventuais ninhos de blastos que não foram visualizados no mielograma quando o esfregaço é insuficiente ou subótimo ⁽¹³⁾.

Foram descritos dois subtipos de LMC: Gran e Gran-Meg. O subtipo Gran é caracterizado por proliferação granulocítica com ausência ou diminuição na quantidade de megacariócitos enquanto que o subtipo Gran-Meg apresenta proliferação granulocítica e megacariocítica, sendo que os megacariócitos são ectópicos e polimórficos com presença de formas pequenas e micromegacariócitos. Os subtipos apresentam história natural e prognóstico distintos de modo que no subtipo Gran a sobrevida é menor com progressão para crise blástica enquanto que no subtipo Gran-Meg a sobrevida é maior com tendência à progressão para mielofibrose ⁽³⁹⁾.

Os fatores prognósticos descritos na fase crônica anteriormente à introdução da terapia com ITQ eram número de megacariócitos, grau de fibrose reticulínica e a proporção de precursores eritroides, que isoladamente se correlacionavam com melhor prognóstico ⁽³⁷⁾.

A fibrose reticulínica na era pré-ITQ estava relacionada a um pior desfecho, entretanto atualmente o significado é incerto ⁽³⁸⁾.

Na fase acelerada, as alterações displásicas podem existir em qualquer linhagem, sendo evidentes na linhagem megacariocítica, que exhibe agrupamentos de pequenos megacariócitos inclusive verdadeiros micromegacariócitos juntamente com aumento significativo da trama reticulínica. Há elevação na quantidade de blastos, compreendendo o intervalo de 10-19% na medula óssea ou sangue periférico ^(38,40,41).

A biópsia de medula óssea em crise blástica exhibe geralmente agregados difusos de blastos, porém pode haver infiltração focal. Os blastos apresentam um nucléolo único proeminente e significativo pleomorfismo. A mielofibrose é detectada em aproximadamente 40% dos casos nessa fase, tornando o aspirado insuficiente e sendo necessária a realização de biópsia para o diagnóstico de crise blástica ^(11,37).

A presença de $\geq 20\%$ de blastos mieloides é necessária para o diagnóstico de crise blástica na medula óssea ou sangue periférico enquanto que a detecção de linfoblastos mesmo que $< 10\%$ na medula óssea ou sangue periférico também configura critério diagnóstico ⁽¹¹⁾. Majoritariamente, os blastos são de origem mielóide, entretanto em cerca de 20% a 30% dos casos a origem é linfóide de predomínio B, sendo que há relatos de linfoblastos de origens T e NK. É possível a ocorrência de crise blástica de fenótipo misto, caracterizada pela presença de blastos mieloides e linfóides simultaneamente ⁽³⁸⁾.

10. Tratamento

10.1 Estratificação do risco

O primeiro escore de estratificação de risco desenvolvido foi o de Sokal, em 1984. Foi elaborado na era pré-ITQ em que o tratamento consistia essencialmente em quimioterapia. Compreende os seguintes parâmetros: idade, contagem de blastos, contagem plaquetária e tamanho do baço. Os resultados possíveis são $< 0,8$; $0,8-1,2$ e $>1,2$ e correspondem, respectivamente, às categorias baixo, intermediário e alto risco. O objetivo é a predição da probabilidade de sobrevida global nos três diferentes grupos ^(13,42).

Posteriormente, foi criado o escore Euro, em 1998, que avalia a sobrevida global com base no tratamento com interferon alfa. Em 2011, foi elaborado o escore EUTOS

(*European Treatment and Outcome Study*) baseando-se no tratamento com IMB. Esse escore determina dois grupos com diferentes probabilidades de obter resposta citogenética completa após 18 meses de tratamento ⁽⁴²⁾.

Em 2016, o escore ELTS (*EUTOS Long-Term Survival*) foi desenvolvido, sendo o escore mais moderno e que considera que com o advento da terapia com os ITQ, os óbitos ocorrem em decorrência de causas secundárias não relacionadas diretamente à LMC. Os parâmetros utilizados são os mesmos que no escore Sokal e as categorias resultantes são baixo, intermediário e alto risco. O objetivo é determinar o risco de óbito relacionado à LMC em três grupos distintos ^(13,42).

Vários estudos demonstraram que o escore ELTS é superior em identificar as populações de alto risco, é melhor preditor em relação ao risco de óbito decorrente de LMC e também de se obter as respostas citogenética completa e molecular maior. Portanto, atualmente é o escore preferencialmente recomendado ^(13,43).

10.2 – Inibidores de tirosina quinase (ITQ)

O tratamento padrão para a LMC consiste na administração de ITQ, que correspondem a pequenas moléculas, também utilizadas para tratamento de tumores sólidos. O desenvolvimento da terapia com base nos ITQ na LMC resultou em um acentuado aumento na sobrevida semelhante ao de indivíduos saudáveis, ressaltando dessa forma a importância da terapia alvo. Anteriormente à descoberta dos ITQ, a LMC era fatal a longo prazo ^(44,45). Diferem entre si em relação à potência, atividade contra as mutações em *BCR::ABL1*, farmacocinética e efeitos adversos ⁽¹³⁾.

O IMB é a opção inicial de tratamento da LMC com exceção dos casos diagnosticados durante a gestação visto que os ITQ são teratogênicos. No início do tratamento, pode ser utilizada hidroxiureia em pacientes sintomáticos com altas contagens leucocitárias ou plaquetárias enquanto a confirmação citogenética e molecular está pendente. O IMB corresponde a um ITQ de primeira geração, que se liga à forma inativa do *BCR::ABL1*. Atua através da inibição competitiva do sítio de ligação do ATP no domínio de quinase subsequentemente bloqueando a habilidade do *BCR::ABL1* de fosforilar os resíduos de tirosina ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, conforme demonstrado na **Figura 4** abaixo ⁽⁴⁷⁾.

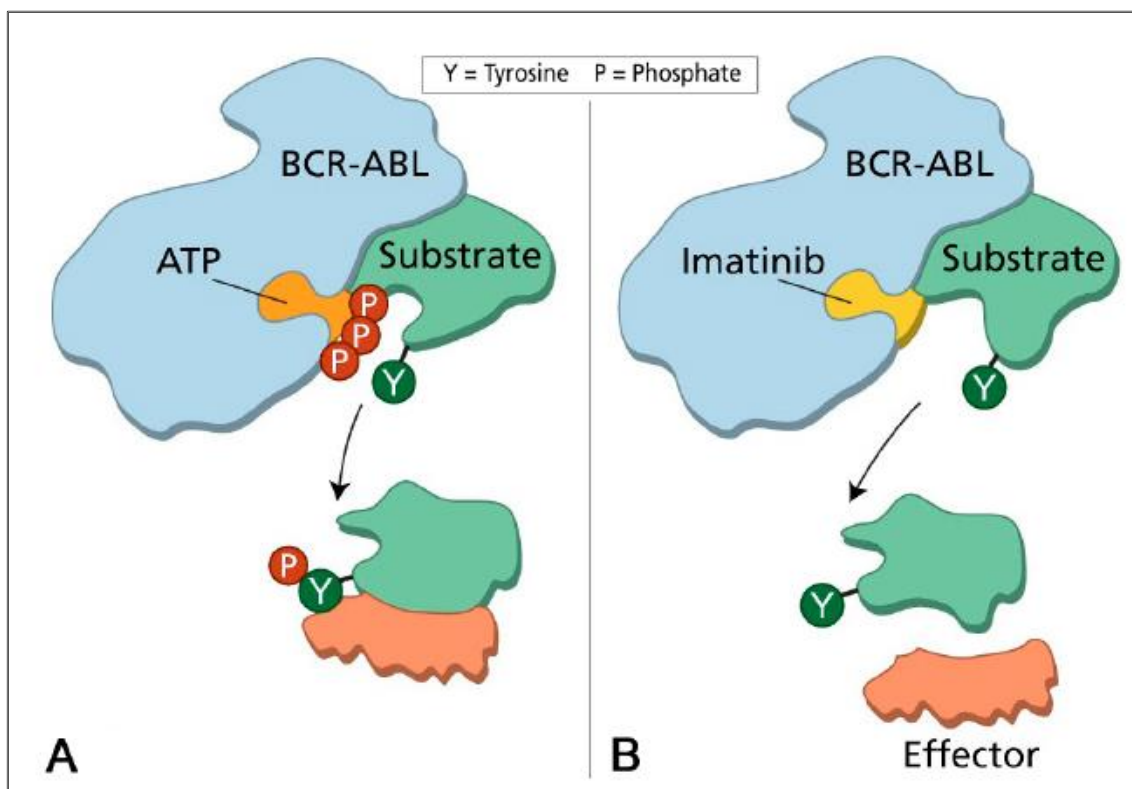


Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de ação do IMB. (A) A molécula de ATP ocupa o seu sítio de ligação na porção ABL da oncoproteína BCR::ABL e promove a fosforilação do substrato, que então se dissocia e efetua contato funcional com a molécula efetora, ativando a via de sinalização intracelular, que ocasiona a leucemogênese. (B) O IMB compete pelo sítio de ligação do ATP de forma que, quando está ligado, impede a fosforilação do substrato, bloqueando consequentemente a ativação da via de sinalização pela molécula efetora. Fonte: Mughal et al. (2006).

Foi o primeiro inibidor de tirosina quinase a ser aprovado para uso nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and drug administration*) em 2001, iniciando a terapia alvo para câncer com o uso de ITQ ^(44,46).

Os inibidores de segunda geração são mais potentes do que o IMB e incluem: Dasatinibe, Nilotinibe e Bosutinibe. O Ponatinibe é um inibidor de tirosina quinase de terceira geração, sendo mais potente do que todos os outros anteriormente descritos. O uso está destinado aos pacientes com a mutação T315I ou com resistência a dois ou mais ITQ ⁽⁴⁶⁾.

10.3 Orientações para tratamento

No diagnóstico inicial, a escolha do ITQ a ser utilizado depende do objetivo do tratamento, idade, presença de comorbidades, escores de Sokal e ELTS, custo e disponibilidade da medicação ^(1,13). Os principais objetivos da terapia são normalização

da sobrevida e obtenção de resposta molecular profunda prolongada ⁽²⁾. Para primeira linha de tratamento em fase crônica estão disponíveis IMB e os inibidores de segunda geração (Dasatinibe, Nilotinibe e Bosutinibe), sendo que todos os inibidores de segunda geração são superiores ao IMB e a superioridade é mais evidente nos grupos de alto risco ⁽¹³⁾.

Se a LMC for diagnosticada em fase crônica de alto risco, a recomendação para o tratamento inicial é pelos inibidores de segunda geração preferencialmente o Dasatinibe ⁽⁴⁸⁾.

Na crise blástica podem ser utilizados ITQ de segunda geração ou terceira geração com ou sem quimioterapia para alcançar a segunda fase crônica e então realizar o transplante de medula óssea alogênico ^(1,3,49). A escolha da quimioterapia depende do tipo de crise blástica, se mieloide ou linfóide. Na crise blástica linfóide, podem ser utilizados protocolos para LLA com vincristina e prednisona enquanto que na crise blástica mieloide os protocolos são semelhantes aos utilizados para LMA e envolvem antraciclina e citarabina ^(3,48,50). Para todos os pacientes em fase crônica de alto risco ou crise blástica o transplante alogênico deve ser considerado ⁽⁴⁸⁾.

10.4 - Intolerância/ Toxicidade

A intolerância à terapia ocorre na presença de efeitos colaterais que não podem ser manejados a partir da redução da dose do medicamento ou tratamento dos sintomas, resultando em interrupção do tratamento atual e substituição por outro ITQ ⁽⁵¹⁾.

Cada ITQ apresenta perfis de toxicidade distintos, sendo necessária ponderação no momento de escolha para tratamento. A maioria é bem tolerada e na presença de toxicidade, o reajuste da dose geralmente normaliza o quadro ⁽¹⁾.

10.5 - Alvos do tratamento

O objetivo do tratamento da LMC é obtenção de respostas hematológica, citogenética e molecular maior de longa duração. A resposta hematológica completa é definida como contagens leucocitária e plaquetária normais e desaparecimento dos sintomas relacionados à LMC. A resposta hematológica parcial é definida como um decréscimo na contagem leucocitária inferior a 50% do valor inicial anterior ao tratamento ou normalização dos níveis de leucócitos, porém com esplenomegalia persistente ou presença de blastos no sangue periférico ⁽¹⁴⁾.

A resposta citogenética, avaliada preferencialmente pelo cariótipo, é mensurada a partir da quantificação de células Ph⁺ remanescentes após a implementação da terapia. Divide-se em completa, parcial, minor e mínima. A resposta citogenética completa é definida como ausência de metáfases Ph⁺ nas células da medula óssea. Na resposta citogenética parcial são encontradas de 1 a 35% de células Ph⁺ enquanto que na resposta citogenética minor há entre 36%-65% de células Ph⁺. Na resposta citogenética mínima há 66%-95% de células Ph⁺ ^(13,36).

A resposta molecular, avaliada através da técnica de PCR quantitativo, é mensurada com base no decréscimo na quantidade de células contendo a oncoproteína p210. Divide-se em resposta molecular precoce, resposta molecular maior e resposta molecular profunda/ indetectável. Na resposta molecular precoce os níveis de *BCR::ABL1* são iguais ou inferiores a 10% em 3 a 6 meses após o início do tratamento, ou seja, houve uma redução de 90% ou mais na quantidade de células leucêmicas. Uma resposta molecular de *BCR::ABL1* ≤ 1% é equivalente à resposta citogenética completa. Na resposta molecular maior (RMM ou MR³), há um decréscimo de *BCR::ABL1* para 0,1% (*BCR-ABL1* ≤ 0,1%). A resposta molecular profunda (RM⁴, RM^{4,5} ou RM⁵)/ indetectável ocorre quando os níveis da oncoproteína são iguais ou inferiores a 0,01% (*BCR::ABL1* ≤ 0,01%). A expressão resposta molecular completa deve ser evitada e substituída pelo termo leucemia molecularmente indetectável (LMI) ^(14,18,46).

10.6 – Transplante de medula óssea

O transplante de medula óssea com células-tronco alogênico é destinado aos casos com resistência ou intolerância a múltiplos ITQ. Falha de resposta com Ponatinibe após 3 meses de tratamento indica alto risco de progressão e também constitui critério para transplante. Outras indicações incluem diagnóstico já em fase crônica de alto risco e sem resposta adequada ao tratamento, progressão para fase crônica de alto risco em vigência de tratamento, diagnóstico inicial ou progressão para crise blástica ^(1,46). Nesse contexto, o transplante deve ser realizado assim que uma segunda fase crônica for atingida visto que o desfecho é melhor na fase crônica do que se efetuado na fase crônica de alto risco ou crise blástica ⁽¹³⁾.

11. LMC resistente

A LMC pode apresentar resistência primária ou secundária. A resistência primária refere-se à ausência de resposta hematológica, citogenética ou molecular nas etapas iniciais do tratamento enquanto que a resistência secundária ocorre quando há perda de resposta prévia ^(52,53).

A incidência de resistência é em torno de 10% em 10 anos de tratamento, ou seja, 1% ao ano ⁽⁵⁴⁾. Diante de falha no tratamento, deve ser investigada a causa. Dessa forma, é necessário averiguar se a adesão à medicação está adequada e se há alguma interação medicamentosa visto que pode interferir na absorção e metabolismo dos ITQ. A falta de adesão à medicação pode ser decorrente da presença de efeitos colaterais. Após a exclusão dessas possíveis causas, uma avaliação completa de resistência deve ser efetuada e inclui: exame físico, hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea, cariótipo de medula óssea e pesquisa de mutação no gene *BCR::ABL1* ⁽¹³⁾. Dessa forma, deve ser efetuada nova avaliação medular para confirmação da fase da doença e existência de alterações citogenéticas adicionais juntamente com a troca para um inibidor de tirosina quinase de segunda geração ⁽¹⁾.

Os mecanismos de resistência aos ITQ podem ser dependentes ou independentes de *ABL1*. A resistência independente de *ABL1* é mais comumente vista na resistência primária e compreende instabilidade genômica, quiescência de células-tronco leucêmicas e processos biológicos que interferem com a biodisponibilidade dos ITQ, resultando em baixos níveis plasmáticos. Há ativação de vias de sinalização alternativas no contexto de inibição eficaz de *BCR::ABL1* que ocasionam resistência. A resistência secundária envolve mecanismos dependentes de *BCR::ABL1* que são capazes de subverter a inibição eficaz do oncogene e incluem mutações em *BCR::ABL1*, amplificação gênica e aumento da expressão ^(52,53).

12 - Nichos da medula óssea

12.1 - Introdução

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) possuem capacidade evolutiva intrínseca de autorrenovação e diferenciação em todas as linhagens hematopoiéticas com o propósito de manter a dinâmica da produção sanguínea. No início da década de 70, foi proposto que

o microambiente local da medula óssea, denominado de nicho, fornecia importantes estímulos para a autorrenovação e diferenciação das CTH. Em 1978, a hipótese foi oficialmente formulada por Ray Schofield, que estabeleceu que o nicho é responsável pelo controle da quiescência e entrada das CTH no ciclo celular ao fornecer informações a respeito do estado funcional do organismo e, conseqüentemente, definindo o destino das CTH em direção à autorrenovação ou diferenciação ⁽⁵⁵⁾.

De acordo com Schofield, o nicho deve fornecer sinais autócrinos, endócrinos e parácrinos para que as CTH se renovem ou se diferenciem durante a hematopoiese. São descritos dois nichos: osteoblástico (endosteal) e perivascular ^(56,57). Os métodos de comunicação celular dentro dos nichos ocorrem através de contato celular direto e por intermédio de ligação via receptores de superfície ⁽⁵⁶⁾.

As CTH estão presentes em ambos os nichos de modo que são reguladas funcionalmente por mecanismos distintos. O nicho endosteal está localizado ao redor da superfície óssea, sendo habitado por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células estromais mesenquimais e células T reguladoras ao passo que no nicho perivascular são encontradas células endoteliais sinusoidais, pericitos e células de Schwann não mielinizadas. Outro tipo celular que faz parte do microambiente medular é a célula adiposa, que está distribuída ao longo da medula óssea ^(56,57).

O **Quadro 3** indica os principais tipos celulares encontrados nos nichos com os respectivos fatores secretados/ expressos e sua função ⁽⁵⁶⁾.

Tipos celulares e o papel nos nichos da medula óssea		
Não hematopoiéticos	Fatores secretados ou expressos	Função nos nichos
Osteoblastos	CSF3, Osteopontina/CD44	. Controle da expansão das CTH e autorrenovação
		. Regulação das CTH: endereçamento, quiescência e mobilização
Osteócitos	CSF3	. Regulação dos osteoblastos
Células mesenquimais	CXCL12, SCF	. Diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos
		. Potencializa a diferenciação das CTH e manutenção
Células CAR	CXCL12	. Manutenção das CTH
		. Manutenção dos progenitores linfoides
Células de Schwann não mielinizadas	TGF β	. Quiescência das CTH
Sistema nervoso simpático	Catecolaminas	. Controle da liberação circadiana das CTH
Adipócitos	Adiponectina	. Regulação negativa da homeostasia
Células endoteliais	E-selectina, P-selectina, VCAM-1	. Manutenção das CTH
		. Aumento da quiescência e autorrenovação das CTH
Hematopoiéticos	Fatores secretados ou expressos	Função nos nichos
Osteoclastos	Enzimas proteolíticas	. Manutenção das cavidades do nicho osteoblástico
		. Mobilização das CTH
Macrófagos	Prostaglandina E2, Oncostatina M	. Mobilização das CTH
		. Retenção das CTH no nicho osteoblástico
		. Promoção de eritropoiese
Linfócitos	-	. Regulação do crescimento das CTH
		. Papel importante de células T reguladoras na tolerância imunológica

CAR: CXCL12-abundant reticular. Fonte: Khattab et al. (2024).

Na região perissinusoidal, as CTH são mantidas em um estado menos quiescente pela ação de CXCL12 e do fator de célula-tronco (SCF) por células endoteliais e células reticulares com abundante CXCL12 (CAR). No nicho endosteal, as CTH são mantidas em estado de quiescência a partir da interação dos tipos celulares que nele residem. As células mesenquimais estromais de ambos os nichos apresentam semelhanças, porém foi proposto que as células estromais mesenquimais endosteais promovem a quiescência das CTH e as células estromais perivasculares incentivam a proliferação das CTH ^(57,58).

A população de células mesenquimais apresenta uma estreita relação nos nichos visto que as células estromais mesenquimais se diferenciam nas linhagens adipocítica, condrogênica e osteogênica, entretanto as diferentes células progenitoras podem exercer efeitos distintos sobre as CTH como, por exemplo, os adipócitos, que são fonte de SCF e atuam na manutenção das CTH, mas também podem atuar como reguladores negativos por inibirem a formação de sinusoides. Os osteoblastos, por sua vez, atuam sobre as CTH através do controle da expansão, quiescência e mobilização ^(56,59).

Existe uma relação funcional entre o nicho endosteal e as CTH visto que osteoblastos secretam o fator estimulador do crescimento de colônias granulocíticas (G-CSF) e osteopontina (OPN), que promovem a manutenção na quantidade de células progenitoras CD34⁺ na medula óssea. As CTH se deslocam na medula óssea através da secreção de CXCL12/CXCR4 e VCAM-1/VLA-4 por osteoblastos e ação de fibras nervosas simpáticas, logo desempenham função de endereçamento das CTH na medula óssea e retenção no nicho endosteal ⁽⁵⁷⁾.

