FERNANDA SALLES SEGURO

**Estudo de interrupção de imatinibe em pacientes
portadores de leucemia mieloide crônica fase crônica,
com resposta molecular sustentada $\leq 0,01\%$
pela escala internacional**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Israel Bendit

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Seguro, Fernanda Salles

Estudo de interrupção de imatinibe em pacientes portadores de leucemia
mieloide crônica fase crônica, com resposta molecular sustentada $\leq 0.01\%$ pela
escala internacional / Fernanda Salles Seguro -- São Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Israel Bendit.

Descritores: 1.Leucemia mieloide crônica 2.Imatinibe 3.Descontinuação
4.Resposta molecular profunda 5.Reação em cadeia da polimerase em tempo real
6.Proteína de morte celular programada 1

USP/FM/DBD-273/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico essa tese à minha família que esteve junto comigo nesta jornada.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Nadyr, por todos os valores de vida e exemplo.

À minha irmã Patrícia, por escutar e compreender sempre.

Ao meu marido Wirandé e à minha filha Cecília, pela paciência e amor.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Israel Bendit, pela disposição, pela orientação e incentivo durante todos esses anos, que tornaram possível começar, desenvolver e concluir esse trabalho e desafio.

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa pela confiança e parceria.

Ao Prof. Dr. Vanderson Rocha pelo apoio e conselhos.

À Luciana Nardinelli e toda equipe do Laboratório de Biologia Tumoral do HC-FMUSP, cuja contribuição foi fundamental para a realização dos testes moleculares e por todos os ensinamentos.

Ao Dr. Felipe Maciel, amigo desde a residência, e Guilherme Oliveira do Laboratório de Citometria de Fluxo, pela disponibilidade e realização dos exames de imunofenotipagem.

A toda equipe da Pesquisa Clínica da Hematologia do HC-FMUSP, em especial, Maris Sugino e Alessandra Miguel que viabilizaram a estrutura de apoio para este estudo e, principalmente, pela amizade.

À Izabel Romano por ter tanto colaborado com a submissão ao CEP e CONEP.

Aos meus colegas e companheiros do Ambulatório de Leucemia Mieloide Crônica do ICESP Fernanda Santos, André Abdo, Thales Pereira e Andrezza Medina que contribuíram na execução do trabalho e com a sua fraterna convivência.

Aos meus amigos Marcela Silva, Wellington Silva e Helena Visnadi pelo afeto inestimável e pelo tempo compartilhados.

À minha amiga e colega Lidiane Rosa, que nos deixou tão precocemente, pela amizade e pela convivência.

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Principais	12
2.2 Objetivos Secundários.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Objetivos do tratamento da LMC.....	19
3.2 Recaída molecular após descontinuação de ITQ	19
3.3 Segurança e recuperação de resposta após recaída molecular	20
3.4 Recomendações de descontinuação de ITQ	21
3.5 Monitoramento da resposta molecular profunda.....	23
3.6 Exaustão linfocitária	24
3.6.1 Fatores imunológicos em LMC	27
4 RACIONAL DO ESTUDO	29
5 MÉTODOS	31
5.1 Desenho do estudo	32
5.2 Aspectos Éticos	32
5.3 Financiamento	32
5.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	33
5.4.1 Critérios de inclusão	33
5.4.2. Critérios de exclusão	33
5.5 Definição dos objetivos.....	34
5.6 Procedimentos do Estudo	34
5.6.1 Eventos Adversos e exames laboratoriais	34

5.6.2 Testes moleculares.....	35
5.6.2.1 Extração de RNA.....	36
5.6.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	37
5.6.2.3 Oligonucleotídeos para quantificação de número de transcritos BCR-ABL1	38
5.6.2.4 PCR em tempo real (qRT-PCR) para quantificação do transcrito BCR-ABL1	39
5.6.2.5 PCR digital para quantificação do transcrito BCR- ABL1	40
5.6.3 Citometria de Fluxo	40
5.7 Análise estatística.....	43
6 RESULTADOS	45
6.1 Seleção dos pacientes.....	46
6.2 Características dos pacientes selecionados	47
6.3 Avaliação de desfechos	49
6.4 Evolução da resposta molecular durante a fase de descontinuação	53
6.5 Recuperação da resposta após a reintrodução do imatinibe.....	57
6.6 Parâmetros hematológicos durante a fase de descontinuação.....	59
6.7 Eventos adversos	60
6.8 PCR digital.....	61
6.9 Resultado de citometria de fluxo.....	64
6.9.1 Resultado de análise de subpopulações de linfócitos T e NK	64
6.9.2 Análise da expressão de marcadores de exaustão linfocitária em linfócitos	66
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO.....	80
9 REFERÊNCIAS.....	82
10 ANEXOS	105

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BCR-ABL1</i>	Gene de fusão formado pela translocação do gene <i>Abelson</i> localizado no cromossomo 9 com o gene <i>BCR</i> (<i>breakpoint cluster region</i>) no cromossomo 22
CD	Grupo de diferenciação (do inglês: <i>cluster of differentiation</i>)
dPCR	Reação em cadeia da polimerase digital
EA	Evento adverso
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
ELTS	<i>EUTOS long-term survival</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
EUTOS	<i>European Treatment Outcome Study</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN	Interferon
IL-2	Interleucina 2
IS	Escala internacional (do inglês: <i>international scale</i>)
ITQ	Inibidor de tirosina quinase
LMC	Leucemia mieloide crônica
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

PD-1	Proteína de morte celular programada 1
Ph	Filadélfia (do inglês: <i>Philadelphia</i>)
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RCC	Resposta citogenética completa
RLT	Remissão livre de terapia
RM	Resposta molecular
RMC	Resposta molecular completa
RMM	Resposta molecular maior
RMP	Resposta molecular profunda
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLT	Sobrevida livre de terapia
TCR	Receptor de células T (do inglês: <i>T-cell receptor</i>)
TIM-3	Molécula 3 com domínios de mucina e imunoglobulina de linfócitos
TQ	Tirosina quinase
TREG	Linfócitos T reguladores

FIGURAS

Figura 1 -	Origem e estrutura da proteína BCR-ABL.....	4
Figura 2 -	Esquema hierárquico de exaustão de linfócitos T CD8+	27
Figura 3 -	Fluxograma de avaliações dos pacientes no protocolo	36
Figura 4 -	Definição de <i>gates</i> para separação de linfócitos T CD4+ e CD8+	42
Figura 5 -	Definição de <i>gates</i> para avaliar expressão de PD-1 e TIM-3 em linfócitos T	43
Figura 6 -	Fluxograma de avaliação de pacientes elegíveis para o protocolo no ambulatório	46
Figura 7 -	Sobrevida livre de terapia após 24 meses de descontinuação	49
Figura 8 -	Incidência cumulativa de recaída molecular após 24 meses de descontinuação	50
Figura 9 -	Incidência cumulativa de recaída molecular pela resposta molecular prévia.....	52
Figura 10 -	Transcritos <i>BCR-ABL</i> ^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4 que apresentaram recaída molecular (n=7)	53
Figura 11 -	Transcritos <i>BCR-ABL</i> ^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4,5 que apresentaram recaída molecular (n=6)	54
Figura 12 -	Transcritos <i>BCR-ABL</i> ^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4 que não apresentaram recaída molecular (n=4)	54
Figura 13 -	Transcritos <i>BCR-ABL</i> ^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4,5 que não apresentaram recaída molecular (n=13)	55
Figura 14 -	Transcritos <i>BCR-ABL</i> ^{IS} no terceiro ano de descontinuação, pós-estudo (n=17)	56
Figura 15 -	Recuperação da RMM após reintrodução de imatinibe	57
Figura 16 -	Recuperação da RM4 após reintrodução de imatinibe.....	58
Figura 17 -	Número de cópias de transcritos <i>BCR-ABL</i> por dPCR	63
Figura 18 -	Comparação da percentagem de células NK pela resposta molecular prévia e recaída molecular após descontinuação.....	65

Figura 19 -	Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4 e CD8 em pacientes em RLT e pacientes em uso de inibidor.....	66
Figura 20 -	Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4 com expressão de PD-1 e TIM-3	67
Figura 21 -	Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD8 com expressão de PD-1 e TIM-3	67