As células endoteliais e estromais perivasculares promovem a manutenção das CTH. As células endoteliais da medula óssea são responsáveis pela produção de fatores que asseguram a manutenção e regeneração das CTH como SCF e CXCL12. As células estromais LepR⁺ também produzem essas proteínas, assegurando a homeostasia das CTH ⁽⁵⁸⁾.

A **Figura 5** ilustra o microambiente da medula óssea ⁽⁶⁰⁾.

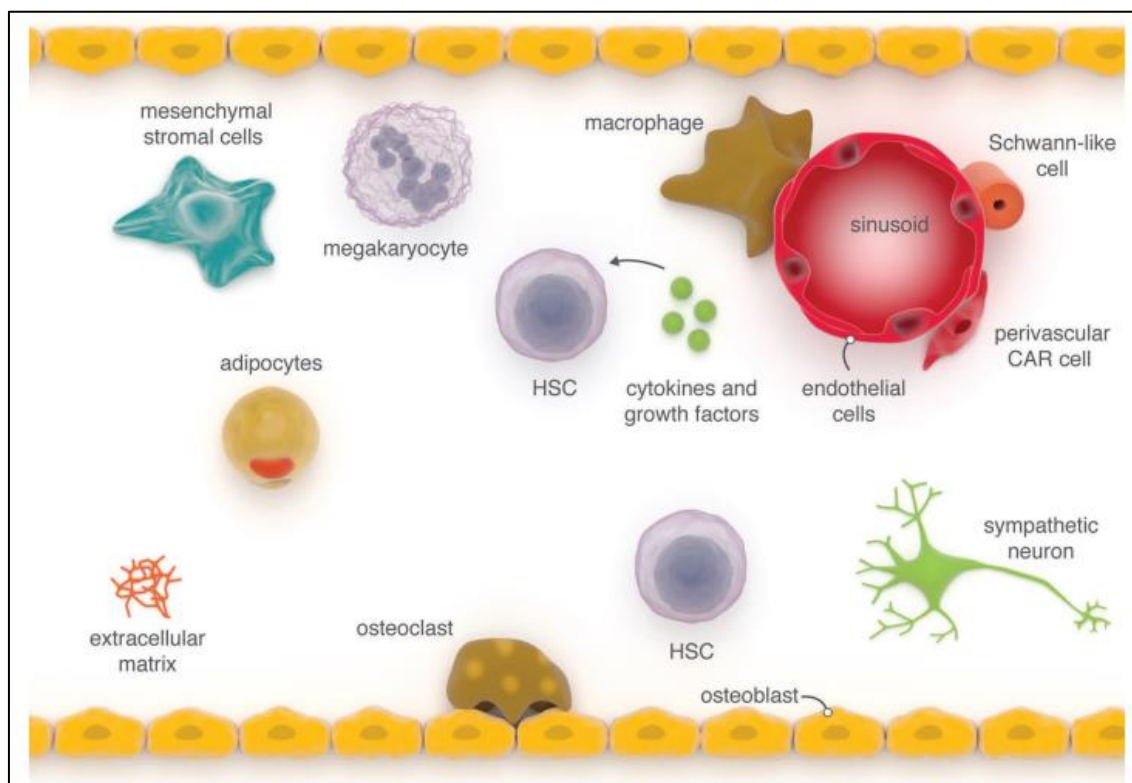


Figura 5: Representação dos nichos da medula óssea. O microambiente medular é constituído por diferentes populações celulares, que contribuem de maneira coordenada para a regulação da hematopoiese a partir da interação entre os nichos osteoblástico e perivascular. Fonte: Krause et al. (2015).

Muitas células modulam diretamente ou indiretamente as CTH e os nichos por mecanismos distintos das células endoteliais e estromais perivasculares. A redução na quantidade de monócitos e células dendríticas ocasiona a mobilização das CTH devido à modificação na expressão de CXCL12 pelas células estromais e mudança na permeabilidade das células endoteliais. Uma parcela de macrófagos proporciona a quiescência das CTH a partir da liberação de TGF- β assim como os megacariócitos, que estão localizados na região perivascular próximo às CTH e exercem influência sobre os nichos através da produção da citocina CXCL4, que inibe a proliferação das CTH, e TGF- β , que as mantém em estado quiescente ^(55,58).

A arquitetura da medula óssea é fundamental para a integridade do comportamento das CTH de modo que a localização precisa dos diferentes tipos celulares nos nichos exerce influência sobre as CTH, especificamente no estado de quiescência ^(59,61). Estudos experimentais em que o remodelamento dos nichos foi induzido a partir da deleção de

tipos celulares como células LepR⁺, megacariócitos e células de Schwann, demonstraram declínio da hematopoiese e, a longo prazo, falência medular. Logo, constata-se que os diferentes tipos celulares exercem coletivamente influência sobre o funcionamento das CTH ^(59,62,63).

Algumas células precursoras de determinadas linhagens apresentam localizações específicas no microambiente medular. Há progenitores linfoides que residem próximo à região endosteal onde dependem de CXCL12, produzido por osteoblastos enquanto que há uma parcela de progenitores linfoides que reside próximo de arteríolas para obtenção de SCF, produzido por células estromais LepR⁺. Progenitores eritroides estão localizados adjacente aos sinusoides onde também dependem de SCF, produzido por células LepR⁺ ⁽⁵⁸⁾.

Em condições estáveis do organismo, os níveis das CTH e a liberação de células hematopoiéticas na corrente sanguínea apresentam oscilações circadianas no decorrer do dia e da noite em virtude da produção de CXCL12 pelos nichos. Foram observadas flutuações circadianas nos níveis de norepinefrina e TNF, que ocasionam aumento temporário na quantidade de melatonina e espécies reativas de oxigênio nos compartimentos medulares ^(59,64). A melatonina promove autorrenovação das CTH e protege as células estromais dos nichos dos efeitos tóxicos negativos provocados pelas espécies reativas de oxigênio ^(59,65). Logo, foi constatado que os nichos oscilam entre um estado de estresse inflamatório, ocasionado pelo aumento de TNF e espécies reativas de oxigênio, e um estado livre de estresse, evidenciando um papel importante da melatonina na proteção dos nichos, que estão em constante equilíbrio dinâmico diário ⁽⁵⁹⁾.

12.2 – Remodelamento dos nichos da medula óssea

O remodelamento dos nichos pode ocorrer através de uma resposta frente a um estresse agudo ou crônico, tratamento citotóxico, infecções e malignidades. Essas condições podem gerar a liberação de citocinas próinflamatórias, que recrutam as CTH quiescentes para o ciclo celular com consequente remodelamento do nicho perivascular ^(59,66).

A resposta dos nichos diante de um evento estressor como por exemplo presença de lipopolissacárides, produzidos por infecção bacteriana, pode ser evidenciada no recrutamento das CTH quiescentes para entrada no ciclo celular e diferenciação ^(59,67). Posteriormente, há a saída de neutrófilos da medula óssea, acompanhada de remodelamento da vasculatura sinusoidal ⁽⁵⁹⁾. A irradiação de corpo inteiro, outro evento

estressor, afeta as células estromais dos nichos, pois são altamente sensíveis à irradiação, no entanto ocorre rápida recuperação devido à mobilização dos megacariócitos remanescentes para o nicho osteoblástico ^(59,68). A partir desse povoamento na superfície do nicho, é observado aumento na linhagem osteoblástica, restaurando a configuração e constituição do nicho a partir da mobilização das CTH. Paralelamente à recuperação osteoblástica, há dilatação e congestão da vasculatura sinusoidal acompanhada de progressivo decréscimo e degeneração adiposa subsequente ^(59,69).

A desregulação nos nichos também pode ser desencadeada pelo envelhecimento e malignidades hematológicas crônicas como neoplasia mielodisplásica e neoplasias mieloproliferativas, que cursam com hematopoiese ineficaz ^(59,70). Atualmente, não é bem compreendido quais os tipos celulares estão envolvidos no mecanismo de desregulação da homeostasia das CTH, impactando na sua sobrevivência e geração de clones malignos. Dessa forma, torna-se evidente a complexidade morfológica e funcional dos nichos da medula óssea assim como a possibilidade de serem alvos terapêuticos para interferir no suprimento de estados patológicos ^(59,71).

O processo de envelhecimento constitui um fator de risco importante para o decréscimo funcional das CTH e desenvolvimento de malignidades hematológicas ⁽⁵⁹⁾. O envelhecimento desencadeia o remodelamento crônico dos nichos devido a um aumento nas células adiposas e redução das células osteogênicas ⁽⁷²⁾. O desbalanço ocorre pela reprogramação dos precursores mesenquimais em direção à diferenciação adiposa associado à senescência estromal ^(59,73). Nesse contexto, o remodelamento altera a diferenciação celular, podendo resultar em aumento da mielopoiese, trombopoiese e hematopoiese clonal. Logo, há risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias mieloides no contexto de envelhecimento, porém é desconhecida a conexão precisa entre remodelamento dos nichos, expansão mieloide, hematopoiese clonal e ocorrência de malignidades hematológicas crônicas ⁽⁵⁹⁾.

No transplante de medula óssea, há agressão dos nichos pelas medicações citotóxicas utilizadas e irradiação. São desconhecidos quais mecanismos dos nichos afetam a longo prazo a taxa de sucesso dos transplantes, contudo sabe-se que fatores como *Sfrp1/2* e *Wnt5a*, que não atuam na manutenção do equilíbrio dos nichos de maneira significativa em condições habituais, são necessários para o sucesso da regeneração das CTH quiescentes. Dessa forma, o conjunto de proteínas envolvidas na restauração dos nichos

após o transplante difere das proteínas envolvidas essencialmente na homeostase dos nichos em condições fisiológicas ^(59,74,75).

Perturbações no nicho podem ocasionar colapso hematopoiético com transformação maligna e desenvolvimento de leucemia a partir da mudança no comportamento das CTH ^(55,59). As células-tronco leucêmicas possuem a capacidade de converter nichos saudáveis em malignos para promover a sua sobrevivência e proliferação, logo usufruem dos nichos da medula óssea para evadir da morte celular provocada pela quimioterapia, ocasionando, consequentemente, quimioressistência ⁽⁵⁶⁾. As células-tronco leucêmicas agravam a desregulação da hematopoiese devido à criação de seu próprio microambiente, voltado para a manutenção das células neoplásicas e incapaz de fornecer os sinais necessários para promover a manutenção das CTH normais e hematopoiese ⁽⁵⁹⁾.

12.3 – Remodelamento maligno dos nichos da medula óssea nas neoplasias

A transformação maligna ocasionada pela desregulação dos nichos é um processo gradual aliado à produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que como resultado promovem mielopoiese às custas da manutenção das CTH ⁽⁷⁶⁾.

Diante do contexto neoplásico, a microarquitetura dos nichos é distorcida com alterações osteopênicas conforme demonstrado por estudos histológicos nas neoplasias mielodisplásicas e neoplasias mieloproliferativas ^(59,77). Não são completamente conhecidos os mecanismos responsáveis pela distorção arquitetural dos nichos, mas foi demonstrado que os nichos promovem a manutenção das células malignas por intermédio da via inflamatória NFκB, que gera ativação estromal, e da produção de citocinas proinflamatórias como IL6 e TGFβ1. Constatou-se em culturas que as células mesenquimais estromais nas neoplasias mielodisplásicas e neoplasias mieloproliferativas apresentam alterações inflamatórias em comparação às células mesenquimais estromais saudáveis, evidenciando que a inflamação estromal está relacionada ao remodelamento ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾.

As células endoteliais no nicho perivascular reduzem a transformação proinflamatória das células estromais, desencadeando, portanto, um efeito protetor na manutenção da hematopoiese. Em compensação, a permeabilidade vascular está significativamente aumentada na LMA de modo que o direcionamento de alvos terapêuticos contra a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico aumenta a resposta à quimioterapia ^(81,82). Nas neoplasias mieloproliferativas, a ativação constitutiva da via

NFκB resulta em sobrevivência das células oncogênicas nos nichos, logo a utilização de terapias direcionadas contra essa via ocasiona morte das células malignas e consequente restauração dos nichos. Dessa forma, o estudo aprofundado dos nichos pode levar ao desenvolvimento de terapias alvo capazes de restabelecer o microambiente medular necessário para a manutenção das CTH e eliminar os nichos malignos remodelados ^(59,83).

12.4 - Remodelamento maligno dos nichos da medula óssea na LMC

A terapia com ITQ é eficaz no tratamento da LMC, contudo com frequência não ocorre a erradicação das células-tronco leucêmicas e, conseqüentemente, há recidiva e persistência da doença. Acredita-se que um dos motivos para a persistência dessas células seja devido aos nichos medulares funcionalmente alterados, que conferem proteção a elas. Os nichos são remodelados para conferirem aporte às células-tronco leucêmicas, contribuindo dessa forma com a sua manutenção. Paralelamente, o microambiente medular se torna hostil para as CTH normais ^(76,84).

Durante a progressão leucêmica, as células neoplásicas são capazes de reprogramar o seu nicho com o intuito de intensificar a proliferação desordenada e comprometer a hematopoiese normal. Estudos demonstram que fatores mesenquimais derivados do nicho como CXCL12, Wnt e IL-1 promovem a manutenção do estado de quiescência das células-tronco leucêmicas, protegendo-as conseqüentemente da ação dos ITQ. A superexpressão de citocinas inflamatórias como TNF-α em associação com quimiocinas provenientes do nicho remodelado proporciona às células-tronco leucêmicas uma vantagem proliferativa em relação às CTH normais ^(76,85,86).

Na LMC, a desregulação molecular dos nichos foi demonstrada a partir da constatação da redução da quimiocina CXCL14 no compartimento estromal da medula óssea por Dolinska et al (2023). A restauração da expressão de CXCL14 resultou em supressão da manutenção das células-tronco leucêmicas e potencializou a ação dos ITQ. Logo, CXCL14 pode corresponder a um novo alvo terapêutico na LMC ⁽⁷⁶⁾.

As selectinas e integrinas são proteínas envolvidas no processo de endereçamento e adesão das CTH. A expressão de integrinas permite que as CTH se liguem à VCAM-1 no endotélio da medula óssea e à fibronectina na matriz extracelular. Integrinas como VLA4 e VLA5 interagem com E-selectina e P-selectina, expressas constitutivamente na superfície do endotélio. CXCL12 corresponde a uma quimiocina com função de quimiotaxia para as CTH através de seu receptor CXCR4 juntamente com as integrinas

$\beta 1$ e $\beta 2$. Por intermédio dessas múltiplas interações, ocorre o endereçamento e adesão das CTH⁽⁸⁷⁾.

Foi demonstrado que as células-tronco leucêmicas apresentam diversas anormalidades nas moléculas de adesão. Apresentam a integrina $\beta 1$ disfuncional, que provoca diminuição da adesão ao estroma, contudo não há decréscimo na expressão de VLA4 e VLA5. Devido à perda de função da integrina $\beta 1$, as células-tronco leucêmicas podem se redistribuir no sangue periférico e em outros órgãos, provocando infiltração extramedular⁽⁸⁸⁾. Há expressão reduzida de CXCR4 e quimiotaxia deficiente por CXCL12. A partir de mecanismos alternativos, as células-tronco leucêmicas são capazes de aderir e permanecer na medula óssea, apesar da perda de funcionalidade dessas moléculas de adesão^(87,89).

A E-selectina, uma molécula de adesão expressa em células endoteliais e ativada por citocinas, é uma das principais proteínas do nicho perivascular e juntamente com o seu ligante CD44 promove a adesão das células-tronco leucêmicas no nicho⁽⁹⁰⁾. Na LMC, foi demonstrado que a interrupção da interação entre a E-selectina e CD44 com as células-tronco leucêmicas impede a ligação ao endotélio e juntamente com a associação ao uso de IMB há maior erradicação das células malignas em comparação com o uso de IMB isolado⁽⁸⁷⁾.

Observou-se que há interação entre as células-tronco leucêmicas e o nicho perivascular a partir de experimentos com camundongos tratados com um inibidor de E-selectina (GMI-1271) visto que nesses animais houve redução da interação entre essas células e o endotélio. As células leucêmicas apresentavam uma localização distante do nicho perivascular quando foram tratadas com GMI-1271 e IMB simultaneamente. Foi constatado ainda aumento na sobrevida, redução nos clones leucêmicos, prejuízo ao endereçamento das células-tronco leucêmicas na medula óssea e baço, e redução esplênica⁽⁸⁷⁾.

A reprogramação das funções celulares dos nichos pode ser ocasionada pela liberação pelas células neoplásicas de exossomos (vesículas de comunicação) contendo microRNAs e anfiregulina, que são direcionados às células estromais adjacentes^(88,91). A partir da transferência de miR-92a, há ativação da via de sinalização SRC, que induz a fosforilação de AKT e geração de sinais oncogênicos por *BCR::ABL1*. A secreção através de exossomos de anfiregulina eleva a adesão das células-tronco leucêmicas e

sobrevivência por ativação da via do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Também ocorre aumento na secreção de IL-8, que estimula as células endoteliais a aumentarem a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, consequentemente elevando a adesão das células-tronco leucêmicas na região endotelial ^(88,92).

A presença de áreas hipóxicas na medula óssea constitui regiões do microambiente favoráveis devido aos níveis aumentados de fatores indutores de hipóxia (HIF), que são importantes para a proliferação, quiescência, resistência aos ITQ e sobrevivência das células-tronco leucêmicas. Nas regiões medulares hipóxicas, é observado aumento na transformação das CTH em células-tronco leucêmicas. Logo, o microambiente hipóxico é favorável às células-tronco leucêmicas ^(88,93).

13 - CD44

13.1 – Estrutura molecular

CD44 corresponde a uma glicoproteína multiestrutural e multifuncional, que apresenta duas isoformas: CD44s (isoforma padrão) e CD44v (isoforma variante). O gene responsável pela codificação de CD44 está localizado no cromossomo 11p13. Esse gene apresenta dois conjuntos de éxons, sendo um constante e o outro variável. O conjunto constante compreende os éxons 1-5 e 16-20, que são processados em conjunto através de *splicing* e originam o transcrito, que resulta na isoforma CD44s. O conjunto de éxons variáveis compreende os éxons 6-15, que são processados de modo alternativo (*splicing* alternativo) e inseridos junto aos éxons do conjunto padrão, originando diferentes combinações de transcritos, que resultam na isoforma CD44v ^(94,95).

A estrutura gênica de CD44 está representada na **Figura 6** ⁽⁹⁶⁾.

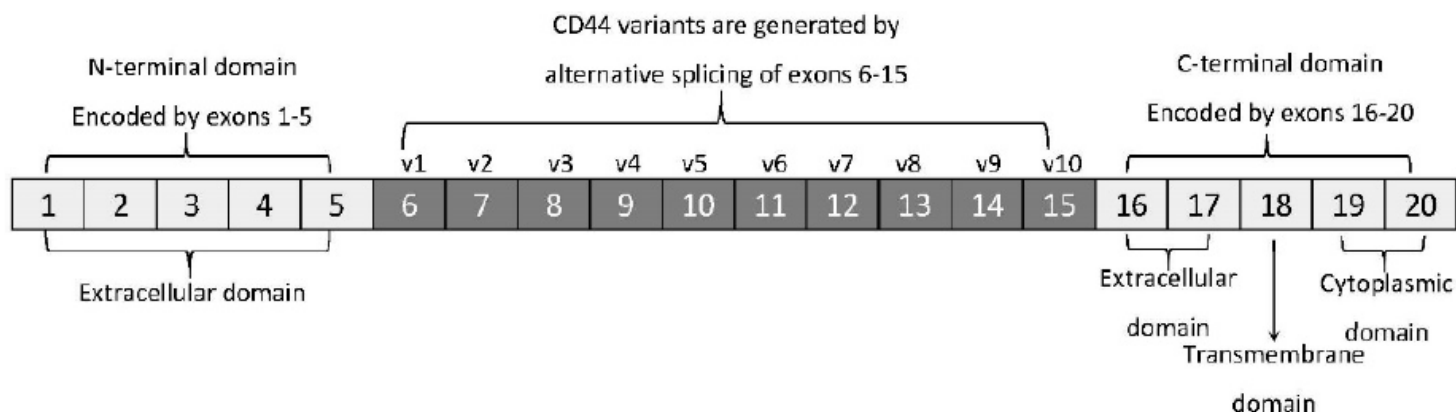


Figura 6: Estrutura gênica de CD44. A isoforma CD44s é codificada pelos éxons 1-5 e 16-20 enquanto que a isoforma variante (CD44v) sofre *splicing* alternativo envolvendo os éxons 6-15. Fonte: Szatanek et al. (2021).

É uma glicoproteína transmembrana com peso molecular de 80-100 kDa, localizada predominantemente na região extracelular. A porção carboxiterminal da proteína está localizada na região intracelular e interage com o citoesqueleto da célula através do domínio citoplasmático enquanto que a extremidade amino-terminal está localizada na região extracelular e interage com o microambiente incluindo o seu ligante mais específico: hialuronano (HA) ^(94,95).

A isoforma padrão (CD44s) é expressa em diversos tecidos como pele, fígado, pâncreas e pulmões. A isoforma variante (CD44v) apresenta uma distribuição restrita a queratinócitos, linfócitos ativados, macrófagos, estômago, bexiga e cervice uterina ^(94,95).

A estrutura molecular de CD44 em suas formas padrão (CD44s) e variante (CD44v) está representada na **Figura 7** ⁽⁹⁶⁾.

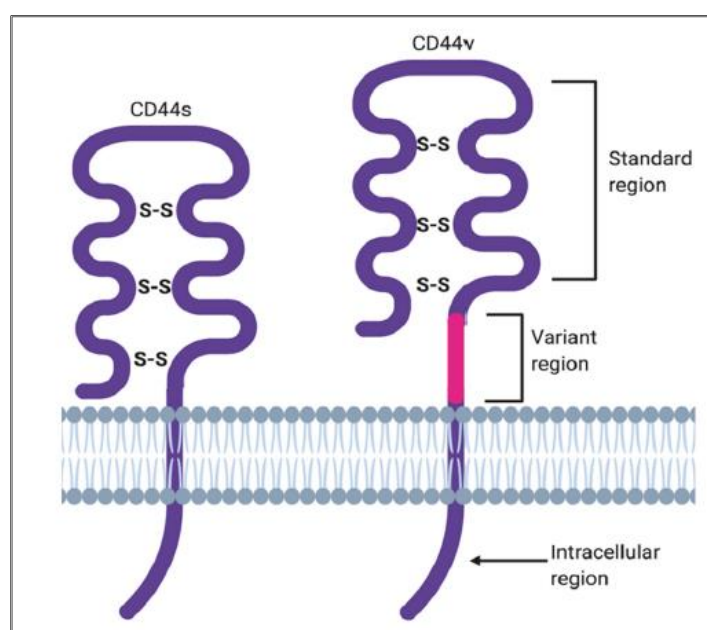


Figura 7: Estrutura molecular de CD44 em suas formas padrão (CD44s) e variante (CD44v). Fonte: Szatanek et al. (2021).

13.2 - Funções biológicas

CD44 apresenta múltiplas funções, que incluem adesão celular (agregação e migração), endereçamento e sinalização celulares. A justificativa para a multifuncionalidade proteica é o processamento alternativo do pré-RNA (*splicing* alternativo) juntamente com

modificações pós-traducionais nos sítios de ligação da proteína como fosforilação, glicosilação e adição de glicosaminoglicanos ^(94,96).

A principal função é relacionada à adesão, que permite a interação entre células ou entre célula e matriz extracelular. É característico o aumento na expressão de CD44 em linfócitos T ativados após contato antigênico. Nesse contexto, há a adesão de linfócitos T ao endotélio vascular por meio de seu ligante, HA, resultando desse modo em extravasamento linfocitário para os sítios de inflamação ^(94,96).

A função de endereçamento é executada por CD44 localizado na superfície de linfócitos visto que interage com a proteína adressina, presente nas vênulas de endotélio alto nas placas de Peyer, e direciona a migração dos linfócitos para os linfonodos ⁽⁹⁴⁾.

A sinalização celular mediada por CD44 é exemplificada a partir da emissão de sinais inicializadores de proliferação para as linhagens hematopoiéticas, contribuindo consequentemente para a mielopoiese e linfopoiese ⁽⁹⁴⁾. Foi demonstrado que o bloqueio de CD44s em camundongos inibe a linfopoiese a longo prazo em culturas de medula óssea e também inibe o endereçamento de linfócitos T precursores aos linfonodos e timo ⁽⁹⁷⁾.

Na medula óssea, o CD44 é altamente expresso nas CTH, especialmente naquelas localizadas no nicho osteoblástico, e em precursores eritroides, porém a expressão reduz à medida que ocorre o amadurecimento da linhagem. O CD44 promove regulação das CTH e do microambiente influenciando na composição da matriz extracelular, captura e liberação de citocinas/quimiocinas, ancoragem proteica ao citoesqueleto e consequente transdução de sinal, e degradação por clivagem proteolítica da matriz extracelular repercutindo dessa forma na adesão, endereçamento, migração e quiescência ⁽⁹⁷⁾.

O CD44s constitui o receptor mais comum de HA, sendo que atua no seu metabolismo através da síntese e degradação ⁽⁹⁷⁾. CD44 é importante para a manutenção das CTH no nicho osteoblástico, pois sintetizam e expressam HA. A expressão de HA associada à sua interação com CD44 e as CTH se correlaciona com a migração seletiva das CTH em direção ao nicho osteoblástico. Desse modo, CD44 e HA são importantes no endereçamento das CTH no microambiente medular ⁽⁹⁸⁾.

13.3 – CD44 nas neoplasias e na LMC

A interação entre CD44 e HA possibilita o desenvolvimento e crescimento tumorais. As células tumorais que expressam CD44 se relacionam com a matriz extracelular através

de seus ligantes como HA, fibronectina, osteopontina e colágeno, resultando em colonização eficaz. Acredita-se que a isoforma CD44s esteja envolvida com a ocorrência de invasão tumoral e metástases devido à função de adesão à matriz extracelular ⁽⁹⁴⁾. A ligação entre CD44 e HA promove ativação de vias de sinalização como PI3 kinase-AKT, resultando em invasão tumoral, proliferação e quimiorresistência. Dessa forma, a inibição farmacológica de CD44 tem sido relacionada ao aumento da sensibilidade à quimioterapia nas células tumorais ⁽⁹⁹⁾.

Os carcinomas que se originam em epitélios contendo CD44v na superfície, em geral, mantém a sua expressão inclusive em altas concentrações, porém os achados apresentam variações como por exemplo nos carcinomas escamosos pulmonares, que expressam CD44 enquanto que nos demais tipos histológicos a expressão é baixa ou ausente. Em carcinomas pancreáticos foi observada a presença da variante CD44 v6, que também é encontrada no epitélio ductal pancreático habitual. A mesma variante também é observada nos carcinomas colorretais. A expressão em sarcomas também é variável visto que no sarcoma epitelióide e angiossarcoma há alta expressão de CD44 enquanto que no lipossarcoma e sarcoma de células claras a expressão é baixa ⁽⁹⁴⁾.

As células neoplásicas no câncer de mama expressam CD44s e CD44v, que foram relacionados ao aumento da capacidade de progressão de doença e potencial metastático. A colocalização de CD44 e HA nos sinusoides da medula óssea, que correspondem a um sítio de metástase para o câncer de mama, pode estar relacionada à ocorrência de metástases ósseas. Logo, a interação CD44-HA sugere um potencial alvo terapêutico para redução das metástases ósseas ⁽⁹⁵⁾.

Na LMC, a inibição de E-selectina resulta em ausência de adesão e aumento da expressão do produto do protooncogene *SCL/TAL1* nas células leucêmicas. Esse gene é um regulador transcricional negativo da expressão de CD44 de modo que a superexpressão gênica resulta em aumento de sobrevivência. A proteína SCL-TAL1 é um alvo indireto de fosforilação por *BCR::ABL1* ⁽⁸⁹⁾. Foi demonstrado por Godovarthi et al. (2020) que as células leucêmicas apresentam elevada quantidade de CD44 em comparação às células saudáveis e quando as células *BCR::ABL1* foram tratadas com o inibidor de E-selectina (GMI-1271) isolado ou associado ao IMB houve um aumento de células nas fases G2-S-M do ciclo celular e decréscimo nas células na fase G0, logo as células tratadas entraram no ciclo celular. Aliado a esse fato, foi observado aumento na ciclina promotora do ciclo celular CDK6 e diminuição na expressão do inibidor do ciclo,

p16. Além disso, a proteína SCL-TAL1 foi fosforilada por *BCR::ABL1* através da via AKT com consequente redução na expressão de CD44, diminuição da adesão ao nicho perivascular e entrada no ciclo celular ⁽⁸⁷⁾. Foi observada alta expressão de CD44 em células com a mutação T315I, correlacionando-se com aumento na ligação à E-selectina e maior quantidade de células aderentes à matriz na fase G0. Os achados sugerem, portanto, que a elevada expressão de CD44 e aumento da ligação à E-selectina podem contribuir para a quiescência das células-tronco leucêmicas e resistência aos ITQ ⁽⁸⁹⁾.

14. Hialuronano

14.1 – Estrutura molecular

O hialuronano ou ácido hialurônico (HA) é um componente abundante da matriz extracelular, correspondendo a um polissacarídeo não sulfatado, pertencente aos glicosaminoglicanos, que são constituídos por unidades repetidas de dissacarídeos. O HA é originado a partir de repetições de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina com formação de ligações glicosídicas alternadas ^(94,95,100).

A estrutura do HA está representada na **Figura 8** ⁽¹⁰⁰⁾.

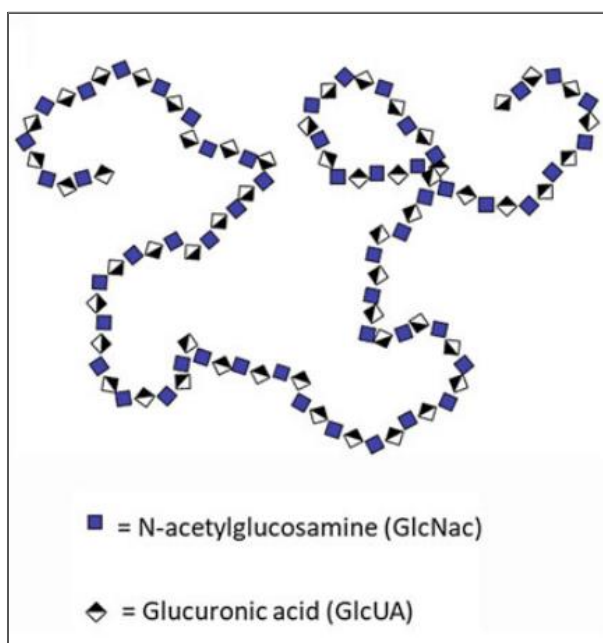


Figura 8: Representação esquemática do HA constituído por unidades dissacarídicas repetidas de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina. Fonte: Passi et al. (2019).

14.2 – Funções biológicas

A função biológica depende do seu peso molecular. Em seu estado conformacional nativo, apresenta peso molecular em torno de 1.000 kDa, exibindo atividades antiangiogênicas, antiinflamatórias e de inibição proliferativa. Há uma apresentação conformacional alternativa em que possui peso molecular abaixo de 500 kDa. Nessa forma exibe atividade angiogênica e proliferativa além de estimular a migração celular e resposta imune ^(95,96).

Ao contrário dos demais glicosaminoglicanos, é sintetizado por três hialuronano sintases (HAS1, HAS2 e HAS3) na porção interna da membrana plasmática e não no complexo de Golgi. Posteriormente, é secretado para o meio extracelular, onde contribui para a organização tissular e processos importantes como migração, proliferação e sobrevivência celulares ⁽⁹⁶⁾.

As formas com diferentes pesos moleculares apresentam atividade diferencial na velocidade de síntese e no tamanho da proteína produzida, sendo que as isoformas de hialuronano sintase 1 e 2 (HAS1 e HAS2) produzem HAs com pesos moleculares maiores do que HAS3 ^(101,102). Existem diversos receptores que reconhecem o HA em suas diferentes conformações com pesos moleculares distintos de modo que o CD44, tanto na sua forma padrão quanto na variante, é o principal ligante ⁽⁹⁶⁾.

Na medula óssea, o HA é importante para o microambiente, pois está relacionado ao endereçamento das CTH no nicho osteoblástico assim como à proliferação e diferenciação das CTH ⁽⁹⁷⁾. É capaz de estimular diretamente a produção de citocinas pelas células hematopoiéticas, sendo dessa forma uma relevante molécula indutora de sinais para a hematopoiese. Goncharova et al. (2012) evidenciaram que a inibição de HA na medula óssea resulta em descréscimo na hematopoiese e redução na capacidade do microambiente de recrutar CTH. Os achados demonstram um papel regulatório importante do HA como um componente biologicamente ativo e integral do microambiente hematopoiético ⁽¹⁰³⁾.

14.3 – Hialuronano nas neoplasias e na LMC

O HA é abundantemente produzido por células neoplásicas e estromais contribuindo para o crescimento de tumores em diversos órgãos como bexiga, mama, próstata e intestino. As funções que favorecem a progressão e manutenção tumorais compreendem

estímulos à proliferação celular, adesão celular e proteção contra a ação do sistema imune⁽⁹⁶⁾. O HA de baixo peso molecular é frequentemente encontrado nas malignidades e a mudança da forma de alto peso molecular para a forma de baixo peso molecular está associada com progressão tumoral. Logo, pode ser um possível alvo terapêutico nas neoplasias malignas⁽¹⁰¹⁾.

No câncer de mama, os macrófagos demonstram migração preferencial em direção a estruturas estromais ricas em HA. A partir da interação entre HA e CD44 ocorre modificação no metabolismo tumoral devido à produção do fator indutor de hipóxia 1 α (HIF1 α), que se liga ao DNA nuclear para aumentar a glicólise com consequente mudança metabólica nas células neoplásicas⁽⁹⁶⁾. No carcinoma escamoso de esôfago e adenocarcinoma prostático, a interação de HA com RHAMM (*hyaluronic acid-mediated motility*), outro receptor de HA, proporciona aumento da proliferação celular e invasividade⁽¹⁰¹⁾.

Na leucemia linfocítica crônica, a ligação de CD44 e HA gera proteção contra apoptose. Foi observado aumento significativo nos níveis séricos de HA em casos de leucemia de células T do adulto e LMA sendo que no período pós-tratamento havia normalização dos níveis séricos enquanto que na recidiva os níveis sofriam elevação novamente⁽¹⁰¹⁾. Pouco se sabe a respeito da influência das três isoformas de hialuronano sintase na progressão e desenvolvimento de leucemia. Postula-se que a desregulação da atividade enzimática das isoformas possa interferir na natureza qualitativa e quantitativa do HA sintetizado nas células leucêmicas, ocasionando impacto no crescimento e sobrevivência tumorais⁽¹⁰²⁾.

Estudos tentam demonstrar a associação entre o HA e quimiorresistência com ênfase em sua síntese. Foi demonstrado que o 4-MU (*4-methylumbelliferone*), um inibidor da síntese de HA, reduziu o crescimento de muitos tumores sólidos como melanoma, hepatocarcinoma, osteossarcoma e carcinoma de mama e próstata⁽¹⁰¹⁾.

Uchakina et al. (2016) constataram que o tratamento de linhagens de LMC com 4-MU proporciona redução na produção de HA e aumento na apoptose⁽¹⁰²⁾. Posteriormente, complementaram os achados através da demonstração do efeito sinérgico do tratamento com doxorrubicina, um agente quimioterápico, e 4-MU provocando redução nos níveis de HA, pela inibição gerada por 4-MU, e aumento na apoptose. Desse modo, comprovaram que o tratamento com 4-MU, na LMC, aumenta a sensibilidade à quimioterapia em virtude do descréscimo da resistência à apoptose mediada pelo HA.

Logo, inibidores da síntese de HA como 4-MU são ferramentas potenciais para promover a atenuação dos seus efeitos protetores e sensibilização à quimioterapia ⁽¹⁰¹⁾.

15. Conclusão

Portanto, apesar dos avanços na terapêutica da LMC, há mecanismos que ocasionam resistência intrínseca e adquirida, gerando remissão e progressão de doença ⁽⁸⁸⁾. Atualmente, estuda-se a utilização da terapia combinada de ITQ com outros alvos presentes na matriz extracelular com o objetivo de aprimorar o tratamento e evitar a recidiva. CD44 e HA constituem potenciais alvos terapêuticos com resultados promissores até o momento ^(89,95,101).

Referências

1. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2024 Aug 2;99(11). doi: 10.1002/ajh.27443.
2. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2015;385(9976):1447–59. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62120-0.
3. Sampaio MM, Santos MLC, Marques HS, Gonçalves VL de S, Araújo GRL, Lopes LW, et al. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World J Clin Oncol*. 2021 Feb 24;12(2):69–94. doi: 10.5306/wjco.v12.i2.69.
4. Goldman JM. Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. *Semin Hematol*. 2010 Oct;47(4):302–11. doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.07.001.
5. Goldman JM, Daley GQ. Chronic Myeloid Leukemia — A Brief History. In: Melo JV, Goldman JM. *Myeloproliferative Disorders*. 1st ed. Heidelberg: Springer; 2007. p.1-13. doi: 10.1007/978-3-540-34506-0_1.
6. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(1):6–13. doi: 10.1016/j.leukres.2011.09.028.
7. Chandra HS, Heisterkamp NC, Hungerford A, Morrissette JJ, Nowell PC, Rowley JD, et al (2011). Philadelphia Chromosome Symposium: commemoration of the 50th anniversary of the discovery of the Ph chromosome. *Cancer Genet*. 2011;204(4):171–9. doi: 10.1016/j.cancergen.2011.03.002.
8. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicina*. 23^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
9. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa [Internet]. Brasília: INCA; 2022 [citado 15 Nov 2024]. Disponível em <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>.
10. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2022 Jul 6;97(9):1236–1256. doi: 10.1002/ajh.26642.
11. WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours*. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024.

12. Lopes AC. Tratado de clínica médica. 2 ed. São Paulo: Roca; 2009.
13. Osman AEG, Deininger MW. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev.* 2021 Mar;49:100825. doi: 10.1016/j.blre.2021.100825.
14. Rinaldi I, Winston, K. Chronic Myeloid Leukemia, from Pathophysiology to Treatment-Free Remission: A Narrative Literature Review. *J Blood Med.* 2023;14:261–77. doi: 10.2147/JBM.S382090.
15. Amarante-Mendes GP, Rana A, Datoguia TS, Hamerschlag N, Brumatti G. BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Pharmaceutics.* 2022;14(1):215. doi: 10.3390/pharmaceutics14010215.
16. Benchikh S, Bousfiha A, El Hamouchi A, Soro SG, Malki A, Nassereddine S. Chronic myeloid leukemia: Cytogenetics and molecular biology's part in the comprehension and management of the pathology and treatment evolution. *Egypt J Med Hum Genet.* 2022;23(1). doi: 10.1186/s43042-022-00248-2.
17. Poudel G, Tolland MG, Hughes TP, Pagani IS. Mechanisms of Resistance and Implications for Treatment Strategies in Chronic Myeloid Leukaemia. *Cancers.* 2022;14(14):3300. doi: 10.3390/cancers14143300.
18. Cross NCP, Ernst T, Branford S, Cayuela JM, Deininger M, Fabarius A, et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2023;37(11):2150–2167. doi: 10.1038/s41375-023-02048-y.
19. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica.* 2016;101(5):541–58. doi: 10.3324/haematol.2015.139337.
20. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;113(8):1619–30. doi: 10.1182/blood-2008-03-144790.
21. Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. *Genes Cancer.* 2012;3(5-6):436-46. doi: 10.1177/1947601912458584.

22. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18(3): 545–viii. doi: 10.1016/j.hoc.2004.03.008.
23. He Y, Wertheim JA, Xu L, Miller JP, Karnell FG, Choi JK, et al. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood.* 2002;99(8):2957–68. doi: 10.1182/blood.v99.8.2957.
24. Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol Cell.* 2003;12(1):27–37. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00274-0.
25. Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol.* 2002;9(2): 117–120. doi: 10.1038/nsb747.
26. Ankathil R, Ismail SM, Mohd Yunus N, Sulong S, Husin A, Abdullah AD, et al. Clinical implications of conventional cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH) and molecular testing in chronic myeloid leukaemia patients in the tyrosine kinase inhibitor era - A review. *Malays J Pathol.* 2020;42(3):307–21.
27. Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, Hopcroft L, Wheadon H, Whetton AD, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood.* 2014;124(9):1492–501. doi: 10.1182/blood-2013-12-545640.
28. Toker A, Marmioli, S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv Biol Regul.* 2014;55:28–38. doi: 10.1016/j.jbior.2014.04.001.
29. Menssen A, Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(9):6274–279. doi: 10.1073/pnas.082005599.
30. Gregor T, Bosakova MK, Nita A, Abraham SP, Faflek B, Cernohorsky NH, et al. Elucidation of protein interactions necessary for the maintenance of the BCR-ABL signaling complex. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(19):3885–903. doi: 10.1007/s00018-019-03397-7.

31. Molica M, Massaro F, Breccia M. Diagnostic and prognostic cytogenetics of chronic myeloid leukaemia: an update. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(11):1001–8. doi: 10.1080/14737159.2017.1383156.
32. Crisan AM, Coriu D, Arion C, Colita A, Jordan C. The impact of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis and during therapy with tyrosine kinase inhibitors in Chronic Myeloid Leukaemia. *J Med Life.* 2015;8(4):502–8.
33. Guilhot F. Cytogenetics in CML: more important than you think. *Blood.* 2016;127(22):2661–2. doi: 10.1182/blood-2016-04-708206.
34. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood.* 2011;118(26):6760–8. doi: 10.1182/blood-2011-08-373902.
35. Gianelli U, Thiele J, Orazi A, Gangat N, Vannucchi AM, Tefferi A, et al. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Arch.* 2023;482(1):53–68. doi: 10.1007/s00428-022-03480-8.
36. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon FX, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_4):iv41–iv51. doi: 10.1093/annonc/mdx219.
37. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Bone marrow pathology. 5th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2019.
38. Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L. Hematopathology. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
39. Lorand-Metze I, Vassallo J, Souza CA. Histological and cytological heterogeneity of bone marrow in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia at diagnosis. *Brit J Haematol.* 1987;67(1):45–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.1987.tb02294.x.
40. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood.* 2022;140(11):1200–28. doi: 10.1182/blood.2022015850.