QUADROS

Quadro 1 -	Critérios de fase acelerada e crise blástica pela Organização Mundial de Saúde (OMS)	5
Quadro 2 -	Escore de risco para pacientes com LMC	6
Quadro 3 -	Resposta molecular por qRT-PCR em escala logarítmica e pela escala internacional	9
Quadro 4 -	Recomendações de descontinuação de ITQ pelo NCCN, ESMO e ELN	22

TABELAS

Tabela 1 -	Definições de resposta ao tratamento com qualquer ITQ em primeira linha pelo ELN, atualizado em 2020	9
Tabela 2 -	Taxa de perda de RMM em estudos de descontinuação	18
Tabela 3 -	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real e digital para quantificação do número de transcritos BCR-ABL1	38
Tabela 4 -	Sequência das sondas utilizadas na PCR em tempo real e digital para quantificação do número de transcritos BCR-ABL1	39
Tabela 5 -	Painel de anticorpos monoclonais	41
Tabela 6 -	Características dos pacientes que descontinuaram imatinibe (n=31)	48
Tabela 7 -	Análise univariada de fatores relacionados à recaída molecular.....	51
Tabela 8 -	Valores hematológicos durante a fase de descontinuação	59
Tabela 9 -	Eventos adversos do estudo	60
Tabela 10-	Resultado de qRT-PCR e dPCR de quinze pacientes com RM4	62
Tabela 11 -	Comparação das medianas dos valores absolutos de linfócitos T CD4, CD8 e NK antes da descontinuação (x10 ⁹ /L)	64
Tabela 12 -	Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4, CD8 e NK antes da descontinuação	64

Resumo

Seguro FS. *Estudo de interrupção de imatinibe em pacientes portadores de leucemia mieloide crônica fase crônica, com resposta molecular sustentada $\leq 0,01\%$ pela escala internacional* [tese]. São Paulo; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2020.

Introdução: A sobrevida livre de terapia (SLT) na leucemia mieloide crônica (LMC) é um novo objetivo de tratamento. Este estudo prospectivo da descontinuação do imatinibe visa avaliar a viabilidade e segurança da descontinuação do imatinibe em pacientes com resposta molecular profunda RM4 (BCR-ABL1 $<0,01\%$ IS). Também avaliamos a expressão de dois receptores de checkpoint, receptor de morte programada 1 (PD-1) e imunoglobulina de células T e proteína 3 contendo domínio de mucina (TIM-3), na população de células T de pacientes que permaneceram em remissão livre de terapia (RLT). **Métodos:** Este protocolo foi aprovado pelo comitê de ética local e registrado no Clinicaltrials.gov (NCT03239886). Os critérios de inclusão foram: idade ≥ 18 anos, fase crônica da LMC, tratamento com imatinibe de primeira linha por pelo menos 36 meses, RM4 por pelo menos 12 meses confirmada em três amostras, sem transplante anterior ou resistência à terapia. O imatinibe foi reiniciado quando duas amostras confirmaram a perda da resposta molecular maior (RMM). O *endpoint* primário foi a taxa de SLT em 24 meses de acompanhamento. As subpopulações de linfócitos foram mensuradas no sangue periférico por citometria de fluxo antes da descontinuação. Um painel de citometria de fluxo de seis cores incluindo os anticorpos CD45, CD3, CD4, CD8, PD-1 e TIM-3 também foi usado para estudar o fenótipo de exaustão de células T nesta população. **Resultados:** 31 pacientes foram incluídos no estudo de dez / 2016 a out / 2017. A idade média foi de 54 anos (29-95 anos), 58% do sexo masculino, 55% do escore de Sokal baixo, 65% com transcritos *BCR-ABL1* b3a2, 30% com uso prévio de interferon e 61% estavam em RM4,5. O tempo médio da terapia com imatinibe foi de 9,7 anos (3-14,9 anos), e o tempo médio de RM4 sustentada foi de 6,9 anos (1,6-10,3 anos). Um paciente morreu dois meses após a interrupção devido à insuficiência cardíaca (não relacionada à LMC ou ao protocolo). SLT em 24 meses foi de 54% (IC 95% 39-75). Treze pacientes (44%) perderam RMM, seis (46%) após seis meses de interrupção, e todos os pacientes recuperaram RMM após a reintrodução do imatinibe. O tempo médio para recuperar RMM e RM4 foi de um mês (1-5 m) e 2,4 meses (1-13 m). RM4 foi o único fator associado à recidiva molecular. A proporção de células NK e resposta molecular antes da descontinuação foram associadas a diferentes taxas de SLT. O fenótipo de exaustão de linfócitos T foi avaliado no grupo RLT (n = 17) durante o segundo ano de acompanhamento. O grupo controle (n = 13) era composto

de pacientes com RMM em uso de imatinibe. Os pacientes em RLT tiveram uma proporção mediana de células T PD-1 + TIM-3 - CD8 + de 31% (25-51) VS 19% (0,5-53) no grupo de controle. Nenhuma diferença foi observada nos linfócitos T PD-1 + TIM-3 + CD8 +, T PD-1- TIM-3- CD8 + e T CD4 +. Conclusão: Esta coorte apresentou uma mediana de RM4 sustentada acima de cinco anos, conforme recomendado pela maioria das diretrizes de descontinuação de ITQ. A SLT foi semelhante aos estudos anteriores e a RM4 foi associada à recidiva molecular. A proporção de células T PD-1 + TIM-3-CD8 + foi maior em pacientes sem ITQ do que naqueles que tiveram que retomar o ITQ. Mais estudos são necessários para avaliar se os ITQ levam à reversão da exaustão de células T.

Descritores: Leucemia mieloide crônica; Imatinibe; Descontinuação; Resposta molecular profunda; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Proteína de morte celular programada 1.

Abstract

Seguro FS. *Imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia chronic phase with a deep molecular response, BCR-ABL1 <0.01% IS* [thesis]. São Paulo; "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2020.

Background: Treatment-free survival (TFS) in chronic myeloid leukemia (CML) is a new treatment endpoint. This prospective study of imatinib discontinuation aims to evaluate imatinib discontinuation's feasibility and safety in patients with deep molecular response MR4 (BCR-ABL1 <0.01% IS). We also evaluated the expression of two checkpoint receptors, programmed death 1 (PD-1) and T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3), in the T cell population of patients who successfully remained in therapy-free remission (TFR). Methods: This protocol was approved by the local ethical committee and registered at the Clinicaltrials.gov (NCT03239886). The inclusion criteria were: age ≥ 18 years, CML chronic phase, treatment with first-line imatinib for at least 36 months, MR4 for at least 12 months confirmed with three samples, no previous transplant or resistance to therapy. Imatinib was restarted when two samples confirmed the loss of major molecular response (MMR). The primary endpoint was the rate of TFS at 24 months of follow-up. Lymphocyte subpopulations were counted in peripheral blood by flow cytometry before discontinuation. A 6-color flow cytometry panel including CD45, CD3, CD4, CD8, PD-1, and TIM-3 antibodies was also used to study the T cell exhaustion phenotype in this population. Results: 31 patients were included in the study from Dec/2016 until Oct/2017. The median age was 54 years (29-95y), 58% male, 55% low Sokal score, 65% with b3a2 BCR-ABL transcripts, 30% with prior use of interferon, and 61% were in MR4.5. Imatinib therapy's median time was 9.7 years (3-14.9 y), and the median time of sustained MR4 was 6.9 years (1.6-10.3y). One patient died two months after discontinuation due to cardiac heart failure (not related to CML or the protocol). TFS at 24 months was 54% (95% CI 39-75). Thirteen patients (44%) lost MMR, six (46%) after six months of discontinuation, and all patients recovered MMR after imatinib was restarted. The median time to recover MMR and MR4 was one month (1-5 m) and 2.4 months (1-13 m). MR4.0 was the only factor associated with molecular relapse. The proportion of NK cell and molecular response before discontinuation was associated with different rates of TFS. T cell exhaustion was evaluated in the TFR group (n=17) during the second year of follow up. The control group (n=13) were patients with MMR on imatinib. Patients in TFR had a median proportion PD-1+TIM-3-CD8+ T cells of 31% (25-51) vs 19% (0.5-53) in the control group. No differences were observed in the PD-

1+TIM-3+CD8+ T cells, PD-1-TIM-3-CD8+ T cells, and CD4+ T cells. Conclusion: This cohort has a median duration of sustained MR4 above five years, as recommended by most TKI discontinuation guidelines. TFS was similar to the previous studies, and MR4 was associated with molecular relapse. PD-1+Tim-3-CD8+ T cells proportion was higher in patients free of TKI than those who had to resume the TKI. Further studies are needed to evaluate whether TKI mediates the reversion of T cell exhaustion.