41. Tovar-Bobadilla JL, Ortiz-Hidalgo C. Utilidad de la biopsia de Médula Ósea (MO) en el diagnóstico de las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) [Utility of bone marrow biopsy in the diagnosis of myeloproliferative neoplasm]. *Gac Med de Mex.* 2016;152(3):407–18.
42. Pfirrmann M, Clark RE, Prejzner W, Lauseker M, Baccarani M, Saussele S, et al. The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(8):2138–49. doi: 10.1038/s41375-020-0931-9.
43. Zhang XS, Gale RP, Huang XJ, Jiang Q. Is the Sokal or EUTOS long-term survival (ELTS) score a better predictor of responses and outcomes in persons with chronic myeloid leukemia receiving tyrosine-kinase inhibitors? *Leukemia.* 2021;36(2):482–91. doi: 10.1038/s41375-021-01387-y.
44. Amir M, Javed S. A Review on the Therapeutic Role of TKIs in Case of CML in Combination With Epigenetic Drugs. *Front Genet.* 2021;12:742802. doi: 10.3389/fgene.2021.742802.
45. Rinaldi I, Winston K. Chronic Myeloid Leukemia, from Pathophysiology to Treatment-Free Remission: A Narrative Literature Review. *J Blood Med.* 2023;14: 261–77. doi: 10.2147/JBM.S382090.
46. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(4): 966–84. doi: 10.1038/s41375-020-0776-2.
47. Mughal, TI. Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: beyond the imatinib era. *Front Biosci.* 2006;11(1):209. doi: 10.2741/1792.
48. Deininger MW. Diagnosing and managing advanced chronic myeloid leukemia. American Society of Clinical Oncology educational book. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015:e381–8. doi: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.e381.
49. Zaker E, Nouri N, Sorkhizadeh S, Ghasemirad H, Hajijafari AH, Zare F. The importance of personalized medicine in chronic myeloid leukemia management: A narrative review. *Egypt J Med Hum Genet.* 2023;24(1). doi: 10.1186/s43042-023-00411-3.

50. Sauße S, Silver RT. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann Hematol.* 2015;94(Suppl 2):S159–S165. doi: 10.1007/s00277-015-2324-0.
51. Deangelo DJ. Managing chronic myeloid leukemia patients intolerant to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood Cancer J.* 2012;2(10):e95. doi: 10.1038/bcj.2012.30.
52. Patel AB, O'Hare T, Deininger MW. Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(4):589–612. doi: 10.1016/j.hoc.2017.04.007.
53. Sun J, Hu R, Han M, Tan Y, Xie M, Gao S, et al. Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Int J Biol Sci.* 2024;20(1):175–81. doi: 10.7150/ijbs.86305.
54. Kantarjian HM, Welch MA, Jabbour E. Revisiting six established practices in the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2023;10(10):e860–e864. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00164-3.
55. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(2):191–204. doi: 10.1089/ars.2017.7419.
56. Khattab S, El Sorady M, El-Ghandour A, Visani G, Piccaluga PP. Hematopoietic and leukemic stem cells homeostasis: the role of bone marrow niche. *Explor Target Antitumor Ther.* 2024;5(5):1027–1055. doi: 10.37349/etat.2024.00262.
57. Le PM, Andreeff M, Battula VL. Osteogenic niche in the regulation of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Haematologica.* 2018;103(12):1945–55. doi: 10.3324/haematol.2018.197004.
58. Comazzetto S, Shen B, Morrison SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell.* 2021;56(13):1848–60. doi: 10.1016/j.devcel.2021.05.018.
59. Fröbel J, Landspersky T, Percin G, Schreck C, Rahmig S, Ori A, et al. The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:705410. doi: 10.3389/fcell.2021.705410.

60. Krause DS, Scadden DT. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(11):1376–87. doi: 10.3324/haematol.2014.113852.
61. Haltalli MLR, Watcham S, Wilson NK, Eilers K, Lipien A, Ang H, et al. Manipulating niche composition limits damage to haematopoietic stem cells during *Plasmodium* infection. *Nat Cell Biol*. 2020;22(12):1399–410. doi: 10.1038/s41556-020-00601-w.
62. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra, CN, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571): 126–30. doi: 10.1038/nature15250.
63. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014;20(11): 1315–20. doi: 10.1038/nm.3707.
64. Golan K, Kumari A, Kollet O, Khatib-Massalha E, Subramaniam MD, Ferreira ZS, et al. Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem cell*. 2018;23(4):572–585.e7. doi: 10.1016/j.stem.2018.08.002.
65. Mehrzadi S, Safa M, Kamrava SK, Darabi R, Hayat P, Motevalian M. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen-peroxide-induced toxicity in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(7):773–86. doi: 10.1139/cjpp-2016-0409.
66. Prendergast ÁM, Kuck A, van Essen M, Haas S, Blaszkiewicz S, Essers MA. IFN α -mediated remodeling of endothelial cells in the bone marrow niche. *Haematologica*. 2017;102(3):445–53. doi: 10.3324/haematol.2016.151209.
67. Takizawa H, Fritsch K, Kovtonyuk LV, Saito Y, Yakkala C, Jacobs K, et al. Pathogen-Induced TLR4-TRIF Innate Immune Signaling in Hematopoietic Stem Cells Promotes Proliferation but Reduces Competitive Fitness. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):225–240.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.06.013.
68. Abbuehl JP, Tatarova Z, Held W, Huelsken J. Long-Term Engraftment of Primary Bone Marrow Stromal Cells Repairs Niche Damage and Improves Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):241–255.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.004.

69. Marino R, Otsuru S, Hofmann TJ, Olson TS, Rasini V, Veronesi E, et al. Delayed marrow infusion in mice enhances hematopoietic and osteopoietic engraftment by facilitating transient expansion of the osteoblastic niche. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(11):1566–73. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.07.025.
70. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res*. 2013;37(2):214–20. doi: 10.1016/j.leukres.2012.10.020.
71. Wacławiczek A, Hamilton A, Rouault-Pierre K, Abarrategi A, Albornoz MG, Miraki-Moud F, et al. Mesenchymal niche remodeling impairs hematopoiesis via stanniocalcin 1 in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2020;130(6):3038–50. doi: 10.1172/JCI133187.
72. Sánchez-Aguilera A, Arranz L, Martín-Pérez D, García-García A, Stavropoulou V, Kubovcakova L, et al. Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2014;15(6):791–804. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.002.
73. Gnani D, Crippa S, Della Volpe L, Rossella V, Conti A, Lettera E, et al. An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell*. 2019;18(3):e12933. doi: 10.1111/accel.12933.
74. Ruf F, Schreck C, Wagner A, Grziwok S, Pagel C, Romero S, et al. Loss of Sfrp2 in the Niche Amplifies Stress-Induced Cellular Responses, and Impairs the In Vivo Regeneration of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Stem Cells*. 2016;34(9):2381–92. doi: 10.1002/stem.2416.
75. Schreck C, Istvánffy R, Ziegenhain C, Sippenauer T, Ruf F, Henkel L, et al. Niche WNT5A regulates the actin cytoskeleton during regeneration of hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2017;214(1):165–81. doi: 10.1084/jem.20151414.
76. Dolinska M, Cai H, Månsson A, Shen J, Xiao P, Boudierlique T, et al. Characterization of the bone marrow niche in patients with chronic myeloid leukemia identifies CXCL14 as a new therapeutic option. *Blood*. 2023;142(1): 73–89. doi: 10.1182/blood.2022016896.

77. Polzer K, Joosten L, Gasser J, Distler JH, Ruiz G, Baum W, et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):284–90. doi: 10.1136/ard.2008.104786.
78. Krause DS, Fulzele K, Catic A, Sun CC, Dombkowski D, Hurley MP, et al. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nat Med*. 2013;19(11):1513–17. doi: 10.1038/nm.3364.
79. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem cell*. 2014;14(6):824–37. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.014.
80. Sun T, Ju M, Dai X, Dong H, Gu W, Gao Y, et al. Multilevel defects in the hematopoietic niche in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2020;105(3):661–73. doi: 10.3324/haematol.2018.213686.
81. Duarte D, Hawkins ED, Akinduro O, Ang H, De Filippo K, Kong IY, et al. Inhibition of Endosteal Vascular Niche Remodeling Rescues Hematopoietic Stem Cell Loss in AML. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1): 64–77.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.11.006.
82. Passaro D, Abarrategi A, Foster K, Ariza-McNaughton L, Bonnet D. Bioengineering of Humanized Bone Marrow Microenvironments in Mouse and Their Visualization by Live Imaging. *J Visual Exp*. 2017;(126):55914. doi: 10.3791/55914.
83. Kleppe M, Koche R, Zou L, van Galen P, Hill CE, Dong L, et al. Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell*. 2018;33(1):29–43.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.009.
84. Gao X, Wan Z, Wei M, Dong Y, Zhao Y, Chen X, et al. Chronic myelogenous leukemia cells remodel the bone marrow niche via exosome-mediated transfer of miR-320. *Theranostics*. 2019;9(19):5642–56. doi: 10.7150/thno.34813.
85. Agarwal P, Isringhausen S, Li H, Paterson AJ, He J, Gomariz Á. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2019;24(5):769–784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.018.

86. Agarwal P, Li H, Choi K, Hueneman K, He J, Welner RS, et al. TNF- α -induced alterations in stromal progenitors enhance leukemic stem cell growth via CXCR2 signaling. *Cell Rep.* 2021;36(2):109386. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109386.
87. Mitchell R, Copland M. Defining niche interactions to target chronic myeloid leukemia stem cells. *Haematologica.* 2020;105(1):2–4. doi: 10.3324/haematol.2019.234898.
88. Mojtabehi H, Yazdanpanah N, Rezaei N. Chronic myeloid leukemia stem cells: targeting therapeutic implications. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):603. doi: 10.1186/s13287-021-02659-1.
89. Zhang B, Ho YW, Huang Q, Maeda T, Lin A, Lee SU, et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2012;21(4):577–92. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.018.
90. Godavarthy PS, Kumar R, Herkt SC, Pereira RS, Hayduk N, Weissenberger ES, et al. The vascular bone marrow niche influences outcome in chronic myeloid leukemia *via* the E-selectin - SCL/TAL1 - CD44 axis. *Haematologica.* 2020;105(1):136–47. doi: 10.3324/haematol.2018.212365.
91. Jurj A, Pasca S, Teodorescu P, Tomuleasa C, Berindan-Neagoe I. Basic knowledge on BCR-ABL1-positive extracellular vesicles. *Biomark Med.* 2020;14(6):451–8. doi: 10.2217/bmm-2019-0510.
92. Corrado C, Saieva L, Raimondo S, Santoro A, De Leo G, Alessandro R. Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med.* 2016;20(10):1829–39. doi: 10.1111/jcmm.12873.
93. Ng KP, Manjeri A, Lee KL, Huang W, Tan SY, Chuah CT, et al. Physiologic hypoxia promotes maintenance of CML stem cells despite effective BCR-ABL1 inhibition. *Blood.* 2014;123(21):3316–26. doi: 10.1182/blood-2013-07-511907.
94. Mishra MN, Chandavarkar V, Sharma R, Bhargava D. Structure, function and role of CD44 in neoplasia. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(2):267–72. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_246_18.

95. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.
96. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M. CD44 and Tumor-Derived Extracellular Vesicles (TEVs). Possible Gateway to Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1463. doi: 10.3390/ijms22031463.
97. Cao H, Heazlewood SY, Williams B, Cardozo D, Nigro J, Oteiza A, et al. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica.* 2016;101(1):26–37. doi: 10.3324/haematol.2015.135921.
98. Prabhu Thirupathi RS. The Contribution of Hematopoietic Stem / Progenitor Cell and Bone Marrow Stroma Cell Cd44v6 and Cd44v7 to Hematopoiesis. *J Stem Cell Res Ther.* 2015;05(07). doi: 10.4172/2157-7633.1000295.
99. Yaghobi Z, Movassaghpour A, Talebi M, Abdoli Shadbad M, Hajiasgharzadeh K, Pourvahdani S, et al. The role of CD44 in cancer chemoresistance: A concise review. *Eur J Pharmacol.* 2021;903:174147. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174147.
100. Pass A, Vigetti D. Hyaluronan: Structure, Metabolism, and Biological Properties. In: Cohen E, Merzendorfer H, editors. *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices.* 1st ed. Springer Cham; 2019. p. 155–86. doi: 10.1007/978-3-030-12919-4_4.
101. Uchakina ON, Ban H, Hostetler BJ, McKallip RJ. Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin. *Glycobiology.* 2016;26(11):1171–79. doi: 10.1093/glycob/cww064.
102. Uchakina ON, Ban H, McKallip, RJ. Targeting hyaluronic acid production for the treatment of leukemia: treatment with 4-methylumbelliferone leads to induction of MAPK-mediated apoptosis in K562 leukemia. *Leuk Res.* 2013;37(10):1294–301. doi: 10.1016/j.leukres.2013.07.009.
103. Goncharova V, Seroby N, Iizuka S, Schraufstatter I, Ridder A, Povaliy T, et al. Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis. *J Biol Chem.* 2012;287(30):25419–25433. doi: 10.1074/jbc.M112.376699.

Artigo Científico

Manuscrito a ser submetido no periódico *Leukemia Research* (Fator de impacto: 2.1).

Estudo da matriz na Leucemia Mieloide Crônica: Análise da expressão do Hialuronano (HA), das enzimas hialuronano sintases e do CD44 para predição de casos resistentes ao Imatinibe (IMB)

Thiago Henrique Meinicke Vieira¹, Lucas Tadeu Bidinotto², Maria Aparecida Custódio Domingues¹

¹*Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, São Paulo, Brasil*

²*Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr Paulo Prata – FACISB, São Paulo, Brasil*

Resumo

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa clonal caracterizada pela expansão do setor mieloide a partir da célula-tronco pluripotente. Foi a primeira doença associada a uma anormalidade citogenética através da identificação do cromossomo Philadelphia, originado a partir da t(9;22)(q34;q11.2). O desenvolvimento dos inibidores de tirosina quinase como Imatinibe (IMB) revolucionou a história natural da LMC, contudo 10-15% dos pacientes apresentam resistência à terapia. O estudo analisou as características morfológicas e a expressão imuno-histoquímica de hialuronano, das hialuronano sintases (HAS1, HAS2 e HAS3) e de CD44 em biópsias de medula óssea de LMC resistente, não resistente e intolerante ao IMB para elucidação da patogenia da LMC a partir da compreensão do papel do remodelamento dos nichos da medula óssea, com possibilidade de identificação de fatores preditores do risco de evolução para resistência. A análise morfológica identificou que a presença de quantidade moderada de micromegacariócitos pode corresponder a um fator protetor contra a resistência. Na análise imuno-histoquímica, houve intensa expressão de CD44 no grupo resistente em fase crônica em comparação com grupo não resistente em que a intensidade de expressão é baixa. Foi identificada perda de expressão de HAS2 celular nos nichos perivascular e peritrabecular na LMC resistente juntamente com ausência de expressão estromal. A análise de CD44 e HAS2 em biópsias de medula óssea por exame imuno-histoquímico no momento do diagnóstico de LMC pode constituir uma abordagem eficaz na identificação de casos que evoluirão com resistência, evitando o impacto socioeconômico negativo que a quimiorresistência acarreta.

Palavras chave: LMC, resistência, medula óssea, nicho, CD44, hialuronano, hialuronano sintases, remodelamento.

1. Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) corresponde a uma neoplasia mieloproliferativa crônica maligna em que há a expansão clonal da célula-tronco hematopoiética pluripotente. Foi a primeira doença relacionada a uma anormalidade citogenética, caracterizada pela translocação $t(9;22)(q34;q11.2)$, que origina o cromossomo Philadelphia e o gene de fusão *BCR::ABL1* com atividade constitutiva de tirosina quinase ^(1,2).

O diagnóstico da LMC consiste na identificação citogenética do cromossomo Philadelphia e molecular do transcrito *BCR::ABL1* ⁽¹⁾. A avaliação histopatológica da medula óssea, que na fase crônica evidencia hipercelularidade global e acentuada hiperplasia granulocítica com manutenção da diferenciação, constitui importante ferramenta para o diagnóstico e reavaliação em situações de falha terapêutica/ recidiva visto que possibilita a identificação da fase da doença, contagem de blastos e avaliação de mielofibrose ⁽³⁻⁵⁾.

O tratamento com os inibidores de tirosina quinase (ITQ) revolucionou a história da LMC, contudo em 10-15% dos casos há desenvolvimento de resistência ao Imatinibe (IMB), droga alvo utilizada como primeira linha de tratamento ⁽⁶⁾. A intolerância à terapia ocorre na presença de efeitos colaterais que não podem ser manejados a partir da redução da dose do medicamento ou tratamento dos sintomas, resultando em interrupção do tratamento atual e substituição por outro ITQ ⁽⁷⁾. Em decorrência da ausência de erradicação das células-tronco leucêmicas há recidiva e persistência da doença. Acredita-se que um dos motivos para a persistência dessas células seja devido aos nichos medulares funcionalmente alterados, que conferem proteção às células-tronco leucêmicas ^(8,9).

Em 1978, Ray Schofield estabeleceu que o microambiente local da medula óssea, denominado de nicho, é responsável pelo controle da quiescência e entrada das células-tronco hematopoiéticas (CTH) no ciclo celular ao fornecer informações a respeito do estado funcional do organismo e, conseqüentemente, definindo o destino das CTH em direção à autorrenovação ou diferenciação ⁽¹⁰⁾. São descritos dois nichos: osteoblástico (endosteal) e perivascular. As CTH estão presentes em ambos os nichos de modo que são reguladas funcionalmente por mecanismos distintos. O nicho endosteal está localizado ao

redor da superfície óssea, sendo habitado por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células estromais mesenquimais e células T reguladoras ao passo que no nicho perivascular são encontradas células endoteliais sinusoidais, pericitos e células de Schwann não mielinizadas ^(11,12).

A transformação maligna ocasionada pela desregulação dos nichos é um processo gradual aliado à produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que como resultado promovem mielopoiese às custas da manutenção das CTH ⁽⁸⁾. O remodelamento dos nichos proporciona aporte às células-tronco leucêmicas, contribuindo dessa forma com a sua manutenção. Paralelamente, o microambiente medular se torna hostil para as CTH normais ^(8,9).

Atualmente, estuda-se a utilização da terapia combinada de ITQ com outros alvos presentes na matriz extracelular com o objetivo de aprimorar o tratamento e evitar a recidiva. CD44 corresponde a uma glicoproteína transmembrana multifuncional, que na medula óssea promove a regulação das CTH e do microambiente influenciando na composição da matriz extracelular ⁽¹³⁾. Hialuronano (HA) constitui um glicosaminoglicano abundante na matriz extracelular e principal ligante de CD44. É sintetizado por três hialuronano sintases (HAS1, HAS2, HAS3), sendo que as isoformas HAS1 e HAS2 produzem HAs com pesos moleculares maiores do que HAS3 ^(14,15). É importante para o microambiente, pois está relacionado ao endereçamento das CTH no nicho osteoblástico assim como à proliferação e diferenciação das CTH ⁽¹³⁾. CD44 e HA constituem potenciais alvos terapêuticos com resultados promissores até o momento ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Há múltiplos fatores que contribuem para o desenvolvimento da quimiorresistência, sendo a matriz extracelular um componente chave do microambiente tumoral com participação no remodelamento dos nichos da medula óssea. Este trabalho propõe identificar fatores preditores do risco de evolução para resistência ao IMB e, consequentemente, demonstrar a relevância da expressão do CD44, do componente de matriz extracelular HA e suas enzimas correspondentes (hialuronano sintases) nos casos resistentes, a correlação com o remodelamento dos nichos e potenciais alvos terapêuticos.

2. Materiais e métodos

2.1 Delineamento do estudo e casuística:

Foram selecionados 161 pacientes com diagnóstico prévio de LMC, sendo 112 provenientes do Hospital de Amor de Barretos (HAB), 42 provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB-UNESP) e 7 provenientes do Hospital de Amor Amazônia (HAA) no período de 2000 a 2023. Em todos os casos selecionados havia confirmação molecular de LMC através dos exames de citogenética (cariótipo) e biologia molecular (reação em cadeia da polimerase - PCR).

Foi realizada revisão dos prontuários de todos os casos para coleta de informações epidemiológicas e clínico-evolutivas, que consistiram em: sexo, idade atual, idade ao diagnóstico de LMC, presença ou ausência de resistência/ intolerância ao tratamento com os ITQ, classificação da resistência em primária e secundária, perda de resposta (hematológica, citogenética e/ou molecular), tipo de tratamento realizado, evolução para fases subsequentes da doença, óbito, tempo decorrido do óbito após o diagnóstico de LMC, idade ao óbito.

A partir dos dados coletados, foi realizada a distribuição dos casos em 3 grupos distintos: LMC resistente (116 casos), LMC não resistente (25 casos) e LMC intolerante (20 casos). Posteriormente, procedeu-se ao levantamento referente à quantidade de amostras de medula óssea em cada grupo, sendo obtido o seguinte resultado: 41 amostras no grupo LMC resistente, 22 amostras no grupo LMC não resistente e 11 amostras no grupo LMC intolerante. O grupo controle foi composto por 10 casos de amostras normais de medula óssea (biópsias para estadiamento de linfomas, negativas para infiltração), provenientes do HAA.

Após a definição da quantidade de biópsias em cada grupo, foi constatado que as biópsias foram realizadas em momentos distintos. Em uma parcela dos casos, a biópsia era realizada no momento do diagnóstico e em outra parcela dos casos a biópsia era efetuada anteriormente ao transplante de medula óssea ou para reavaliação de doença no momento de constatação de falha terapêutica/ progressão de doença. A diferença no momento em que as biópsias eram executadas é explicada pelos protocolos distintos existentes nas instituições. Logo, os grupos de LMC resistente e LMC intolerante foram subdivididos em pré-tratamento e pós-tratamento, agrupando as fases crônica (FC) e crônica de alto risco (FCA) com o objetivo de aumentar a representatividade dos subgrupos, que foram então constituídos da seguinte forma: LMC resistente (pré-

tratamento FC+FCA: n = 21; pós-tratamento FC+FCA: n = 15; crise blástica: n = 5) e LMC intolerante (pré-tratamento FC+FCA: n = 7; pós-tratamento FC+FCA: n = 4). A crise blástica foi considerada como um subgrupo distinto no grupo de LMC resistente por se tratar da fase terminal da doença.

O estudo recebeu parecer favorável para realização pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HAB/ HAA (CAAE: 68510823.7.1001.5437; parecer: 6.297.205) e do HC-FMB-UNESP (CAAE: 68510823.7.2001.5411; parecer: 6.685.537). Foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) audiogravado nos pacientes das três instituições para obtenção de autorização para uso das amostras de medula óssea armazenadas em cada instituição.

2.2 Análise morfológica:

Para a análise morfológica foram avaliadas lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) e impregnação argêntica (IA), obtidas a partir do processamento prévio das amostras de medula óssea de acordo com o protocolo de cada instituição, descrevendo os seguintes parâmetros:

- Celularidade global (hipercelular, hipocelular ou normocelular);
- Relação G:E (aumentada, diminuída ou preservada);
- Ectopia de linhagens (eritroide, granulocítica, megacariocítica) e frequência (ausente, 1+, 2+ e 3+);
- Atipia na série megacariocítica (presença de megacariócitos hipolobados, desnudos, em nuvem, micromegacariócitos e hipercromasia), frequência (ausente, 1+, 2+, 3+) e nicho envolvido (perivascular - PV, peritrabecular - PT, perivascular/peritrabecular – PV/ PT, perivascular/peritrabecular/subosteal – PV/ PT/ OB);
- Formação de agregados de megacariócitos (coesos, frouxos, frouxos/coesos), quantidade (ausente, 1+, 2+ e 3+) e nicho envolvido (PV, PT, PV/ PT, PV/ PT/ OB);
- Eosinofilia (presente ou ausente);
- Arcabouço ósseo (remodelado ou preservado);
- Arcabouço reticulínico (classificação de acordo com a OMS em MF-0, MF-1, MF-2 e MF-3) e nicho envolvido (PV, PT, PV/ PT, PV/ PT/ OB);
- Subclassificação nos subtipos Gran e Gran-Meg.

2.3 Análise imuno-histoquímica:

A análise imuno-histoquímica envolveu a utilização dos anticorpos: CD44 (marca Zeta, monoclonal-coelho, diluição 1:100, lote ZR07232021-A), hialuronano (marca Cloud-Clone, policlonal-coelho, diluição 1:50, lote A20240802454), hialuronano sintase 1 (HAS1 – marca Biossource, policlonal-coelho, diluição 1:100, lote D5620LI8047), hialuronano sintase 2 (HAS2 - marca Biossource, policlonal-coelho, diluição 1:100, lote A20240614794) e hialuronano sintase 3 (HAS 3 - marca Biossource, policlonal-coelho, diluição 1:100, lote 52326). O exame imuno-histoquímico foi realizado no laboratório Logos de acordo com o protocolo local através de metodologia manual. A recuperação antigênica foi efetuada em câmara pressurizada Muscae Plus a 115°C por 15 minutos em pH 9,0 (solução Tris-EDTA – Envision Flex, lote: 41613643). Na etapa de incubação foram utilizados 40 µL de cada anticorpo primário durante o período de 1 hora.

Foram descritos os seguintes parâmetros:

- Nicho com imunomarcação: PV, PV/ PT, PV/ PT/ OB;
- Intensidade da imunomarcação: negativo, 1+, 2+, 3+;
- Percentual de imunomarcação: negativo, 1-10%, 11-30%, 31-50%, 51-70%, >70%.

2.4 Análise estatística:

Os testes de associação entre variáveis categorizadas foram feitos com base na estatística Qui-quadrado de Pearson com correção de continuidade proposta por Yates (Fleiss JL, 1981). Considerou-se um nível de significância de 5%. A tendência de significado biológico foi identificada para os valores de p próximos de 10%.

3. Resultados

3.1 Resultados clínico-epidemiológicos

A Tabela 1 apresenta o resultado do teste comparativo das médias etárias para os grupos de LMC. A estatística do teste comparativo apresentou valor igual a $F_{(2,158)} = 4.9797$ com $p = 0.008$, indicando diferença significativa. Em seguida, foram utilizados os intervalos simultâneos de Tukey HSD (Steel, 1997) para indicar quais médias diferem significativamente.

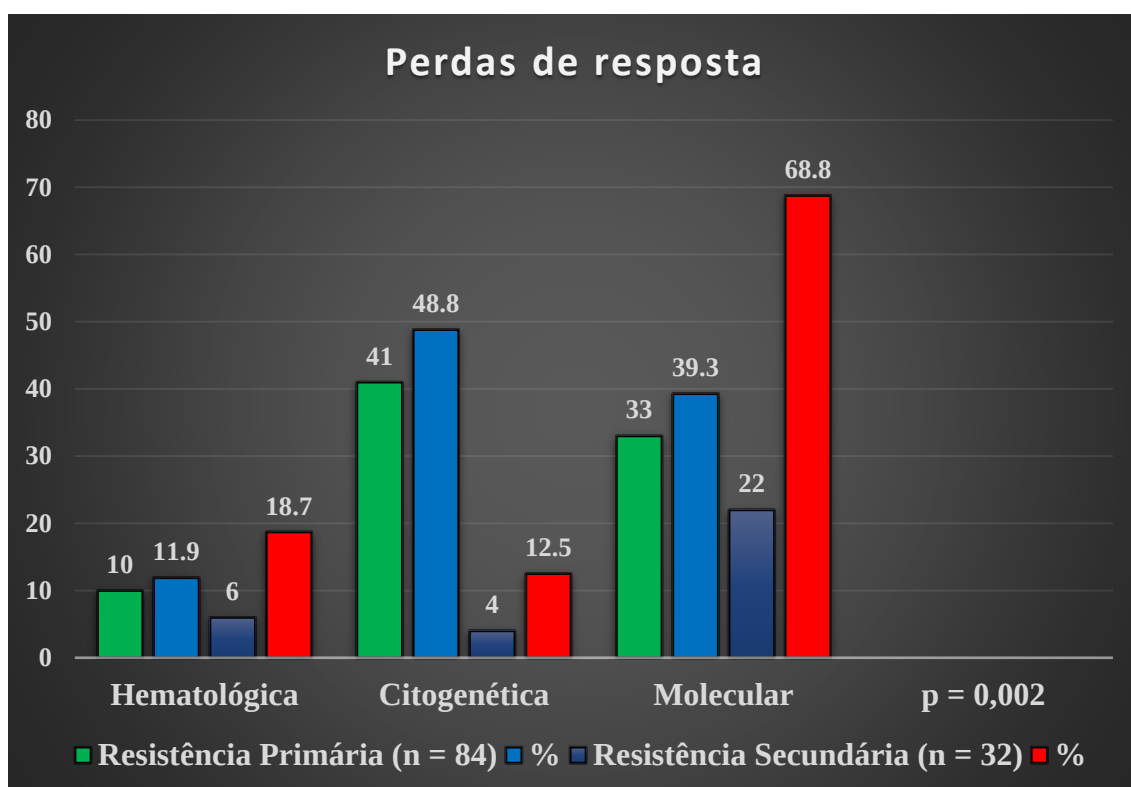
Tabela 1 – Médias etárias por grupo de LMC e respectivos testes comparativos

Grupo			n	Média	Desvio	Mediana
LMC intolerante			20	59.1	13.4	61
LMC não refratária			25	55.5	17.3	53
LMC refratária			116	49.4	13.9	50.5
Contrastes			Diferença	LIC	LSC	p-value
Não refratária	versus	Intolerante	-3.62	-13.83	6.60	0.6799
Refratária	versus	Intolerante	-9.70	-17.95	-1.46	0.0165
Refratária	versus	Não refratária	-6.08	-13.59	1.43	0.1374

Tukey HSD

Conforme evidenciado, as médias etárias diferentes foram dos grupos LMC resistente e LMC intolerante ($p = 0,0165$).

O Gráfico 1 apresenta a distribuição das perdas de resposta (hematológica, citogenética e molecular) nos grupos de resistência primária e secundária.

Gráfico 1 – Perdas de resposta hematológica, citogenética e molecular nos grupos de LMC com resistência primária e LMC com resistência secundária

Foi significativa a associação entre perda de resposta e resistência ($p = 0,002$). A perda de resposta citogenética foi predominante na resistência primária (48,8%) enquanto que a perda de resposta molecular foi relacionada à resistência secundária (68,8%). A perda de resposta citogenética diferiu significativamente das demais: hematológica ($p = 0,023$) e molecular ($p=0,001$).

3.2 Resultados da análise morfológica

Em todos os grupos, a avaliação da maior parcela dos casos foi em material de biópsia enquanto que o coágulo correspondeu à minoria dos materiais avaliados.

Nos grupos de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) e LMC não resistente, há tendência de significado biológico para a eosinofilia ($p = 0,164$).

Comparando-se os grupos de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) e LMC resistente pós-tratamento (FC+FCA), foi constatado que o tratamento para LMC apresentou alteração nos seguintes parâmetros morfológicos: celularidade global ($p < 0,001$), relação G:E ($p = 0,017$), ectopia granulocítica ($p < 0,001$) e grau de reticulogênese ($p = 0,046$). Houve diminuição da celularidade global assim como redução da relação G:E. A ausência de ectopia granulocítica se diferenciou no grupo de LMC resistente pós-tratamento em 100% dos casos, comparando com as graduações 1+ ($p = 0,026$), 2+ ($p < 0,001$) e 3+ ($p = 0,010$). Na análise do arcabouço reticulínico, foi constatado predomínio, com significância, no grupo pré-tratamento dos graus MF-1 ($p = 0,020$) e MF-2 ($p = 0,020$), e redução da fibrose reticulínica no grupo pós tratamento com predomínio de MF-0.

A Figura 1 ilustra a microscopia das biópsias de medula óssea das LMC resistentes, cujas características morfológicas demonstraram significância estatística ao longo da terapia com os ITQ.

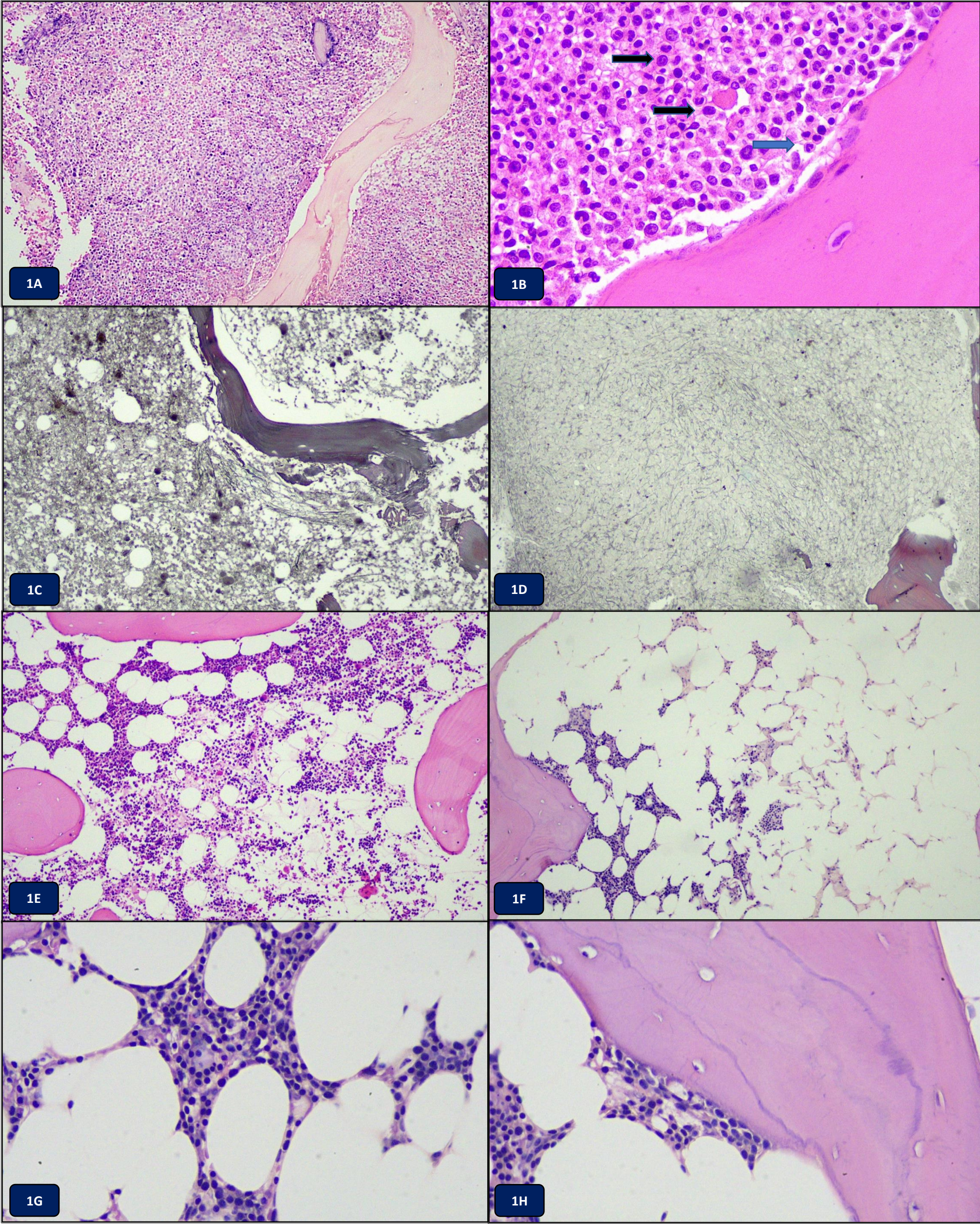


Fig. 1 – Biópsias de medula óssea: Características morfológicas da LMC resistente, em fase crônica, no contexto pré e pós-tratamento com os ITQ: **1A)** LMC resistente pré-tratamento: Hiper celularidade global (HE, 10X); **1B)** LMC resistente pré-tratamento: Ectopia da série granulocítica com neutrófilo peritrabecular (seta azul) e granulócitos imaturos em direção ao nicho perivascular (setas pretas) (HE, 40X); **1C)** LMC resistente pré-tratamento: MF-1 no nicho peritrabecular (IA, 10X); **1D)** LMC resistente pré-tratamento: MF-2 no nicho perivascular (IA, 10X); **1E)** LMC resistente pós-tratamento: Hipocelularidade global com citotoxicidade (HE, 10X); **1F)** LMC resistente pós-tratamento: Hipocelularidade global (HE, 10X); **1G)** LMC resistente: Redução da relação G:E (HE, 40X); **1H)** LMC resistente pós-tratamento: Ectopia eritroide (HE, 40X).

Na análise da dispoese dos megacariócitos, foi significativa a associação entre a quantidade de micromegacariócitos (2+: $p = 0,018$) no grupo de LMC não resistente em comparação com o grupo de LMC resistente. Há tendência de significado biológico no envolvimento das formas hipolobadas nos nichos ($p = 0,102$) e de hipercromasia ($p = 0,164$).

A Figura 2 ilustra as características da dispoese da linhagem megacariocítica nos grupos de LMC resistente e não resistente.

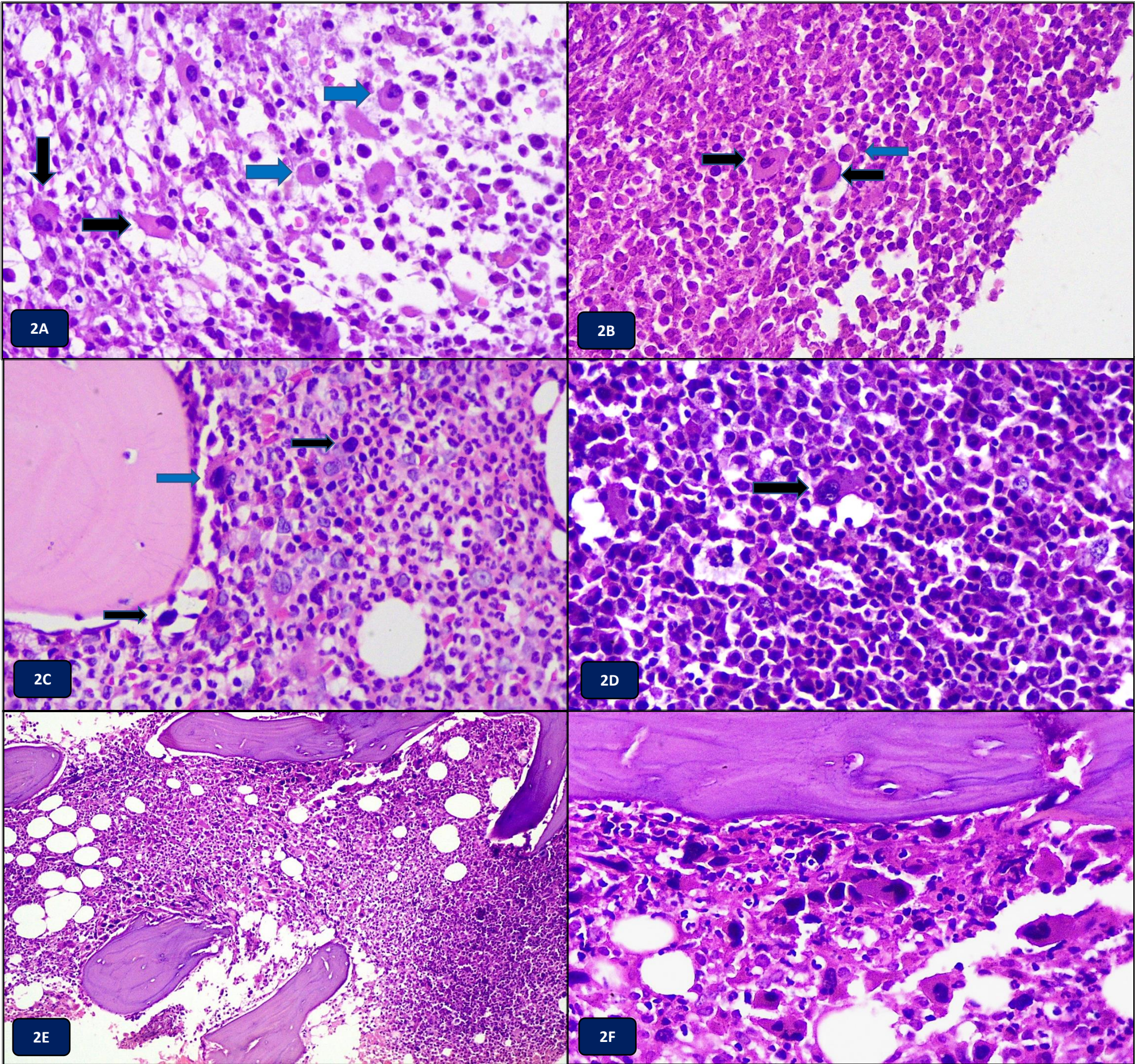


Fig. 2 – Biópsias de medula óssea: Dispoese da linhagem megacariocítica na LMC resistente e não resistente, ambas em fase crônica: **2A)** LMC não resistente: Megacariócitos hipolobados (setas pretas) e micromegacariócitos (setas azuis) no nicho perivascular (HE, 40X); **2B)** LMC resistente pós-tratamento: Agregado frouxo contendo megacariócitos hipolobados (setas pretas) e um micromegacariócito (seta azul) no nicho perivascular (HE, 40X); **2C)** LMC resistente pré-tratamento: Ectopia de megacariócitos hipolobados (seta azul) e desnudos (setas pretas) hipercromáticos no nicho subosteal (HE, 40X); **2D)** LMC não resistente: Megacariócito em nuvem no nicho perivascular (HE, 40X); **2E)** LMC não resistente: Hiperplasia megacariocítica com formação de agregados frouxos de megacariócitos nos nichos perivascular e peritrabecular (HE, 10X); **2F)** LMC não resistente: Ectopia megacariocítica com agregado coeso peritrabecular de megacariócitos hipolobados e hipercromáticos (HE, 40X).

O parâmetro quantidade de formação de agregados de megacariócitos ($p = 0,043$) apresentou diferença significativa entre os grupos de LMC intolerante pré-tratamento e LMC não resistente. Há maior formação de agregados (3+: $p = 0,142$) na LMC não resistente em relação à LMC intolerante (2+: $p = 0,177$).

3.3 Resultados da análise imuno-histoquímica

3.3.1 CD44

No grupo de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA), observou-se associação significativa no parâmetro intensidade ($p < 0,001$), uma vez que esse grupo apresentou predomínio de altas intensidades de expressão de CD44 (2+: $p = 0,0008$; 3+: $p = 0,0033$) em comparação à baixa intensidade observada no grupo não resistente.