Descriptors: Chronic myeloid leukemia; Imatinib; Discontinuation; Deep molecular response; Quantitative real-time PCR; PD-1 receptor.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

De acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer, 10.810 pessoas serão diagnosticadas com leucemia no Brasil no ano de 2020 ⁽¹⁾. Estima-se que 15% dos casos serão de leucemia mieloide crônica (LMC), com uma incidência aproximada de um para cada 100.000 habitantes. Desde a introdução do imatinibe há 20 anos ⁽²⁾, primeiro inibidor de tirosina quinase (ITQ), a sobrevida dos pacientes com LMC vem se aproximando da população geral ⁽³⁾.

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa crônica caracterizada pelo aumento de células da linhagem granulocítica na medula óssea com presença de maturação dos elementos celulares ⁽⁴⁾. A suspeita diagnóstica é feita quando o paciente apresenta hemograma com aumento de leucócitos e desvio à esquerda, ou seja, presença de elementos imaturos na periferia (bastonetes, metamielócitos, mielócitos, promielócitos e mieloblastos), além de basofilia e eosinofilia. Os pacientes podem apresentar sintomas clínicos como febre, emagrecimento, aumento do volume abdominal (esplenomegalia) e fadiga.

As primeiras descrições de pacientes com LMC foram feitas no século XIX ⁽⁵⁾. Em 1960, na Universidade da Pensilvânia, Peter Nowell e David Hungerford descreveram a presença de uma cópia menor do cromossomo 22 em células de pacientes com quadro clínico de LMC ⁽⁶⁾. Esta anormalidade foi denominada de cromossomo Filadélfia (Ph) e pela primeira vez uma alteração genética específica foi correlacionada com uma doença neoplásica.

Com a técnica de bandeamento cromossômico, Janet Rowley conseguiu caracterizar, em 1973, que o cromossomo Ph representava uma deleção no braço longo do cromossomo 22 e que a região removida era adicionada ao braço longo do cromossomo 9 ⁽⁷⁾. Este achado sugeria que o fenômeno observado era uma translocação cromossômica envolvendo os braços longos dos cromossomos 9 e 22.

Na década de 70, foram identificados o vírus da leucemia murínica de Abelson (*v-ABL*), que possuía a característica de ser oncogênico ⁽⁸⁾, e o seu homólogo normal humano, *c-ABL*, localizado no braço longo do cromossomo 9 na mesma região translocada para o cromossomo 22 em pacientes com LMC ⁽⁹⁾ (Figura 1).

No cromossomo 22, a região de quebra foi denominada *breakpoint cluster region* (*BCR*) que, nos paciente com LMC, ocorre mais frequentemente nos éxons 13 e 14, produzindo os transcritos b2a2 (e13a2) e/ou b3a2 (e14a2) ⁽¹⁰⁾. Demonstrou-se que a fusão dos genes *BCR* e *ABL* era capaz de produzir um RNA mensageiro, bem como que a proteína transcrita BCR-ABL1 apresentava atividade de tirosina quinase com potencial leucemogênico em modelos animais ^(11–13). Esta proteína é capaz de ativar vias de sinalização intracelular como RAS e STAT5, tendo como efeitos aumento da proliferação celular, diminuição de apoptose das células-tronco hematopoiéticas e geração de instabilidade genômica, que resultam na progressão da doença ^(14, 15).

Fonte: adaptado de Weinberg, Robert. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2007.⁽¹⁶⁾

Figura 1 - Origem e estrutura da proteína BCR-ABL

Sem tratamento, a LMC apresenta uma evolução trifásica, sendo cada fase definida por características clínicas e laboratoriais ⁽¹⁷⁾ descritas no Quadro 1. Aproximadamente 85% dos pacientes são diagnosticados em fase crônica que sem tratamento efetivo pode evoluir para fase acelerada e/ou crise blástica no período de três a cinco anos. Nas fases avançadas, os pacientes apresentam piora dos sintomas clínicos, aumento de blastos, sinais de falência medular e sobrevida inferior a dois anos.

Quadro 1 - Critérios de fase acelerada e crise blástica pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

Fase acelerada
<ul style="list-style-type: none">● Persistência ou aumento de leucócitos ($>10 \times 10^9/L$), não responsivo à terapia● Persistência ou aumento de esplenomegalia, não responsivo à terapia● Persistência de trombocitose ($>1.000 \times 10^9/L$), não responsiva à terapia● Persistência de trombocitopenia ($<100 \times 10^9/L$), não relacionada à terapia● 20% ou mais de basófilos em sangue periférico● 10-19% de blastos em sangue periférico e/ou medula óssea● Anormalidade cromossômica adicional em células Ph-positivas ao diagnóstico: duplo cromossomo Ph, trissomia do cromossomo 8, isocromossomo 17q, trissomia do cromossomo 19, cariótipo complexo e anormalidades no 3q2● Qualquer anormalidade cromossômica adicional em células Ph-positivas durante o tratamento
Crise blástica
<ul style="list-style-type: none">● 20% ou mais de blastos em medula óssea● Proliferação de blastos extramedular

Fonte: adaptado de *WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2, 2017*. ⁽¹⁸⁾

Os pacientes com LMC fase crônica podem ser estratificados por grupos de risco por diferentes escores (Quadro 2). O primeiro escore para LMC foi o índice de Sokal ⁽¹⁹⁾, que avaliou 813 pacientes tratados com bussulfano e hidroxiureia. O escore de Hasford ou EURO também foi elaborado na década de 80, quando os pacientes eram tratados com interferon ⁽²⁰⁾. Embora tenham sido publicados antes da incorporação de ITQ no tratamento, mostraram-se úteis até hoje para avaliação de desfechos em pacientes tratados com ITQ em primeira e em segunda linhas. Após a introdução dos ITQ, foi publicado o escore EUTOS (*European Treatment and Outcome Study for CML*), com o objetivo de avaliar a chance de alcançar resposta citogenética completa (RCC) aos 18 meses de tratamento ⁽²¹⁾. Diferente dos escores

anteriores, que consideravam múltiplas variáveis, o escore EUTOS é calculado com apenas duas: tamanho de baço e percentagem de basófilos. Posteriormente, foi proposto o escore ELTS (*EUTOS long-term survival*) para avaliar o risco de morte por LMC ⁽²²⁾.

Quadro 2 - Escores de risco para pacientes com LMC

Escore	Fórmula de cálculo	Definição de risco
Sokal	$\text{Exp}(0,0116 \times (\text{idade}[\text{anos}] - 43,3)) + (0,0345 \times (\text{baço}[\text{cm}] - 7,51) + (0,188 \times ((\text{plaquetas}[10^9/\text{L}]/700)^2 - 0,563)) + (0,0887 \times (\text{blastos}[\%] - 2,1))$	<0,8: baixo 0,8-1,2: intermediário >1,2: alto
Hasford	$(0,6666 \times \text{idade}[0 \text{ se idade} < 50 \text{ anos}; 1 \geq 50 \text{ anos}]) + (0,042 \times \text{tamanho do baço}[\text{cm}]) + (0,0584 \times \text{blastos}[\%]) + (0,0413 \times \text{eosinófilos}[\%]) + (0,2039 \times \text{basófilos}[0 \text{ se basófilos} < 3\%; 1 \text{ se } \geq 3\%]) - (1,0956 \times \text{plaquetas}[0 \text{ se plaquetas} < 1500 \times 10^9/\text{L} \text{ ou } 1 \text{ se } \geq 1.500 \times 10^9/\text{L}]) \times 1.000$	≤ 780 : baixo 781-1.480: intermediário >1.480: alto
EUTOS	$(7 \times \text{basófilos}[\%]) + (4 \times \text{baço}[\text{cm}])$	<87: baixo ≥ 87 : alto
ELTS	$0,0025 \times (\text{idade}/10)^3 + 0,0615 \times \text{baço}[\text{cm}] + 0,1052 \times \text{blastos}[\%] + (\text{plaquetas}[10^9/\text{L}]/1.000)^{-0,5}$	1,5680: baixo 1,5680-2,2185: intermediário >2,2185: alto

Fonte: adaptado de Sokal et al., 1984 ⁽¹⁹⁾; Hasford et al, 1998 ⁽²⁰⁾; Hasford et al., 2011 ⁽²⁰⁾; Pfirrmann et al., 2020 ⁽²²⁾.