No grupo de LMC não resistente foram significativos os parâmetros: localização no nicho perivascular ($p = 0,035$), intensidade (1+: $p < 0,001$) e porcentagem de marcação ($< 10\%$: $p = 0,054$) em relação ao grupo controle.

3.3.2 Hialuronano (imunoexpressão celular)

No grupo de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) em comparação com o grupo de LMC não resistente, há tendência de significado biológico para o percentual de marcação ($p = 0,081$).

Comparando-se os grupos de LMC não resistente e controle, foi observada associação significativa nos parâmetros: localização nos nichos PV/ PT/ OB ($p = 0,002$), intensidade (3+: $p = 0,004$) e percentual de marcação (51-70%: $p = 0,073$; $>70\%$: $p = 0,010$).

3.3.3 Hialuronano (imunoexpressão estromal)

Comparando-se os grupos de LMC não resistente e controle, os parâmetros que apresentaram significância foram: localização nos nichos PV/ PT/ OB ($p = 0,006$), intensidade (3+: $p = 0,013$) e percentual de marcação (51-70%: $p = 0,085$; $>70\%$: $p = 0,085$).

A Figura 3 ilustra a expressão imuno-histoquímica de CD44 e hialuronano nos grupos de LMC resistente e não resistente.

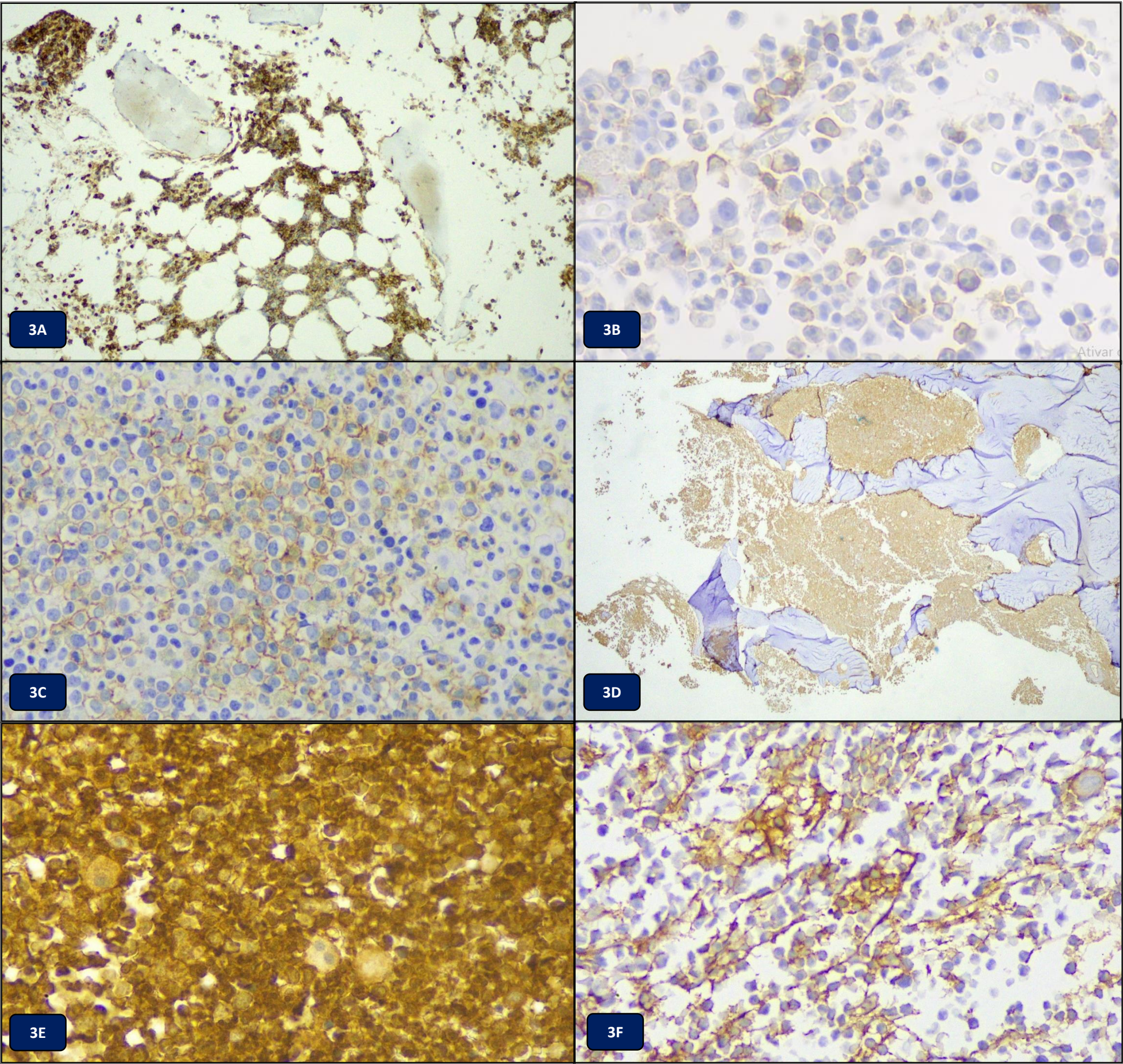


Fig. 3 – Biópsias de medula óssea: Avaliação imuno-histoquímica de CD44 e hialuronano na LMC resistente e não resistente, em fase crônica: **3A)** LMC resistente pré-tratamento: Positividade (3+/3+) de CD44 no nicho perivascular (10X); **3B)** LMC não resistente: Positividade (1+/3+) de CD44 no nicho perivascular (40X); **3C)** LMC resistente pré-tratamento: Positividade (2+/3+) de CD44 no nicho perivascular (40X); **3D)** LMC não resistente: Positividade celular e estromal (3+/3+) de hialuronano nos nichos perivascular, peritrabecular e subosteal (4X); **3E)** LMC resistente pré-tratamento: Positividade celular e estromal (3+/3+) de hialuronano no nicho perivascular (40X); **3F)** LMC resistente pós-tratamento: Positividade celular e estromal (3+/3+) de hialuronano no nicho perivascular (40X).

3.3.4 HAS 1 (imunoeexpressões celular e estromal)

Em todos os grupos de LMC, não foram observadas associações significativas para nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle.

3.3.5 HAS 2 (imunoeexpressão celular)

Comparando-se os grupos de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) e LMC não resistente, foi observada associação significativa para o parâmetro localização nos nichos PT/ PV ($p = 0,021$). No grupo de LMC não resistente, observa-se a expressão celular de HAS2 nesses nichos, entretanto, no contexto de resistência, a expressão simultânea em ambos os nichos está ausente.

3.3.6 HAS 2 (imunoeexpressão estromal)

No grupo de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA), identificou-se associação significativa com a expressão estromal ($p = 0,014$), uma vez que a expressão ocorreu de forma predominante no grupo não resistente, enquanto que no grupo resistente prevaleceu a ausência de expressão.

No grupo de LMC resistente pós-tratamento (FC+FCA), foi mantida a associação significativa identificada para a expressão estromal ($p = 0,003$). De maneira semelhante ao grupo de LMC resistente pré-tratamento, no contexto pós-tratamento, não há expressão estromal de HAS2, ao contrário do grupo não resistente.

3.3.7 HAS 3 (imunoeexpressão celular)

Em todos os grupos de LMC, não foram observadas associações significativas para nenhum dos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle.

3.3.8 HAS 3 (imunoeexpressão estromal)

Comparando-se os grupos de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) e controle, há propensão de significado biológico para os parâmetros: localização ($p = 0,092$), intensidade ($p = 0,084$) e percentual de marcação ($p = 0,089$).

No grupo de LMC não resistente, houve associação significativa da intensidade de expressão (1+: $p = 0,004$) em relação ao grupo controle.

A Figura 4 ilustra a expressão imuno-histoquímica das hialuronano sintases nos grupos de LMC resistente e não resistente.

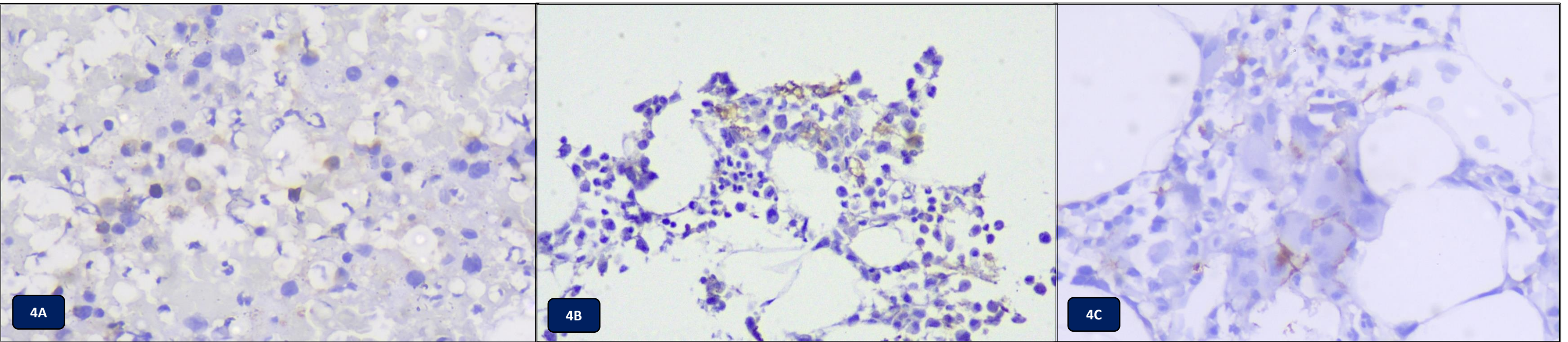


Fig. 4 – Biópsias de medula óssea: Avaliação imuno-histoquímica das hialuronano sintases na LMC não resistente, em fase crônica: **4A)** Positividade celular (1+/3+) de HAS2 no nicho perivascular (40X); **4B)** Positividade estromal (1+/3+) de HAS2 no nicho perivascular (40X); **4C)** Positividade estromal (1+/3+) de HAS3 no nicho perivascular (40X).

4. Discussão

A quimiorresistência constitui um entrave terapêutico na LMC, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes, além do prejuízo financeiro decorrente do uso de múltiplas linhas de tratamento. Dessa forma, a identificação de fatores capazes de prever o desenvolvimento de resistência pode resultar em mudança na conduta terapêutica ao diagnóstico e impedir as repercussões social e econômica negativas.

No grupo de LMC resistente, a média de idade foi de 49,4 anos, enquanto que no grupo de LMC não resistente foi de 55,5 anos e, no grupo de LMC intolerante, 59,1 anos. Esses resultados indicam que a média de idade da casuística está alinhada com a faixa etária da LMC na população geral, que varia entre 50 e 60 anos ^(6,18). No entanto, observa-se que a média de idade no grupo resistente é inferior à média da casuística total, ao passo que o grupo intolerante apresenta uma média de idade superior à da casuística total. Nishiyama-Fujita et al. (2022) evidenciaram que, em pacientes mais jovens (18-29 anos) com LMC em fase crônica, a carga tumoral é maior em comparação aos pacientes mais velhos na mesma fase. Isso se deve ao fato de que, estatisticamente, esses pacientes apresentam maior tamanho esplênico, contagens leucocitárias mais elevadas e um maior número de blastos, embora não haja diferença em relação ao prognóstico ⁽¹⁹⁾. Embora a média de idade dos pacientes no grupo de LMC resistente esteja acima da descrita por Nishiyama-Fujita et al. (2022), o fato de pacientes mais jovens apresentarem uma maior carga tumoral pode ajudar a explicar por que o grupo resistente possui uma média de idade inferior em relação aos demais grupos de LMC. Isso ocorre possivelmente porque uma maior quantidade de transcritos de *BCR::ABL1* pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência a partir de diferentes células leucêmicas.

A resistência primária (refratariedade) é caracterizada pela ausência de resposta hematológica, citogenética e/ou molecular no início do tratamento. Por outro lado, a resistência secundária (adquirida) ocorre quando há uma perda da resposta previamente alcançada, em um período de tempo variável. As falhas de resposta são classificadas da seguinte forma: a falha hematológica é definida pela ausência de normalização dos parâmetros hematológicos no sangue periférico; a falha citogenética, pela persistência do cromossomo Philadelphia; e a falha molecular, pela persistência de transcritos de *BCR::ABL1* ($\geq 0,1\%$) ^(6,20). Na LMC com resistência primária, a principal perda de resposta observada foi a citogenética, enquanto que na resistência secundária, a perda mais evidente ocorreu em nível molecular. Em ambos os grupos, apenas uma pequena parcela dos pacientes apresentou perda de resposta hematológica, indicando que essa

resposta tende a ser preservada mesmo em cenários de resistência. Isso sugere que, apesar da resistência, os ITQ são capazes de manter os parâmetros hematimétricos dentro da normalidade. No entanto, em nível citogenético e molecular, a persistência da doença é significativa, refletindo os mecanismos de resistência desenvolvidos. Na resistência secundária, os sinais de persistência da doença são mais sutis, sendo detectados apenas em nível molecular, enquanto na resistência primária, esses indícios são identificados em nível cromossômico.

Na avaliação histopatológica da medula óssea, houve associação significativa entre a quantidade de micromegacariócitos nos grupos de LMC resistente pré-tratamento (FC+FCA) e LMC não resistente, sendo que uma quantidade moderada de micromegacariócitos esteve relacionada à LMC não resistente. Dessa forma, essa característica pode representar um marcador morfológico protetor contra o desenvolvimento de quimiorresistência à terapia com ITQ. Além disso, as tendências de significado biológico associadas à eosinofilia, hipercromasia de megacariócitos e envolvimento das formas hipolobadas nos nichos sugerem que a análise morfológica da medula óssea pode permitir a predição do risco de evolução para resistência.

Na LMC pós-tratamento, uma característica marcante foi a redução da celularidade global. A ectopia granulocítica, anteriormente acentuada na LMC resistente pré-tratamento, torna-se discreta ou ausente no contexto pós-tratamento. Desse modo, as alterações morfológicas observadas refletem a resposta ao tratamento, mesmo na presença de resistência em nível molecular e/ou citogenético. O quadro histológico evidencia uma reorganização arquitetural da medula óssea, com significância estatística, caracterizada por redução da celularidade global, da relação G:E, da ectopia granulocítica e da fibrose reticulínica.

A mielofibrose corresponde a um processo complexo, lento e progressivo de deposição de matriz extracelular na medula óssea, que pode ocorrer em neoplasias mieloides. A graduação é dividida em estágios pré-fibrótico (MF-0, MF-1) e fibrótico (MF-2, MF-3), conforme a classificação proposta pela OMS. Um mecanismo proposto para o aumento da trama reticulínica na LMC envolve a secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF α/β), que estimula a produção de fibras colagênicas por fibroblastos através de megacariopoiese anormal. No passado, a presença de mielofibrose ao diagnóstico da LMC era considerada um indicativo de mau prognóstico. No entanto, na era dos ITQ, o prognóstico é incerto, especialmente devido à capacidade desses inibidores de reverter a fibrose por inibição de PDGF ^(4,21-23). Foi demonstrado, com significância

estatística, que no contexto de resistência pré-tratamento, há aumento da trama reticulínica, com predomínio dos estágios MF-1 e MF-2. Entretanto, após o tratamento, observa-se a reversão da fibrose reticulínica para MF-0. Logo, os ITQ interferem no estroma medular mesmo em contexto de quimiorresistência.

CD44 corresponde a uma glicoproteína transmembrana expressa tanto em células normais quanto neoplásicas, atuando como uma molécula de adesão. Além disso, é reconhecida como um biomarcador de superfície para células-tronco malignas. Estudos indicam que CD44 desempenha um papel importante no mecanismo de resistência independente de *BCR::ABL1* ^(24,25). Na LMC não resistente, observa-se baixa expressão de CD44, com intensidade reduzida no nicho perivascular. Estatisticamente, foi demonstrado que, no contexto de resistência, há um aumento na intensidade da expressão de CD44. Desse modo, a análise imuno-histoquímica reforça a importância do CD44 no contexto da quimiorresistência, uma vez que o aumento da sua intensidade pode indicar a progressão para resistência por um mecanismo independente da ação de *BCR::ABL1*.

Uma estratégia terapêutica desenvolvida para superar a quimiorresistência mediada por CD44 envolve o mecanismo representado por *IRAIN*, uma sequência longa de RNA não codificante que, na LMC, é constitutivamente expressa em baixos níveis e está associada à resistência ao IMB. Wang et al. (2024) demonstraram que a superexpressão de *IRAIN*, induzida pela decitabina, reduz os níveis de CD44 por meio da inibição da via NF- κ B, resultando no bloqueio do eixo NF- κ B/CD44 e na reversão da resistência ao IMB ⁽²⁵⁾.

O HA é um glicosaminoglicano linear, sintetizado pelas enzimas transmembrana hialuronano sintases (HAS1, HAS2 e HAS3). Trata-se de um componente multifuncional da matriz extracelular, com a capacidade de regular a proliferação celular e a apoptose. Seu principal ligante é o CD44 e a interação entre ambos ativa vias que favorecem a proliferação celular e a quimiorresistência ⁽²⁶⁾. Na LMC não resistente, observou-se uma alteração na expressão celular e estromal de HA em comparação ao controle, com forte expressão nos três nichos e alta quantidade de células. No entanto, não foi identificada diferença significativa em relação à LMC resistente. Assim, tanto na LMC resistente quanto na não resistente, há uma modificação na expressão celular e estromal de HA, refletida pelo aumento na quantidade de células expressando esse marcador, maior intensidade de marcação e envolvimento dos três nichos, quando comparados ao microambiente de uma medula óssea normal.

Lompardía et al. (2019) demonstraram a interação entre a glicoproteína CD44 e o glicosaminoglicano HA no contexto do tratamento com IMB em culturas celulares de

LMC. Observou-se que, após a administração do ITQ, houve uma redução nos níveis de HA e na expressão de CD44 na superfície celular. Além disso, a inibição da síntese de HA com 4-MU (*4-methylumbelliferone*) potencializou a ação antiproliferativa do IMB, sugerindo que a senescência induzida estaria associada à diminuição dos níveis de HA. Esses achados destacam a relevância do HA no mecanismo de quimiorresistência, indicando que baixos níveis desse glicosaminoglicano podem estar associados a uma melhor resposta ao tratamento e a um menor risco de desenvolvimento de resistência ⁽²⁷⁾.

A produção de HA ocorre na membrana plasmática por meio da ação das hialuronano sintases, sendo posteriormente secretado para a matriz extracelular, onde é degradado por hialuronidases e espécies reativas de oxigênio, resultando na formação de pequenos fragmentos e oligômeros ⁽²⁸⁾. A análise imuno-histoquímica das hialuronano sintases demonstrou, com significância estatística, que na LMC não resistente há expressão simultânea celular de HAS2 nos nichos PT/ PV, além da presença de expressão estromal. Em contraste, na LMC resistente, tanto a imunomarcação celular em ambos os nichos quanto a estromal de HAS2 estão ausentes. Esses achados indicam que a quimiorresistência intensifica o remodelamento do microambiente medular, sendo caracterizado pela perda da expressão de HAS2. Além disso, na LMC não resistente, há expressão de HAS3 estromal em baixa intensidade, e propensão com significado biológico de que a LMC resistente também apresente uma expressão diferenciada dessa enzima. Dessa forma, verifica-se um desbalanço metabólico na biossíntese de HA, uma vez que os altos níveis desse glicosaminoglicano, tanto em nível celular quanto estromal, não são suficientes para inibir a atividade enzimática das hialuronano sintases. A desregulação no metabolismo do HA é frequente no contexto de malignidade. A síntese aumentada é acompanhada de aumento na degradação com formação de pequenos fragmentos tumorais que promovem inflamação, crescimento tumoral, angiogênese ⁽²⁹⁾. É possível que haja elevação nas quantidades de HA de baixo peso molecular em virtude da degradação exacerbada por ação de hialuronidases. Sabe-se que as formas de baixo peso estão associadas à progressão maligna ⁽³⁰⁾. Desse modo, o aumento no catabolismo de HA, decorrente do desbalanço metabólico, pode fortalecer a manutenção do remodelamento dos nichos e justificar a perda de expressão celular e estromal de HAS2 assim como a elevação na intensidade de expressão de CD44, favorecendo o desenvolvimento da quimiorresistência. Logo, esses marcadores apresentam relevância diagnóstica, pois correspondem a sinalizadores de resistência e, consequentemente,

podem influenciar na conduta terapêutica a partir do uso de um ITQ mais potente em comparação ao IMB.

Houve limitação no desenvolvimento desse trabalho devido à dificuldade na obtenção das amostras, pois nem sempre foi realizada biópsia de medula óssea no manejo da LMC e o fato de haver momentos distintos na coleta das biópsias ocasionou segregação dos resultados, com redução da representatividade de cada subgrupo (pré-tratamento e pós-tratamento). Esse fato é constatado na presença de resultados com propensão de significado biológico de modo que a ampliação desse estudo com maior número de amostras pode ocasionar resultados estatisticamente significativos e complementar os resultados já validados. Outra limitação a ser mencionada foi a dificuldade na interpretação imuno-histoquímica de hialuronano, pois como corresponde ao glicosaminoglicano mais abundante da matriz extracelular, houve forte expressão tanto celular quanto estromal, gerando sobreposição da marcação. Contudo, a padronização da diluição auxiliou na interpretação.

Portanto, a leucemogênese determina inicialmente modificação histológica da medula óssea, caracterizada por hiperplasia mieloide absoluta e relativa, associada à ectopia granulocítica e à dispoese de megacariócitos, com destaque para os micromegacariócitos. O remodelamento dos nichos é identificado através da análise imuno-histoquímica, evidenciando o sinergismo entre CD44 e HA, além do desequilíbrio na biossíntese deste último, com consequente perda da expressão de HAS2 na LMC resistente. A detecção precoce do desenvolvimento de resistência é essencial para a adoção de medidas terapêuticas ao diagnóstico, evitando sua plena instauração. Dessa forma, a implementação rotineira de biópsia de medula óssea no momento do diagnóstico de LMC para avaliação morfológica aliada à análise imuno-histoquímica dos marcadores CD44 e HAS2 nos nichos medulares, pode resultar em identificação antecipada de casos com potencial para desenvolver quimiorresistência. Logo, há possibilidade de modificação do curso da doença a partir do direcionamento da terapia para um inibidor mais potente e específico com consequente prevenção do impacto socioeconômico negativo que a resistência acarreta e manutenção da boa evolução clínica e sobrevida prolongada.

Referências

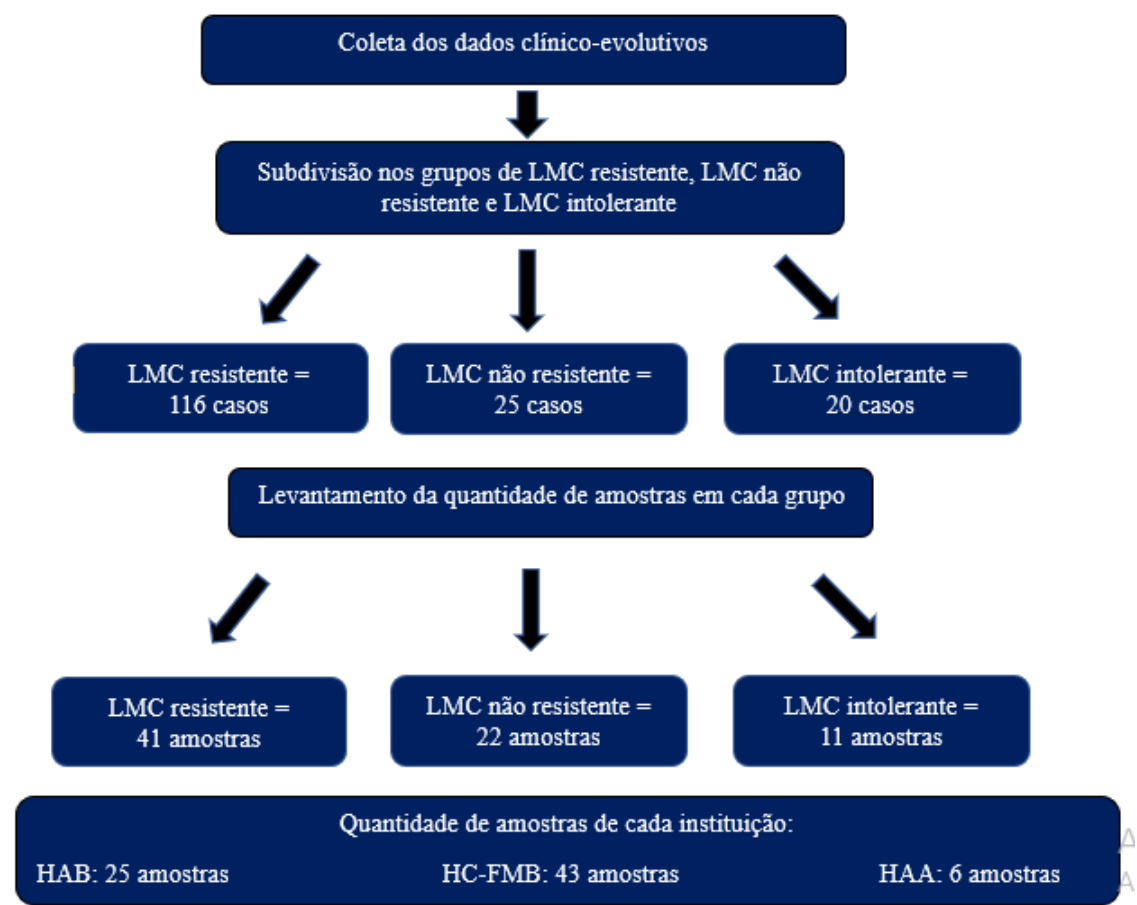
1. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2024;99(11):2191–212. doi: 10.1002/ajh.27443.
2. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2015;385(9976):1447–59. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62120-0.
3. Hidalgo-López JE, Kanagal-Shamanna R, Quesada AE, Gong Z, Wang W, Hu S, et al. Bone marrow core biopsy in 508 consecutive patients with chronic myeloid leukemia: Assessment of potential value. *Cancer*. 2018;124(19):3849–55. doi: 10.1002/cncr.31663.
4. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2024.
5. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon FX, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv41–iv51. doi: 10.1093/annonc/mdx219.
6. Sun J, Hu R, Han M, Tan Y, Xie M, Gao S, et al. Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Int J Bio Sci*. 2024;20(1):175–81. doi: 10.7150/ijbs.86305.
7. Deangelo DJ. Managing chronic myeloid leukemia patients intolerant to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood Cancer J*. 2012;2(10):e95. doi: 10.1038/bcj.2012.30.
8. Dolinska M, Cai H, Månsson A, Shen J, Xiao P, Boudierlique T. Characterization of the bone marrow niche in patients with chronic myeloid leukemia identifies CXCL14 as a new therapeutic option. *Blood*. 2023;142(1): 73–89. doi: 10.1182/blood.2022016896.
9. Gao X, Wan Z, Wei M, Dong Y, Zhao Y, Chen X, et al. Chronic myelogenous leukemia cells remodel the bone marrow niche via exosome-mediated transfer of miR-320. *Theranostics*. 2019;9(19):5642–56. doi: 10.7150/thno.34813.
10. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(2):191–204. doi: 10.1089/ars.2017.7419.
11. Khattab S, El Sorady M, El-Ghandour A, Visani G, Piccaluga PP. Hematopoietic and leukemic stem cells homeostasis: the role of bone marrow niche. *Explor Target Antitumor Ther*. 2024;5(5):1027–55. doi: 10.37349/etat.2024.00262.

12. Le PM, Andreeff M, Battula VL. Osteogenic niche in the regulation of normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Haematologica*. 2018;103(12):1945–55. doi: 10.3324/haematol.2018.197004.
13. Cao H, Heazlewood SY, Williams B, Cardozo D, Nigro J, Oteiza A, et al. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica*. 2016;101(1):26–37. doi: 10.3324/haematol.2015.135921.
14. Pass A, Vigetti D. Hyaluronan: Structure, Metabolism, and Biological Properties. In: Cohen E, Merzendorfer H, editors. *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices*. 1st ed. Springer Cham; 2019. p. 155–86. doi: 10.1007/978-3-030-12919-4_4.
15. Uchakina ON, Ban H, Hostetler BJ, McKallip RJ. Inhibition of hyaluronic acid formation sensitizes chronic myelogenous leukemia to treatment with doxorubicin. *Glycobiology*. 2016;26(11):1171–79. doi: 10.1093/glycob/cww064.
16. Mishra MN, Chandavarkar V, Sharma R, Bhargava D. Structure, function and role of CD44 in neoplasia. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(2):267–72. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_246_18.
17. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.
18. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicina*. 23a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
19. Nishiyama-Fujita Y, Nakazato T, Iriyama N, Tokuhira M, Ishikawa M, Sato E, et al. Outcomes of adolescents and young adults with chronic-phase chronic myeloid leukaemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Ann Med*. 2022;54(1):1244–54. doi: 10.1080/07853890.2022.2069280.
20. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122–31. doi: 10.1177/107327480901600204.
21. Jacobi H, Vieri M, Bütow M, Namasu CY, Flüter L, Costa IG, et al. Myelofibrosis at diagnosis is associated with the failure of treatment-free remission in CML patients. *Front Pharmacol*. 2023;14: 1212392. doi: 10.3389/fphar.2023.1212392.

22. Pandey N, Yadav G, Kushwaha R, Verma SP, Singh US, Kumar A, et al. Effect of Imatinib on Bone Marrow Morphology and Angiogenesis in Chronic Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*. 2019;1835091. doi: 10.1155/2019/1835091.
23. Shanmuganathan N, Branford S, Hughes TP, Hiwase D. Bone marrow fibrosis associated with long-term imatinib therapy: resolution after switching to a second-generation TKI. *Blood Adv*. 2019;3(3):370–4. doi: 10.1182/bloodadvances.2018027516.
24. Shi R, Liu X. CD44: a potential therapeutic target in chronic myeloid leukemia. *Pharmazie*. 2021;76(12):574–8. doi: 10.1691/ph.2021.1744.
25. Wang X, Hou Y, Lyu Y, Zhou J, Zhang X, Hassani MA, et al. LncRNA *IRAIN* overcomes imatinib resistance in chronic myeloid leukemia via NF- κ B/CD44 pathway inhibition. *iScience*. 2024;27(6):109851. doi: 10.1016/j.isci.2024.109851.
26. Kultti A, Zhao C, Singha NC, Zimmerman S, Osgood RJ, Symons R, et al. Accumulation of extracellular hyaluronan by hyaluronan synthase 3 promotes tumor growth and modulates the pancreatic cancer microenvironment. *BioMed Res Int*. 2014;817613. doi: 10.1155/2014/817613.
27. Lompardía S, Díaz M, Pibuel M, Papademetrio D, Poodts D, Mihalez C, et al. Hyaluronan abrogates imatinib-induced senescence in chronic myeloid leukemia cell lines. *Sci Rep*. 2019;9(1):10930. doi: 10.1038/s41598-019-47248-8.
28. Carvalho AM, Reis RL, Pashkuleva I. Hyaluronan Receptors as Mediators and Modulators of the Tumor Microenvironment. *Adv Healthc Mater*. 2023;12(5):e2202118. doi: 10.1002/adhm.202202118.
29. Karalis T. Targeting Hyaluronan Synthesis in Cancer: A Road Less Travelled. *Biologics*. 2023;3(4):402–14. doi: 10.3390/biologics3040022.
30. Liu Y, Li L, Wang L, Lu L, Li Y, Huang G, et al. 'Two-faces' of hyaluronan, a dynamic barometer of disease progression in tumor microenvironment. *Discov Oncol*. 2023;14(1):11. doi: 10.1007/s12672-023-00618-1.

Anexos

1 – Distribuição dos casos para análise morfológica



HAB: Hospital de Amor de Barretos; HC-FMB: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu; HAA: Hospital de Amor Amazônia

2– Nichos da medula óssea

2.1 Nicho perivascular

O nicho perivascular compreende a região localizada nos espaços intertrabeculares, onde há densa rede de capilares. Está representado pelos círculos azuis na Figura 1 abaixo:

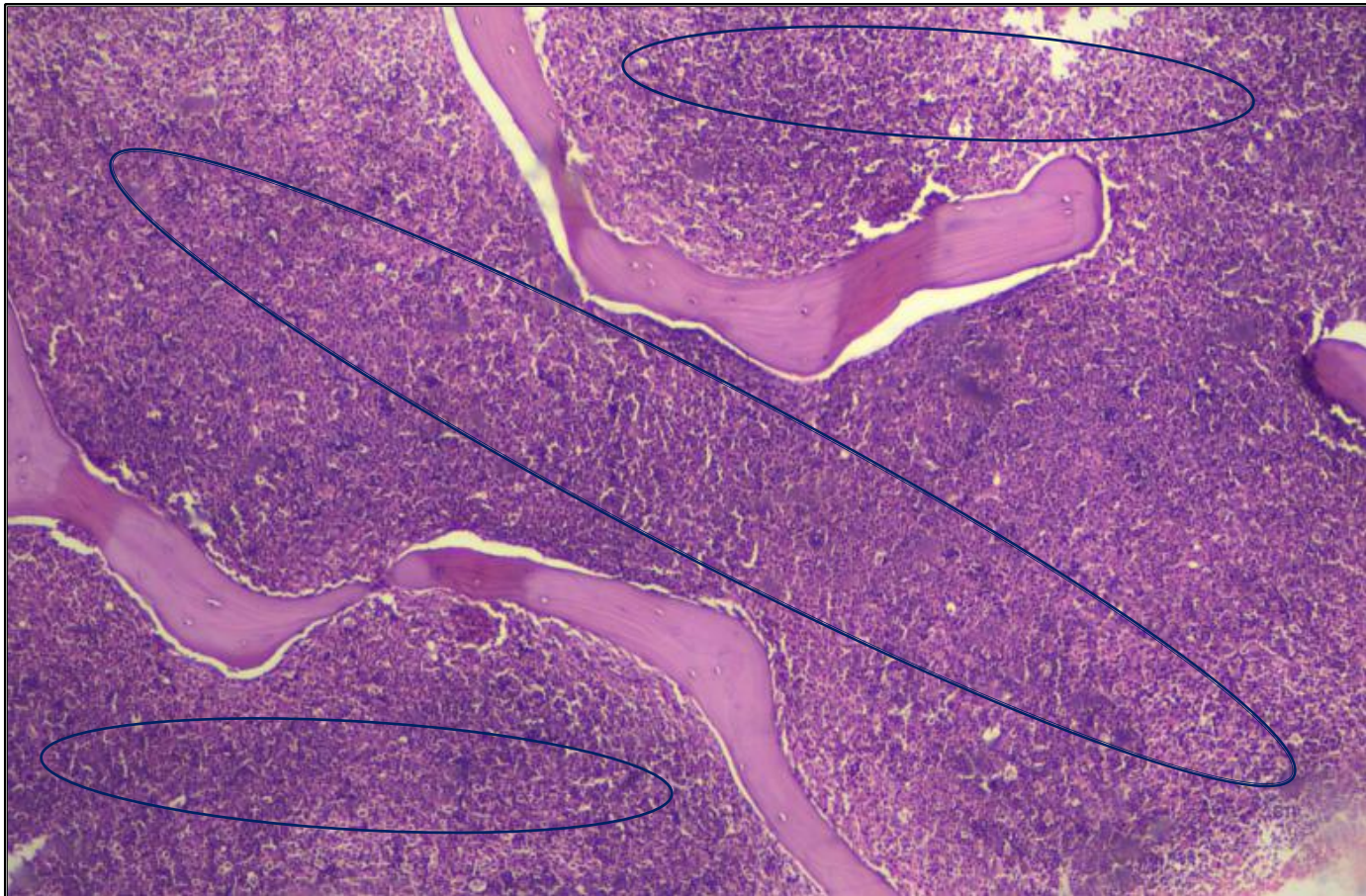


Fig.1: Representação do nicho perivascular na LMC em fase crônica (HE, 10X).

2.2– Nicho osteoblástico:

O nicho osteoblástico (subdivido em subosteal e peritrabecular) compreende a região adjacente às trabéculas óssea e osso subcortical. O nicho subosteal está representado pelo círculo vermelho na Figura 2 abaixo:

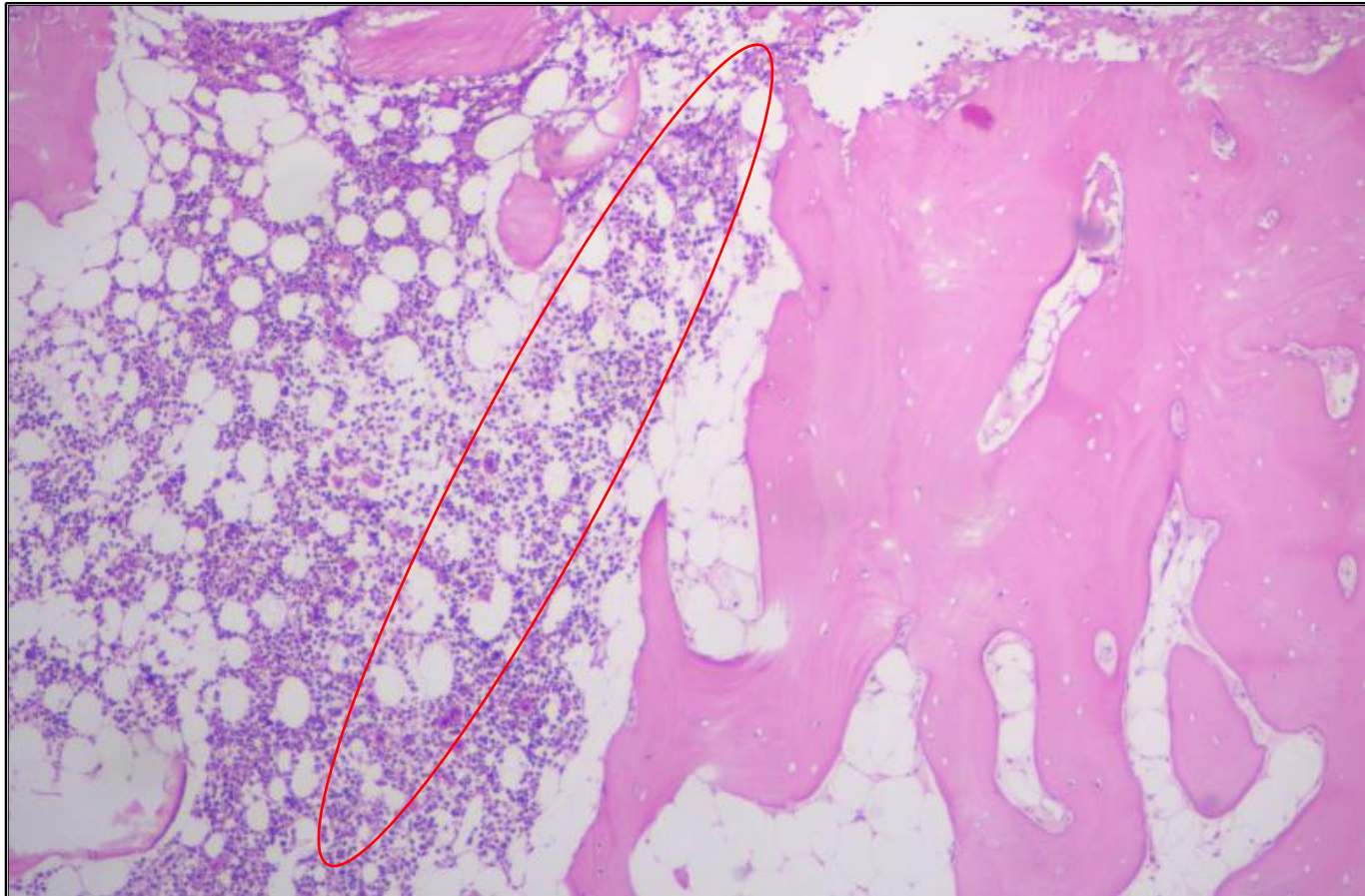


Fig.2: Representação do nicho subosteal na LMC em fase crônica (HE,10X).

O nicho peritrabecular está representado pelos círculos pretos na Figura 3:

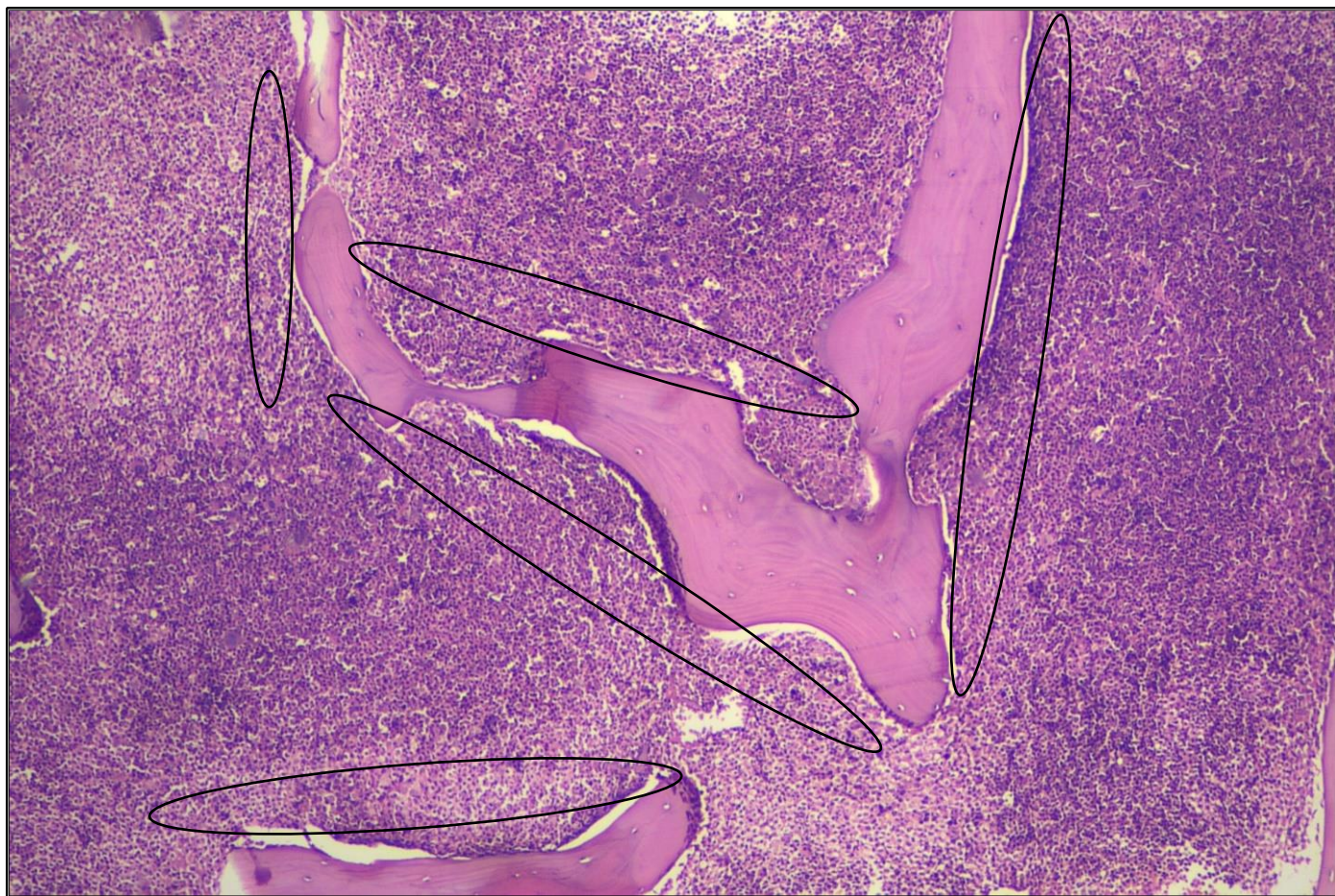


Fig. 3: Representação do nicho peritrabecular na LMC em fase crônica (HE, 10X).