Até a introdução dos ITQs, o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas foi o tratamento de escolha para todos os portadores de LMC que tivessem doador disponível e condições clínicas para o procedimento ^(23, 24).

Hidroxiureia e agentes alquilantes, como bussulfano, foram utilizados até a década de 80 para controle hematológico, porém estas drogas não alteravam a história natural da doença ⁽²⁴⁾.

Somente com o uso de interferon (IFN) recombinante, alguns pacientes conseguiram alcançar resposta citogenética e molecular com aumento da sobrevida ⁽²⁵⁻²⁷⁾. Nas décadas de 80 e 90, vários grupos começaram a estudar compostos capazes de inibir proteínas da classe tirosina quinases (TQ). Estudos pré-clínicos, demonstraram que o composto STI571 era capaz de inibir algumas TQs, dentre as quais a proteína BCR-ABL em modelos experimentais ⁽²⁾.

Posteriormente, este composto foi denominado imatinibe, com nome comercial de Glivec. O estudo de fase um, em pacientes com LMC, iniciou-se em 1998. A resposta hematológica completa foi alcançada por 98% e 55% dos pacientes em fase crônica e crise blástica, respectivamente ⁽²⁸⁾. Com bom perfil de tolerância, o imatinibe foi aprovado para uso comercial após o estudo de fase dois ⁽²⁹⁾.

O primeiro estudo randomizado multicêntrico com imatinibe foi o *International Randomized Study of Interferon and STI571* (IRIS), que recrutou 1.106 pacientes com LMC fase crônica ao diagnóstico ⁽³⁰⁾. Em um braço, os pacientes receberam imatinibe 400 mg por dia e, no outro, IFN com citarabina, que, até então, era o tratamento de primeira linha.

Com dezoito meses de seguimento, a taxa de RCC, ausência de cromossomo Ph em amostra de medula óssea, foi de 76% (IC95% 72,5-80%) no grupo do imatinibe e 14,5% (IC95% 10,5-18,5%) no grupo controle. O estudo permitia troca de tratamento e 65% dos pacientes tratados com IFN e citarabina receberam posteriormente imatinibe.

Após dez anos de seguimento, este estudo mostrou sobrevida global (SG) de 83% (IC95% 80-87%) para pacientes tratados em primeira linha com imatinibe. Neste grupo, a taxa de progressão para fases avançadas foi de 7% e 51 pacientes (9%) descontinuaram o imatinibe por um evento adverso sério. Aproximadamente 15% dos pacientes tratados com imatinibe foram descontinuados por resposta insatisfatória.

Tão importante quanto o desenvolvimento dos ITQs, a padronização dos testes de monitoramento e as definições de respostas ao tratamento também foram significativas para o sucesso da terapia dos pacientes com LMC ^(31, 32). A resposta hematológica completa é definida como ausência de esplenomegalia ao exame físico, níveis de leucócitos inferiores a $10 \times 10^9/L$ sem elementos imaturos, basófilos inferiores a 5% e plaquetas inferiores a $450 \times 10^9/L$. A resposta citogenética é avaliada pela percentagem de células com cromossomo Ph em medula óssea, com avaliação de pelo menos 20 núcleos celulares. A resposta molecular é avaliada pela reação da cadeia polimerase em tempo real (qRT-PCR), que permite quantificação dos níveis de transcritos *BCR-ABL1* em sangue periférico ⁽³³⁾.

Inicialmente, o grau de resposta molecular baseava-se na queda de transcritos comparados com amostras de pacientes ao diagnóstico e utilizava-se uma escala logarítmica ⁽³⁴⁾. Com o objetivo de estabelecer comparabilidade de resultados de quantificação do *BCR-ABL1* pela técnica de qRT-PCR entre laboratórios, foi criada uma escala internacional (IS) para padronização do resultado ^(35–38). Um fator de correção, após validação por um centro de referência, é atribuído para cada laboratório, com a finalidade de uniformizar a relação de transcritos *BCR-ABL1* e transcritos do gene controle (Quadro 3).

Quadro 3 - Resposta molecular por qRT-PCR em escala logarítmica e pela escala internacional

Escala logarítmica	Escala internacional	Definição
3log (RM3)	$BCR-ABL^{IS} < 0,1\%$	Resposta molecular maior (RMM)
4log (RM4)	$BCR-ABL^{IS} < 0,01\%$	Resposta molecular profunda (RMP)
4.5log (RM4,5)	$BCR-ABL^{IS} < 0,0032\%$	
5log (RM5)	$BCR-ABL^{IS} < 0,001\%$	

Fonte: adaptado de Hochhaus et al., 2020.⁽³¹⁾

Os pacientes com LMC que iniciam tratamento com ITQ são avaliados a cada três meses. O *European Leukemia Net* (ELN) faz recomendações sobre como classificar a resposta e divide em três categorias: ótima, alerta e falha ⁽³¹⁾. As definições de resposta são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Definições de resposta ao tratamento com qualquer ITQ em primeira linha pelo ELN, atualizado em 2020

Tempo de tratamento	Ótima	Alerta	Falha
Basal	-	ACA alto risco ELTS alto risco	-
3 meses	$BCR-ABL^{IS} \leq 10\%$	$BCR-ABL^{IS} > 10\%$	$BCR-ABL^{IS} > 10\%$ confirmada em 1-3 meses
6 meses	$BCR-ABL^{IS} \leq 1\%$	$BCR-ABL^{IS} 1-10\%$	$BCR-ABL^{IS} > 10\%$
12 meses	$BCR-ABL^{IS} \leq 0,1\%$ (RMM)	$BCR-ABL^{IS} 0,1-1\%$	$BCR-ABL^{IS} > 1\%$
Após 12 meses	$BCR-ABL^{IS} \leq 0,1\%$	$BCR-ABL^{IS} 0,1-1\%$ Perda RMM	$BCR-ABL^{IS} > 1\%$ Mutações <i>ABL</i> ACA alto risco

Abreviaturas: ACA, alteração citogenética adicional; ELTS, *EUTOS long-term survival*; RMM, resposta molecular maior.

Fonte: adaptado de Hochhaus et al., 2020.⁽³¹⁾

Para tratamento de pacientes intolerantes ou refratários ao imatinibe, estão aprovados no Brasil outros ITQs: nilotinibe, dasatinibe e ponatinibe. Em estudos pré-clínicos, o nilotinibe mostrou um potencial 10-30 vezes maior de ligação no domínio ABL comparado com o imatinibe ⁽³⁹⁾. Já o dasatinibe tem potencial 100 vezes maior e é capaz de inibir a maior parte das mutações do *ABL* resistentes ao imatinibe ⁽⁴⁰⁾. A mutação do *ABL* T315I só apresenta sensibilidade ao ponatinibe, sendo esta a principal indicação deste ITQ ⁽⁴¹⁾.

Como as células tronco leucêmicas apresentam baixa sensibilidade aos ITQs e não são erradicadas, pacientes com LMC são tratados por toda a vida ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Isto implica um custo significativo para o sistema de saúde ⁽⁴⁵⁾ e preocupação com os eventos adversos do tratamento de longo prazo, principalmente eventos cardiovasculares associados ao uso de ITQ de segunda e terceira gerações ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Portanto, vários grupos têm estudado a população de pacientes com respostas moleculares mais profundas (*BCR-ABL*^{IS} $\leq 0,01\%$ ou $\leq \text{RM4}$) e descontinuado o tratamento destes pacientes.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Principais

- a) Avaliação da sobrevida livre de terapia após 24 meses de descontinuação de imatinibe.
- b) Avaliação da recuperação da resposta molecular com a reintrodução de imatinibe, após recaída molecular.

2.2 Objetivos secundários

- c) Caracterizar fatores clínicos e laboratoriais associados à recaída molecular.
- d) Comparar o método de PCR digital para quantificação de transcritos *BCR-ABL1* em amostra indetectáveis pelo qRT-PCR.
- e) Avaliar a expressão dos receptores inibitórios PD-1 e TIM-3 em linfócitos T CD4 e CD8 de pacientes que alcançaram a remissão livre de terapia.