3. Tabelas

Tabela 1: Análise morfológica nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Análise morfológica		Grupos												
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		
		FC+FCA (n = 21)	%	FC+FCA (n = 15)	%	n = 5	%	n = 22	%	FC (n = 7)	%	FC+FCA (n = 4)	%	
Material analisado	Biópsia de MO	18	85,7	14	93,3	3	60	21	95,4	7	100	4	100	
	Coágulo de MO	3	14,3	1	6,7	2	40	1	4,5	0	0	0	0	
Celularidade global	Hipercelular	21	100	5	33,3	3	60	22	100	7	100	2	50	
	Hipocelular	0	0	7	46,7	2	40	0	0	0	0	2	50	
	Normocelular	0	0	3	20	0	0	0	0	0	0	0	0	
Relação G:E	Aumentada	21	100	10	66,7	3	60	22	100	7	100	2	50	
	Diminuída	0	0	4	26,7	1	20	0	0	0	0	2	50	
	Preservada	0	0	1	6,7	1	20	0	0	0	0	0	0	
Ectopia de linhagens	Eritroide	1+	4	19	7	46,7	0	0	1	4,5	3	42,8	1	25
		2+	0	0	0	0	1	20	0	0	0	0	1	25
		3+	0	0	1	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0
		Negativo	17	81	7	46,7	4	80	21	95,4	4	57,1	2	50
	Granulocítica	1+	6	28,6	4	26,7	2	40	3	13,6	1	14,2	1	25
		2+	7	33,3	0	0	0	0	6	27,2	2	28,5	1	25
		3+	8	38,1	3	20	3	60	11	50	4	57,1	0	0
		Negativo	0	0	8	53,3	0	0	2	9	0	0	2	50
	Megacariocítica	1+	10	47,6	8	53,3	2	40	13	59	3	42,8	3	75
		2+	5	23,8	0	0	0	0	3	13,6	1	14,2	0	0
		3+	1	4,8	1	6,7	0	0	2	9	0	0	0	0
		Negativo	5	23,8	6	40	3	60	4	18,1	3	42,8	1	25
Reticulogênese	Grau	MF-0	3	14,3	8	53,3	1	20	3	13,6	0	0	1	25
		MF-1	11	52,4	4	26,7	1	20	9	40,9	5	71,4	3	75
		MF-2	6	28,6	2	13,3	2	40	7	31,8	2	28,5	0	0
		MF-3	0	0	1	6,7	1	20	3	13,6	0	0	0	0
		Peritrabecular	1	4,8	0	0	0	0	1	4,5	0	0	0	0
	Nicho	Perivascular	2	9,5	3	16,6	0	0	6	27,2	4	57,1	2	50
		PT,PV	6	28,6	0	0	3	60	8	36,3	1	14,2	1	25
		PT,PV,OB	8	38,1	4	20	1	20	4	18,1	2	28,5	0	0
Arcabouço ósseo		Remodelado	14	66,7	10	66,7	2	40	11	50	7	100	3	75
		Preservado	4	19	4	26,7	1	20	10	45,4	0	0	1	25
Eosinofilia		Presente	10	47,6	2	13,3	0	0	5	22,7	2	28,5	1	25
		Ausente	11	52,4	13	86,7	5	100	17	77,2	5	71,4	3	75
Subtipo de LMC		Gran	5	23,8	9	60	5	100	7	31,8	3	42,8	3	75
		Gran-Meg	16	76,2	6	40	0	0	15	68,1	4	57,1	1	25

MO: medula óssea; FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal; G:E: granulocítica: eritroide.

Tabela 2: Análise morfológica megacariocítica nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Dispoese de megacariócitos			Grupos									
			LMC resistente				LMC não resistente		LMC intolerante			
			Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento	
Atípias nucleares			FC+FCA (n = 21)	%	FC+FCA (n = 15)	%	n = 22	%	FC (n = 7)	%	FC+FCA (n = 4)	%
Hipolobulação	Quantidade	1+	5	23,9	6	40	4	18,1	2	28,6	1	25
		2+	10	47,6	7	46,6	12	54,5	5	71,4	2	50
		3+	6	28,5	2	13,3	6	27,2	0	0	0	0
	Nicho	PV	13	62	9	60	8	36,3	4	57,1	1	25
		PT	1	4,7	1	6,6	0	0	0	0	0	0
		PT,PV	7	33,3	4	26,6	11	50	3	42,9	2	50
		PT,PV,OB	0	0	1	6,6	3	13,6	0	0	0	0
Núcleos desnudos	Quantidade	1+	9	42,8	9	60	11	50	4	57,1	1	25
		2+	3	14,2	0	0	4	18,1	1	14,2	0	0
		3+	0	0	0	0	2	9	0	0	0	0
	Nicho	PV	7	33,3	7	46,6	10	45,4	3	42,9	1	25
		PT	1	4,7	0	0	1	4,5	2	28,6	0	0
		PT,PV	4	19	2	13,3	4	18,1	0	0	0	0
		PT,PV,OB	0	0	0	0	2	9	0	0	0	0
Núcleos em nuvem	Quantidade	1+	7	33,3	3	20	10	45,4	2	28,6	1	25
		2+	5	23,9	0	0	9	40,9	1	14,2	0	0
		3+	1	4,7	0	0	1	4,5	0	0	0	0
	Nicho	PV	8	38	3	20	11	50	3	42,9	1	25
		PT	2	9,5	0	0	1	4,5	0	0	0	0
		PT,PV	3	14,2	0	0	5	22,7	0	0	0	0
		PT,PV,OB	0	0	0	0	3	13,6	0	0	0	0
Micromegacariócitos	Quantidade	1+	8	38	2	13,3	5	22,7	2	28,6	2	50
		2+	0	0	1	6,6	6	27,2	1	14,2	0	0
		3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nicho	PV	6	28,5	2	13,3	6	27,2	3	42,9	2	50
		PT	2	9,5	1	6,6	2	9	0	0	0	0
		PT,PV	0	0	0	0	3	13,6	0	0	0	0
		PT,PV,OB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiper Cromasia		Presente	11	52,3	7	46,6	17	77,3	3	42,9	1	25
		Ausente	10	47,7	8	53,4	5	22,7	4	57,1	3	75
Formação de agregados de megacariócitos	Tipo	Coesos	5	23,8	3	20	1	4,5	2	28,6	0	0
		Frouxos	5	23,8	4	26,6	8	36,3	3	42,9	0	0
		F/C	6	28,5	3	20	6	27,2	1	14,2	2	50
	Quantidade	1+	8	38	7	46,6	9	40,9	3	42,9	1	25
		2+	4	19	2	13,3	1	4,5	3	42,9	1	25
		3+	4	19	1	6,6	5	22,7	0	0	0	0
	Nicho	PV	9	42,8	8	53,4	8	36,3	5	71,4	1	25
		PT	0	0	0	0	1	4,5	0	0	0	0
		PT,PV	5	23,8	1	6,6	6	27,2	1	14,2	1	25
	PT,PV,OB	2	9,5	1	6,6	0	0	0	0	0	0	

MO: medula óssea; FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal; G:E: granulocítica: eritroide.

Tabela 3 – Análise imuno-histoquímica de CD44 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle				
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento						
CD44		FC + FA (n = 21)		P	FC + FA (n = 15)		p	n = 5	P	n = 22	p	FC (n = 7)		p	FC + FA (n = 4)		p	n = 10
Localização	PV	9		0,011	1		0,043	1	0,336	9	0,035	3		0,019	1		ns	0
	PT	0			0			0		0		0						
	PT/PV	5			4			3		10		1	8					
	PV/PT/OB	5			9			1		3		2	1		2			
Intensidade	1+	0		< 0,001	0		0,552	0	0,494	12	< 0,001	4		< 0,001	1		ns	0
	2+	16			4			2		10		1	1		1			
	3+	3			10			3		0		1	1		9			
% de marcação	1-10%	8		0,208	5		0,428	2	0,42	18	0,002	5		0,06	1		ns	1
	11-30%	8			6			1		2		1	1		4			
	31-50%	2			2			0		2		0	0		2			
	51-70%	0			0			0		0		0	1		1			
	>70%	1			1			2		0		0	0		2			
Expressão	Presente	19		0,82	14		0,999	5	Ns	22	ns	6		0,853	3		ns	10
	Ausente	2			1			0		0		1	1		0			

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 4 – Análise imuno-histoquímica da expressão celular de HA nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle				
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento						
HA (expressão celular)		FC + FA (n=21)		P	FC + FA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=6)		p	FC + FA (n=4)		p	n = 10
Localização	PV	1	< 0,001	1	< 0,001	0	0,024	2	0,001	0	0,007	0	0,061	6				
	PT	0		0		0		0		0		0						
	PT/PV	11		2		3		8		2		2		3				
	PV/PT/OB	9		11		2		12		4		1		0				
Intensidade	1+	0	< 0,001	1	0,003	0	0,006	1	< 0,001	0	0,013	0	0,024	3				
	2+	7		3		1		5		2		1		6				
	3+	14		10		4		16		4		2		0				
% de marcação	1-10%	1	< 0,001	2	0,008	0	0,015	4	< 0,001	0	0,02	0	0,017	5				
	11-30%	2		1		1		0		1		0		4				
	31-50%	6		1		1		1		1		1		0				
	51-70%	7		6		3		9		1		1		0				
	>70%	5		4		0		8		3		1		0				
Expressão	Presente	21	0,7	14	0,999	5	0,999	22	0,681	6	0,997	3	0,999	9				
	Ausente	0		1		0		0		0		1		1				

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 5 – Análise imuno-histoquímica da expressão estromal de HA nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos														
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle		
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento				
HA (expressão estromal)		FC+FCA (n=21)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=6)	p	FC+FCA (n=4)	p	n = 10
Localização	PV	0	0,156	0	0,004	0	0,494	0	0,008	0	0,016	0	ns	0	ns	0
	PT	0		0		0		0		0		0				
	PT/PV	12		3		3		7		1		4		9		
	PV/PT/OB	9		11		2		15		5		0		1		
Intensidade	1+	0	< 0,001	0	0,001	0	0,004	2	0,002	0	0,03	1	ns	1	ns	3
	2+	7		4		1		5		3		2		7		
	3+	14		10		4		15		3		1		0		
% de marcação	1-10%	1	0,031	0	0,047	0	0,057	0	0,006	0	0,162	1	ns	1	ns	2
	11-30%	1		1		0		1		1		0		4		
	31-50%	3		2		0		3		0		1		2		
	51-70%	8		6		4		9		2		1		1		
	>70%	8		5		1		9		3		1		1		
Expressão	Presente	21	ns	14	0,999	5	ns	22	ns	6	ns	4	ns	4	ns	10
	Ausente	0		0		0		0		0		0		0		

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 6 – Análise imuno-histoquímica da expressão celular de HAS1 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle				
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento						
HAS1 (expressão celular)		FC+FCA (n=21)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=6)		p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10
Localização	PV	4	0,223	1	0,329	0	0,135	4	0,53	1	0,189	0	ns	2				
	PT	0		0		1		0		1								
	PT/PV	0		1		0		2		0		0						
	PV/PT/OB	2		0		1		1		2		0						
Intensidade	1+	5	0,997	2	ns	1	ns	6	0,936	3	ns	1	ns	3				
	2+	1		0		0		2		0		0						
	3+	0		0		0		0		0		0						
% de marcação	1-10%	5	0,998	2	ns	1	ns	7	0,997	2	0,998	1	ns	3				
	11-30%	0		0		0		1		0		0						
	31-50%	1		0		0		1		0		0						
	51-70%	0		0		0		0		0		0						
	>70%	0		0		0		0		0		0						
Expressão	Presente	6	0,999	2	0,61	1	0,997	8	0,996	3	0,79	0	ns	3				
	Ausente	15		13		4		14		3		3		7				

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 7 – Análise imuno-histoquímica da expressão estromal de HAS1 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																			
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle							
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento									
HAS1 (expressão estromal)		FC+FCA (n=21)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5		p	n = 22		p	FC (n=6)		p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10	
Localização	PV	4	0,1046	5	0,696	3	0,073	6	0,413	2	0,518	2	ns	1							
	PT	6		2		0		7		0		0		1							
	PT/PV	2		5		0		5		4		1		4							
	PV/PT/OB	0		1		3		2		0		0		1							
Intensidade	1+	9	0,43	13	ns	0	0,16	16	0,507	6	ns	2	ns	7							
	2+	3		0		0		4		0		1		0							
	3+	0		0		3		0		0		0		0							
% de marcação	1-10%	12	ns	12	0,996	0	ns	17	0,698	5	0,936	3	ns	7							
	11-30%	0		1		0		3		1		0		0							
	31-50%	0		0		0		0		0		0		0							
	51-70%	0		0		0		0		0		0		0							
	>70%	0		0		0		0		0		0		0							
Expressão	Presente	12	0,77	13	0,61	3	0,997	20	0,325	6	0,408	3	ns	7							
	Ausente	9		2		2		2		0		1		3							

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 8 – Análise imuno-histoquímica da expressão celular de HAS2 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle				
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento						
HAS2 (expressão celular)		FC+FCA (n=21)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=6)		p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10
Localização	PV	8	0,042	6	0,073	0	0,262	5	0,318	1	0,801	2	ns	2				
	PT	0		1		0		0		0		0						
	PT/PV	0		0		1		8		1		1		3				
	PV/PT/OB	2		0		0		0		0		0		1				
Intensidade	1+	10	ns	7	ns	2	ns	10	0,439	2	ns	3	ns	6				
	2+	0		0		0		2		0		0		0				
	3+	0		0		0		1		0		0		0				
% de marcação	1-10%	9	0,62	7	0,374	1	0,994	11	0,311	2	0,997	3	ns	4				
	11-30%	1		0		1		1		0		0		2				
	31-50%	0		0		0		1		0		0		0				
	51-70%	0		0		0		0		0		0		0				
	>70%	0		0		0		0		0		0		0	0			
Expressão	Presente	10	0,795	7	0,806	2	0,855	13	0,999	2	0,606	3	ns	6				
	Ausente	11		8		3		9		4		1		4				

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 9 – Análise imuno-histoquímica da expressão estromal de HAS2 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																		
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle						
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento								
HAS2 (expressão estromal)		FC+FCA (n=21)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=6)		p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10		
Localização	PV	4		0,997	1		0,098	0,996	0,603	8		0,072	2		0,072	2		ns	6	
	PT	0			1					0			1			2			0	
	PT/PV	1			0					0			5			0			1	
	PV/PT/OB	0			0					0			0			0			0	
Intensidade	1+	3		0,248	2		ns	ns	0,726	12		ns	4		ns	3		ns	8	
	2+	2			0					0			0			0			0	
	3+	0			0					0			2			0			0	
% de marcação	1-10%	4		0,999	2		0,998	0,998	0,998	13		0,999	4		0,999	3		ns	7	
	11-30%	1			0					0			1			0			0	
	31-50%	0			0					0			0			0			0	
	51-70%	0			0					0			0			0			0	
	>70%	0			0					0			0			0			0	
Expressão	Presente	5		0,01	2		0,003	0,333	0,607	14		0,998	4		0,998	3		ns	8	
	Ausente	16			13					3			8			2			1	

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 10 – Análise imuno-histoquímica da expressão celular de HAS3 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos															
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle			
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento					
HAS3 (expressão celular)		FC+FCA (n=19)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5	p	n = 22	p	FC (n=5)	p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10
Localização	PV	4	0,405	1	0,646	0	0,472	4	0,687	1	0,472	2	ns	1			
	PT	0		0		0		0		0		0					
	PT/PV	1		2		2		3		0		1		2			
	PV/PT/OB	1		0		0		1		1		0		1			
Intensidade	1+	2	0,435	1	0,459	0	0,759	4	0,223	0	0,759	1	ns	0			
	2+	2		1		0		2		0		0		2			
	3+	2		1		2		2		2		2		2			
% de marcação	1-10%	5	0,998	2	0,997	0	0,386	5	0,755	2	0,996	2	ns	3			
	11-30%	1		1		2		2		0		1		1			
	31-50%	0		0		0		1		0		0		0			
	51-70%	0		0		0		0		0		0		0			
	>70%	0		0		0		0		0		0		0	0		
Expressão	Presente	6	0,966	3	0,524	2	1	8	0,996	2	1	3	ns	4			
	Ausente	13		12		3		14		3		1		6			

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Tabela 11 – Análise imuno-histoquímica da expressão estromal de HAS3 nos grupos de LMC resistente, LMC não resistente e LMC intolerante

Imuno-histoquímica		Grupos																		
		LMC resistente						LMC não resistente		LMC intolerante				Controle						
		Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento		Crise blástica				Bx pré-tratamento		Bx pós-tratamento								
HAS3 (expressão estromal)		FC+FCA (n=19)		p	FC+FCA (n=15)		p	n = 5		p	n = 22		p	FC (n=5)		p	FC+FCA (n=4)		p	n = 10
Localização	PV	6	0,092	4	0,08	0	0,836	7	0,064	2	0,091	0	ns	0						
	PT	0		0		0		1		0		0								
	PT/PV	8		5		3		6		2		4		8						
	PV/PT/OB	4		4		2		4		1		1		2						
Intensidade	1+	4	0,084	2	0,198	0	1	11	0,004	1	0,336	0	ns	0						
	2+	7		5		1		3		1		2		2						
	3+	7		6		4		4		3		3		8						
% de marcação	1-10%	13	0,089	8	0,343	0	0,154	12	0,101	3	0,596	1	ns	4						
	11-30%	5		3		3		6		2		0		3						
	31-50%	0		2		2		0		0		1		1						
	51-70%	0		0		0		0		0		0		2						
	>70%	0		0		0		0		0		0		0	0					
Expressão	Presente	18	0,996	13	0,652	5	ns	18	0,387	5	ns		ns	10						
	Ausente	1		2		0		4		0		0		0						

FC: fase crônica; FCA: fase crônica de alto risco; PT: peritrabecular; PV: perivascular; OB: subosteal.

Conclusão final

A leucemia mieloide crônica foi a primeira neoplasia maligna a ser definida por metodologia citogenética, sendo pioneira na terapia alvo molecularmente direcionada com consequente mudança na história natural da doença. No entanto, a resistência constitui um entrave terapêutico, que apesar dos recentes e contínuos avanços, permanece um desafio.

Esse trabalho contribuiu para caracterização epidemiológica da LMC resistente e intolerante a partir da identificação da faixa etária média de cada grupo estudado. O predomínio da perda de resposta citogenética na resistência primária e da perda de resposta molecular na resistência secundária possibilitou maior compreensão a respeito do cenário molecular envolvido na quimiorresistência.

A análise morfológica identificou que a quantidade moderada de micromegacariócitos pode corresponder a um marcador protetor contra a resistência. A avaliação dos nichos medulares através de imuno-histoquímica para os marcadores CD44, HA, HAS2 e HAS3 revelou que o remodelamento do microambiente ocorre, sendo intensificado na resistência como reflexo da perpetuação da doença. A manutenção do microambiente maligno favorece a persistência da leucemogênese, especialmente das células-tronco leucêmicas, que são continuamente sustentadas pelos nichos disfuncionais, constituindo um impasse na obtenção da resposta molecular plena.

Portanto, a identificação precoce do desenvolvimento de resistência é essencial para a adoção de medidas terapêuticas ao diagnóstico com o intuito de impedir sua plena instauração, que, uma vez estabelecida, torna-se de difícil manejo e pode resultar em desfecho desfavorável. Dessa forma, a implementação da biópsia de medula óssea de maneira rotineira no momento do diagnóstico de LMC associada à imuno-histoquímica, uma técnica amplamente difundida nos laboratórios de Patologia, para avaliação dos marcadores CD44 e HAS2 nos nichos medulares, pode resultar em identificação antecipada de casos com potencial de desenvolver quimiorresistência. Consequentemente, torna-se possível a modificação no curso da doença a partir do direcionamento da terapia para um inibidor mais potente e específico. Dessa forma, evita-se o uso sucessivo de múltiplos inibidores até a obtenção da resposta clínica adequada, garantindo a continuidade do fornecimento e minimizando prejuízos financeiros ao sistema público de saúde, além da prevenção do impacto negativo na qualidade de vida, resultando em manutenção da boa evolução clínica e sobrevida prolongada.