3 Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

Os primeiros estudos observacionais de descontinuação de tratamento em LMC avaliaram pacientes em uso de IFN com RCC sustentada ^(49, 50). Nestes estudos, mais de 50% dos pacientes não perderam a RCC após a descontinuação, sendo o menor tempo de RCC a variável que mais se correlacionou com a recaída citogenética. Também foi observado que alguns pacientes com transcritos *BCR-ABL1* detectáveis pelo qRT-PCR não apresentavam recaída, sugerindo que, mesmo com a persistência de células Ph-positivas, os pacientes não apresentavam recaída hematológica ⁽⁵¹⁾.

O primeiro estudo de descontinuação com imatinibe foi publicado em 2007 e incluiu doze pacientes com LMC em tratamento de primeira linha ⁽⁵²⁾. O critério de inclusão era resposta molecular completa (RMC), isto é, qRT-PCR indetectável por pelo menos dois anos confirmados por dois laboratórios distintos sem padronização pela escala internacional. Com 18 meses de seguimento, 50% dos pacientes (IC95% 21-79%) não apresentaram perda de resposta molecular, sendo que os seis casos de recaída ocorreram nos primeiros seis meses. Dez pacientes deste grupo haviam recebido tratamento prévio com IFN.

Em 2010, foi publicada a primeira análise interina do estudo STIM1 (Stop Imatinib), estudo multicêntrico que incluiu 100 pacientes com RMC por pelo menos 24 meses ⁽⁵²⁾. Neste estudo, RMC foi definida como uma queda maior de 5 log dos níveis de transcritos. O tempo de tratamento com imatinibe para inclusão foi igual ou superior a 36 meses. O monitoramento molecular foi realizado por um laboratório

central que seguia as recomendações do ELN, ainda sem a padronização pela escala internacional.

No primeiro ano de descontinuação, a avaliação molecular foi mensal e bimestral a partir do segundo ano. Todos os casos de recaída molecular, definidos como perda da RMC, foram confirmados por uma segunda amostra. Na primeira análise, com mediana de seguimento de 14 meses, 46 dos pacientes (IC95% 33-53%) sustentaram a RMC. A probabilidade de manutenção de RMC aos 12 meses foi de 43% (IC95% 33-53%).

Em uma atualização publicada em 2017 ⁽⁵³⁾, a sobrevida livre de recaída molecular aos 60 meses foi de 38% (IC95% 29-47%). As recaídas moleculares foram precoces, sendo 80% em até três meses, 15% de três a doze meses e 5% no segundo ano. Cinquenta e sete pacientes reiniciaram o tratamento e apenas dois não recuperaram a RMC. Não houve casos de progressão de doença e ocorreram quatro óbitos de causas não relacionadas à LMC.

Como potenciais fatores preditivos de recaída foram avaliadas as seguintes variáveis: idade, sexo, escores de Sokal e EUTOS, uso prévio de IFN, tempo de tratamento com imatinibe, tempo até a RMC e tempo de RMC. Na análise multivariada, somente Sokal de alto risco e tempo de tratamento com imatinibe (<54 meses) demonstraram serem fatores prognósticos independentes para recaída.

O estudo TWISTER adotou os mesmos critérios de inclusão do STIM1, porém a recaída molecular foi definida como perda da RMM em uma amostra ou duas amostras consecutivas com aumento de transcritos *BCR-ABL1* ⁽⁵⁴⁾. Neste estudo, a avaliação molecular seguiu a padronização pela escala internacional e como

inclusão o paciente deveria apresentar resposta molecular indetectável com sensibilidade de $4,5\log$ ou $BCR-ABL^{IS} < 0,0032\%$.

Quarenta pacientes foram incluídos no total com uma taxa estimada de remissão livre de terapia (RLT) aos 24 meses de 47% (IC95% 31-62%). Não houve óbitos, progressão de doença ou aparecimento de mutação do *ABL* no grupo de pacientes recaídos. Novamente, a maior parte dos pacientes (68%) apresentou perda de resposta nos primeiros seis meses e com recuperação após a reintrodução do imatinibe, sugerindo que seria viável aguardar a perda da RMM como critério para retratamento.

O estudo A-STIM (According to Stop Imatinib), que adotou os mesmos critérios de inclusão do STIM1, definiu como recaída molecular a perda da RMM em uma amostra ⁽⁵⁵⁾. Com 80 pacientes incluídos no total, a taxa de RLT aos 24 meses foi de 64% (IC95% 54-75%), comparável aos estudos anteriores que consideravam recaída somente a positividade do qRT-PCR.

O EURO-SKI (European Stop Kinase Inhibitor) é o maior estudo em andamento de descontinuação de ITQ em pacientes com LMC ⁽⁵⁶⁾. Trata-se de um estudo multicêntrico, não randomizado que incluiu 758 pacientes. Dentre os critérios de inclusão, exigia-se tratamento com ITQ por tempo mínimo de três anos e RM ($BCR-ABL^{IS} < 0,01\%$) por no mínimo 12 meses, confirmado por três amostras. Foi permitido uso de ITQ em segunda linha, desde que toxicidade e não resistência à primeira linha fosse o motivo da troca. O desfecho primário do estudo é sobrevida livre de recaída aos 36 meses.

Em análise interina publicada em 2018, com uma mediana de seguimento de 37 meses, 49% dos pacientes perderam a RMM, com uma incidência cumulativa de

recaída molecular de 39% (IC95% 35-42%) aos seis meses e 49% (IC95% 45-52%) aos 24 meses. Em concordância com os estudos anteriores, 80% das recaídas ocorreram nos primeiros seis meses. Foram reportados dez óbitos durante o estudo, sendo quatro em pacientes em RMM e nenhum relacionado à LMC.

Pelos resultados desta análise interina, mesmo adotando um critério menos rigoroso de RMP, não houve aumento de recaída molecular durante a descontinuação. Nesta análise publicada, não foi avaliado o nível de resposta molecular prévio antes da inclusão como fator de recaída. O tempo de resposta molecular profunda correlacionou-se com o sucesso da descontinuação, porém os escores de risco Sokal e EUTOS não se mostraram preditores de recaída molecular. Em uma subanálise deste estudo, demonstrou-se que o aumento da população de células natural killer (NK) maduras correlacionou-se com menores taxas de recaída molecular, indicando que fatores imunológicos inatos podem se associar ao sucesso da descontinuação ⁽⁵⁷⁾.

Na Tabela 2, são apresentados os estudos que adotaram a perda da RMM como critério de falha após a descontinuação.

Tabela 2 – Taxa de perda de RMM em estudos de descontinuação

Referência	N	Idade (anos)	ITQ	Uso de ITQ (meses)	RMP	Tempo RMP (meses)	Perda RMM aos 6 meses (%)	Perda RMM 24 meses (%)
Fujisawa et al. ⁽⁵⁸⁾	80	57	IM	45	RMC	27	25	39
Rousselot et al. ⁽⁵⁵⁾	80	55	IM	79	RM5	41	31	36
Mori et al. ⁽⁵⁹⁾	108	49	IM	103	RMC	26	27	48
Lee et al. ⁽⁶⁰⁾	90	56	IM	81	RM5	39	32	41
Takahashi et al. ⁽⁶¹⁾	68	55	IM	97	RM4.5	66	27	35
Saussele et al. ⁽⁵⁶⁾	758	60	IM/ NIL/ DAS	90	RM4	-	42	50

Abreviaturas: RMM resposta molecular maior, N número de pacientes, ITQ inibidor de tirosinaquinase, RM resposta molecular, RMP resposta molecular profunda, IM imatinibe, RMC resposta molecular completa, NIL nilotinibe, DAS dasatinibe

3.1 Objetivos do tratamento da LMC

A SG dos pacientes com LMC atualmente é estimada em 83-94% em cinco anos ^(30, 62). Estudos com ITQ de segunda geração, como nilotinibe e dasatinibe, demonstraram que estes medicamentos são capazes de induzir respostas moleculares mais profundas e mais rápidas quando comparados ao imatinibe em primeira linha, mas sem superioridade na SG ^(63, 64).

Embora SG e sobrevida livre de progressão (SLP) sejam objetivos principais no tratamento da LMC, a qualidade de vida, eventos adversos potencialmente sérios e elevado custo dos medicamentos são fatores que influenciam decisões de tratamento ^(45, 65, 66).

A maior parte dos pacientes (45-95%) apresenta algum evento adverso (EA) e os ITQ de segunda e terceira gerações podem causar EAs sérios a longo prazo como eventos cardiovasculares, oclusão arterial aguda e hipertensão pulmonar ^(30, 63, 64, 67).

Desde a publicação do estudo STIM1 em 2010, a descontinuação do tratamento tem sido avaliada com factível e segura para pacientes com bom controle de doença com ITQ. Portanto, a RLT tornou-se objetivo a ser alcançado no tratamento dos pacientes com LMC.

3.2 Recaída molecular após descontinuação de ITQ

Por ter sido o primeiro ITQ disponibilizado, os dados de descontinuação com imatinibe são mais robustos e com mais tempo de seguimento. Em uma primeira revisão sistemática de descontinuação ⁽⁶⁸⁾, com 509 pacientes tratados somente com

imatinibe, a taxa de recaída molecular foi de 51% (IC95% 44-58%; $I^2 = 55$), com 80% das recaídas nos primeiros seis meses de descontinuação. Foram incluídos nesta revisão somente estudos com critério de inclusão níveis de transcritos *BCR-ABL1* indetectáveis por qRT-PCR. Todos os pacientes desta publicação estavam vivos após dois anos de seguimento com um caso de progressão para crise blástica.

Em meta-análise publicada em 2020 ⁽⁶⁹⁾, foram avaliados mais de 3.000 pacientes que descontinuaram tratamento com ITQ em primeira ou segunda tentativa. Nesta publicação, demonstrou-se que a taxa média de recaída molecular decai ao longo do tempo: 35% nos primeiros seis meses, 8% de 6 a 12 meses, 3% no segundo ano e 3% após 24 meses.

3.3 Segurança e recuperação de resposta após recaída molecular

Nos estudos publicados, o ITQ foi reintroduzido para todos os pacientes que perderam RMM. Porém, em muitos casos, os pacientes reiniciaram tratamento com perda de RMP ou mesmo sem perda de resposta. Em meta-análise que avaliou apenas estudos que consideraram a perda de RMM ⁽⁷⁰⁾, 98% dos pacientes (IC95% 96-100%; $I^2 = 0$) recuperaram a RMM ao fim do período de seguimento. A recuperação da RMP ocorreu em 90% dos casos de recaída (IC95% 86-93%; $I^2 = 75\%$) ⁽⁶⁹⁾. Não há relato de pacientes que foram a óbito decorrente de LMC por descontinuação. Foram reportados dois casos de evolução para crise blástica já após a reintrodução de imatinibe ^(55, 71).

A descontinuação de ITQ pode levar a um quadro clínico denominado síndrome da retirada, caracterizado por dor muscular, fadiga e prurido ^(70, 72). Estes

sintomas ocorrem em 19-35% dos pacientes e regredem espontaneamente. Acredita-se que estes sintomas sejam decorrentes da inibição de outras proteínas, como PDGFR-alfa.

3.4 Recomendações de descontinuação de ITQ

A heterogeneidade entre estudos de descontinuação não permite validar fatores relacionados à recaída molecular. O tempo de RMP foi o único fator associado ao sucesso de descontinuação validado por diferentes estudos. Outras variáveis como escores de risco, tipo de transcrito *BCR-ABL1*, idade, sexo, uso de IFN e uso de ITQ de segunda geração não apresentaram significância em todas as publicações.

Já existem recomendações para a descontinuação de ITQ, porém não há um consenso sobre o tempo de uso prévio de ITQ, tempo de resposta molecular profunda e grau de resposta molecular profunda (Quadro 4).

Quadro 4 - Recomendações de descontinuação de ITQ pelo NCCN, ESMO e ELN

Critério	NCCN	ESMO	ELN
Fase	Crônica	Crônica	Crônica
Escore de Sokal	-	Baixo ou intermediário	-
Resposta prévia a ITQ	Sem resistência	Ótima pelo ELN	Sem resistência
Transcrito <i>BCR-ABL1</i>	Quantificável	Quantificável	b2a2 (e13a2) ou b3a2 (e14a2)
Duração de tratamento com ITQ	≥ 3 anos	≥ 5 anos	≥ 5 anos (≥ 4 anos se ITQ 2 ^a . Geração)
Resposta molecular profunda	$\leq$ RM 4 log	$\leq$ RM 4 log	$\leq$ RM 4 log
Duração RMP	≥ 2 anos	≥ 2 anos	≥ 2 anos
Definição de recaída	Perda RMM	-	
Sensibilidade RT-PCR	$\leq 4,5$ log ($\leq 0,0032\%$ ^{IS})	$\leq 4,5$ log ($\leq 0,0032\%$ ^{IS})	
Frequência de monitoramento	Primeiro ano: mensal 12-24 meses: a cada 2 meses Após 24 meses: a cada 3 meses	Primeiros 6 meses: mensal 6-12 meses: a cada 6 semanas Após 12 meses: a cada 3 meses	
Tempo para liberação de resultado	≤ 2 semanas	≤ 4 semanas	

Abreviaturas: ITQ, inibidor de tirosina quinase; ELN, European LeukemiaNet; RM, resposta molecular; RMP, resposta molecular profunda ($\leq$ RM4 ou $\leq 0,01\%$ ^{IS}); RMM, resposta molecular maior (RM3 ou $0,1\%$ ^{IS}); RT-PCR, reação de amplificação em tempo real.

A maior parte dos estudos publicados até o momento incluiu somente pacientes com RM4,5 (*BCR-ABL1*^{IS} $\leq 0,0032\%$) ou RM5 (*BCR-ABL1*^{IS} $\leq 0,0001\%$). Embora o EURO-SKI tenha adotado RM4 como critério de inclusão e as taxas de recaída molecular tenham sido semelhantes aos estudos publicados com RM4,5, a profundidade da resposta molecular não foi avaliada como um fator prognóstico.

3.5 Monitoramento da resposta molecular profunda

Um dos principais desafios para a incorporação de protocolos de descontinuação é a capacidade de laboratórios locais de monitorar a RMP. A padronização do método de qRT-PCR passa por várias etapas, como instrumentação e reagentes adequados, quantificação de ciclos e curvas de calibração com plasmídeos ^(73, 74). Portanto, a reprodutibilidade do método pode ser desafiadora.

Para quantificação de transcritos *BCR-ABL1* foi estabelecida uma escala internacional com o objetivo de padronizar o resultado entre diferentes laboratórios ^(33, 75, 76). Também foram publicadas recomendações internacionais para a quantificação de mRNA *BCR-ABL1* pela OMS ⁽⁷⁷⁾. O nível de resposta molecular é definido pela razão *BCR-ABL1*/controle interno, sendo os genes *BCR*, *ABL1* e *GUSB* recomendados para avaliação de resposta ao tratamento com ITQ ^(33, 75, 78).

No entanto, os estudos de descontinuação publicados foram realizados em centros que utilizaram majoritariamente o gene *ABL1* como controle e não há estudos que avaliem RMP e descontinuação com o *BCR* como controle interno. O racional para utilizar o *BCR* como controle interno é o fato de tanto *BCR* quanto *BCR-ABL1* apresentarem a mesma sequência promotora e serem transcritos em taxas semelhantes por diferentes células ⁽⁷⁹⁾.

Porém, em situação de alta carga tumoral, a expressão do *BCR* pode estar superestimada. Com a utilização da escala internacional, laboratórios que adotam diferentes controles internos podem ter o resultado comparáveis entre si ao aplicarem o fator de correção específico para cada centro. Porém, quanto menores os níveis de transcritos, as variações entre replicatas pode ser mais frequente ⁽³⁵⁾. Portanto, torna-

se importante avaliar se outros controles internos como *BCR* ou *GUSB* são viáveis para avaliação de RMP e protocolos de descontinuação de ITQ.

O método de PCR digital (dPCR) também pode ser utilizado para detecção e quantificação dos transcritos *BCR-ABL1* ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾. A vantagem desta metodologia em relação ao método de qRT-PCR é permitir uma quantificação absoluta, com maior sensibilidade, sem a necessidade de padronização de curvas e consequentemente, de maior reprodutibilidade ⁽⁸³⁾. Esta técnica baseia-se na diluição da amostra e distribuição em milhares de compartimentos, de tal maneira, que o número de cópias da molécula alvo varie de um a zero por compartimento e em cada um deles ocorra uma reação de PCR individual.

Assim como no qRT-PCR, com a utilização de sondas fluorescentes, será atribuído um resultado positivo ou negativo para cada compartimento, pela emissão do sinal. A quantificação não depende do número de ciclos e é feita somente ao final da reação de maneira direta. A determinação do número de cópias é estimada pela distribuição de Poisson.

3.6 Exaustão linfocitária

Um dos elementos principais do sistema imune adaptativo é a distinção entre o próprio e não próprio. O início deste processo se dá pelo reconhecimento e ligação do receptor do linfócito T (TCR) a um antígeno apresentado pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) presente na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC) ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾.

O desenvolvimento do linfócito T inicia-se no timo onde é gerado um variado repertório de células com diferentes TCRs. O primeiro processo de seleção ocorre ainda no timo onde as células com alta ligação aos antígenos próprios sofrem apoptose, com o objetivo de diminuir a população de linfócitos T autorreativos.

Após esta fase, as células imaturas passam a circular pelos diferentes tecidos onde serão expostas a antígenos não próprios ou, no caso de tumores, proteínas próprias mutadas. Mesmo após a seleção positiva e negativa, alguns TCRs podem ter reatividade cruzada com antígenos próprios levando a fenômenos autoimunes ^(87, 88).

As proteínas de checkpoint ou proteínas inibitórias participam de vias de regulação da resposta imunológica para prevenção da autoimunidade, sendo a primeira via descrita a da proteína T-linfócito-associada citotóxica 4 (CTLA-4) ^(89, 90). Para a ativação do linfócito T, além da ligação entre TCR e MHC são necessários sinais co-estimuladores. Por exemplo, na APC, o receptor B7.1(CD80) ou B7.2 (CD86) se ligam a molécula CD28 presente na superfície do linfócito T. A ligação de complexos B7-CD28 em níveis suficientes leva a proliferação do linfócito T, sobrevivência e produção de citocinas como IFN alfa (IFN), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-2 (IL-2).

O CTLA-4 é um homólogo do CD28, porém a sua ligação com B7 forma um complexo que inibe a ativação do linfócito T. O balanço entre complexos B7-CD28 e B7-CTLA-4 pode levar a ativação ou anergia do linfócito. A proteína de morte celular 1 (PD-1) faz parte da família do complexo B7-CD28, mas ao contrário do CTLA-4 que atua apenas na ligação entre APC e linfócito T, o PD-1 é expresso por linfócitos T, B e células da linhagem mielóide ^(91, 92). O PD-1 é capaz de regular células em estágios mais avançados da resposta imune. As células tumorais podem

aumentar a expressão de proteínas de checkpoint para escapar do sistema imunológico ^(91, 93).

Além do PD-1 e do CTLA-4, outras vias já foram descritas como gene 3 ativador de linfócito (LAG-3), molécula 3 com domínios de mucina e imunoglobulina de linfócitos T (TIM-3), atenuador de linfócito T (BTLA), 2B4, entre outras. TIM-3 é uma proteína transmembrana que pertence à superfamília das imunoglobulinas ^(94, 95). Sua estrutura é constituída por um domínio terminal da cadeia pesada da imunoglobulina, seguida por um domínio mucina, uma porção transmembrânica e uma cauda citoplasmática. Células de linhagem mieloide, células dendríticas, mastócitos e linfócitos podem expressar TIM-3. Já foi descrita sua expressão em células precursoras leucêmicas, porém não é expresso por células precursoras normais ⁽⁹⁶⁾.

No microambiente tumoral, pode ocorrer uma disfunção imunológica, sendo o linfócito T CD8+ a principal célula do sistema imune presente. A exposição antigênica contínua pode levar o linfócito T CD8+ a um estado de exaustão. Nesta condição, a célula tem uma perda hierárquica na expressão das citocinas efetoras IL-2, TNF e IFN (Figura 2).

A persistência deste fenômeno provoca a perda da atividade citolítica da célula e prejudica sua viabilidade e proliferação. A exaustão linfocitária foi demonstrada inicialmente em quadros de infecção crônicas virais, como hepatite C, e mais recentemente em tumores, quando há uma exposição persistente ao antígeno.

Fonte: adaptado de Wherry EJ. T cell exhaustion. Nature Immunol. 2011;12:493-9.⁽⁹⁷⁾

Figura 2 - Esquema hierárquico de exaustão de linfócitos T CD8+

3.6.1 Fatores imunológicos em LMC

Em pacientes com LMC ao diagnóstico, observa-se uma supressão do sistema imune inato e adaptativo ⁽⁹⁸⁾. As células mieloides imaturas promovem o recrutamento de células supressoras da resposta imune como linfócitos T reguladores, levando a disfunção de células NK e inibição da proliferação e ativação de linfócitos T ⁽⁹⁹⁾.

Esta desregulação de mecanismos de vigilância imunológica pode contribuir para progressão da doença ⁽¹⁰⁰⁾. Os ITQ, além de inativarem a proteína BCR-ABL1, exercem efeitos imunomodulatórios capazes de restaurar o sistema imune ⁽¹⁰¹⁾. Já foi demonstrado que, em pacientes ao diagnóstico, há aumento da expressão de PD-1 em linfócitos T CD4+ e CD8+ ^(102, 103).

Em estudo que avaliou perfil imunológico em medula óssea de pacientes com LMC ao diagnóstico, foi demonstrado que diminuição de linfócitos T CD4+, aumento de neutrófilos e aumento da população de linfócitos T CD8+ PD-1+ TIM-3- estavam relacionados com menor chance de alcançar RMP. Já foi demonstrado que pacientes que respondem a terapia com ITQ apresentam redução da população de linfócitos T CD8+ PD-1+ e que esta resposta é mais proeminente nos pacientes que atingem RM4 ^(102, 104). No entanto, não é conhecido o efeito da descontinuação na resposta imunológica dos pacientes que estão em RLT.

4 Racional do Estudo

4 RACIONAL DO ESTUDO

A maior parte dos estudos de descontinuação publicados até o momento incluiu somente pacientes com RM4,5 ($BCR-ABL1^{IS} \leq 0,0032\%$) ou RM indetectável. O estudo EURO-SKI adotou RM4 como critério de inclusão com taxas de recaída molecular aos seis meses semelhantes aos estudos publicados com respostas mais profundas. No entanto, não foi descrito se os pacientes apresentavam RM4, RM4.5 ou RM5 previamente.

O estudo proposto tem como objetivo primário avaliar a sobrevida livre de terapia em pacientes com LMC acompanhados no Complexo Hospitalar do HC-FMUSP e com monitoramento molecular realizado pelo Laboratório de Biologia Tumoral da mesma instituição desde o diagnóstico.

Portanto, trata-se de um grupo de paciente cujo status da resposta molecular prévia é conhecido e pode ser avaliado como uma variável para recaída molecular. Além disso, objetivou-se avaliar a segurança de um protocolo de descontinuação em que a perda de resposta era confirmada antes de se reiniciar tratamento. Não há estudos publicados que avaliem a descontinuação em pacientes com resposta molecular profunda, que utilizam o gene *BCR* como controle.

Ademais, há poucos estudos publicados em descontinuação executados no Brasil. Foram incluídos dois objetivos exploratórios: avaliação da técnica de PCR digital para avaliação de resposta molecular indetectável por qRT-PCR e avaliação de marcadores de exaustão linfocitária em pacientes que sustentam resposta molecular sem ITQ.

5 Métodos

5 MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectiva, braço único realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

5.2 Aspectos Éticos

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) e aprovado na Plataforma Brasil. CAAE 58781716.8.1001.0068. Também foi registrado no ClinicalTrials.gov: NCT03239886.

Todos os sujeitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo comitê de ética (Anexo 1).

5.3 Financiamento

Este estudo foi financiado por recursos da Disciplina de Hematologia do HC-FMUSP.

5.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

5.4.1 Critérios de inclusão

- Idade igual ou superior a 18 anos.
- Diagnóstico de leucemia mieloide crônica confirmado por citogenética e/ou PCR qualitativo para detecção do transcrito *BCR-ABL1*.
- Fase crônica definida pelos critérios do ELN 2013 e da OMS.
- RM4 sustentada por pelo menos 12 meses, em uso de imatinibe por pelo menos 3 anos.

5.4.2. Critérios de exclusão

- Pacientes submetidos à transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas.
- Uso prévio de outros ITQ, incluindo dasatinibe, nilotinibe, ponatinibe e bosutinibe.
- Escalonamento de dose de imatinibe durante o tratamento.
- Transcritos *BCR-ABL1* com quebras atípicas (b2a3 ou b3a3) não avaliáveis pela técnica de qRT-PCR.
- Presença de mutação no gene *ABL*.
- Fase acelerada ou crise blástica pelos critérios do ELN 2013 e da OMS.

5.5 Definição dos objetivos

Para avaliação dos objetivos principais, a sobrevida livre de terapia (SLT) foi mensurada a partir da data da descontinuação do imatinibe até a data da perda da RMM ou óbito ou censura (data do último exame de qRT-PCR). A taxa de recuperação da RMM, após a reintrodução do imatinibe, foi mensurada a partir da data da reintrodução do ITQ até data do primeiro exame com RMM ou RM4. Progressão para fase acelerada ou crise blástica ou necessidade de troca de ITQ também foram parâmetros utilizados para avaliar a segurança do protocolo.

Para comparação entre os grupos de pacientes (recaídos X não recaídos), foram avaliadas as seguintes variáveis: idade atual, sexo, escores prognósticos de Sokal e EUTOS, tipo de quebra do transcrito *BCR-ABL1*, uso prévio de IFN, tempo de diagnóstico, tempo de tratamento com imatinibe, tempo de RMM, tempo de RM4 e presença de RM4,5.

5.6 Procedimentos do Estudo

5.6.1 Eventos Adversos e exames laboratoriais

Exames laboratoriais de rotina como hemograma, bioquímica, perfil lipídico e glicemia foram coletados dos prontuários dos pacientes. Além disso, foi solicitado pela rotina um painel linfocitário T e NK por citometria de fluxo, antes de iniciar a descontinuação. Foram definidos e graduados de acordo com o Critérios de Terminologia Comuns do Instituto Nacional do Câncer Americano para Eventos

Adversos (NCI CTCAE v5.0) e foi estabelecida causalidade com a intervenção do estudo.

5.6.2 Testes moleculares

O monitoramento da resposta molecular do estudo foi feito no Laboratório de Biologia Tumoral do HC-FMUSP em amostras de sangue periférico, que utiliza o gene *BCR* como controle e segue as recomendações do ELN. A sensibilidade de detecção de transcritos *BCR-ABL1* foi de pelo menos 5log.

Para inclusão no estudo, foram necessários três exames confirmando a RM4 nos últimos 12 meses. No primeiro ano de seguimento, o qRT-PCR foi coletado mensalmente e a cada 2 meses no segundo ano. Se, em uma amostra o resultado *BCR-ABL1^{IS}*, fosse igual ou superior a 0,1%, o exame era repetido para confirmação de recaída. Em caso de confirmação de perda da RMM, o imatinibe foi reiniciado e a monitorização foi feita mensalmente até confirmação da recuperação da RMM (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma de avaliações dos pacientes no protocolo

5.6.2.1 Extração de RNA

Para a obtenção do botão de leucócitos, foram utilizados 20 mL de sangue periférico, colhidos em tubo contendo EDTA, e o mesmo volume de tampão de lise (1 mM NH_4HCO_3 ; 14 mM NH_4Cl). A solução foi então acondicionada em gelo e mantida em agitação por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, a solução foi submetida à centrifugação a 4°C, 1.077 g por 15 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e uma segunda lavagem foi realizada.

O sobrenadante foi novamente desprezado e o botão de leucócitos foi ressuspenso em 1 mL de Trizol™ Reagent (Invitrogen, USA). Então, foram

adicionados 200 μ L de clorofórmio e as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 4°C, 13.200 g por 15 minutos. A fase aquosa foi separada em um novo tubo e precipitada com isopropanol P.A. Após descanso de 10 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 13.200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugando-se as amostras a 4°C, 10.000 g por 5 minutos. O etanol foi descartado e a lavagem repetida. Após o descarte do etanol, o botão de RNA foi brevemente seco e ressuspendido em água MiliQ estéril com dietil pirocarbonato em volume proporcional ao tamanho e estocado em freezer -80°C.

A integridade do RNA obtido foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% para a visualização das bandas 18S e 28S referentes ao RNA ribossomal. Além disso, a concentração e a pureza foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA). Só foram utilizadas as amostras de RNA que apresentaram as bandas 18S e 28S íntegras.

5.6.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Após a extração de RNA, o cDNA foi sintetizado para que o qRT-PCR e dPCR fossem realizados e, para tanto, utilizamos o *kit* Super Script™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA).

Em um microtubo estéril e livre de nucleases, adicionamos água MiliQ autoclavada em volume proporcional ao volume de RNA necessário para que obtivéssemos 1 μ g de RNA. O volume final entre água e RNA não deve ultrapassar 10 μ L. Então, foram adicionados 2 μ L de uma solução 0,3 μ g/ μ L de

oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen, USA) e 1 µL de uma mistura de dNTPs na concentração de 10 mM (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP).

A solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e, logo após, colocada no gelo. Posteriormente, foram adicionados 5 µL do tampão 5X que acompanha a enzima, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima SuperScript III RT (200 U/µL). Foi realizada uma nova incubação a 25°C por 10 minutos, seguida de 42°C por 50 minutos e para finalizar, 70°C por 15 minutos. Após a síntese, o cDNA foi armazenado em freezer a -20°C.

5.6.2.3 Oligonucleotídeos para quantificação de número de transcritos

BCR-ABL1

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas no qRT-PCR e dPCR são apresentadas nas Tabelas 3 e 4 ⁽¹⁰⁵⁾.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real e digital para quantificação do número de transcritos *BCR-ABL1*

SEQUÊNCIA		
<i>BCR-ABL1</i> b2a2	senso	5' ATC CGT GGA GCT GCA GAT G 3'
	antisenso	5' CGC TGA AGG GCT TCT TCC TT 3'
<i>BCR-ABL1</i> b3a2	senso	5' GGG CTC TAT GGG TTT CTG AAT G 3'
	antisenso	5' CGC TGA AGG GCT TTT GAA CT 3'
<i>BCR</i>	senso	5' CCT TCG ACG TCA ATA ACA AGG AT 3'
	antisenso	5' CCT GCG ATG GCG TTC AC 3'

Tabela 4 - Sequência das sondas utilizadas na PCR em tempo real e digital para quantificação do número de transcritos *BCR-ABL1*

SEQUÊNCIA	
BCR-ABL1 b2a2	5' CCA ACT CGT GTG TGA AAC TCC AGA CTG TCC 3'
BCR-ABL1 b3a2	5' CAT CGT CCA CTC AGC CAC TGG ATT TAA GC 3'
BCR	5'TCC ATC TCG CTC ATC ATC ACC GAC A 3'

5.6.2.4 PCR em tempo real (qRT-PCR) para quantificação do transcrito***BCR-ABL1***

A quantificação do número de transcritos *BCR-ABL1* foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha), utilizando o sistema Taqman de sondas de hidrólise (Applied Biosystems, USA).

Para quantificarmos os transcritos *BCR-ABL1*, foram preparadas duas reações, uma para o gene alvo (quebra b3a2 ou b2a2) e outra para o gene de referência *BCR*. As sondas utilizadas foram marcadas com FAM (repórter) em 5'e QSY (*quencher*) em 3'. Cada amostra foi quantificada em duplicata, tanto para o gene alvo como para o gene interno, e a curva padrão, o controle negativo, o controle positivo e branco foram realizados em simplicatas em todas as corridas.

Para cada amostra, a reação foi realizada com volume final de 15µL da seguinte forma: Taqman Master Mix (Applied Biosystems, USA) sonda a uma concentração final de 0,1 µM, primer senso e antisenso a uma concentração final de 0,2 µM, 1,5 µL de cDNA e água estéril para um volume final de 15 µL. Os ciclos para a amplificação das amostras foram os seguintes: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, 1

ciclo a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

5.6.2.5 PCR digital para quantificação do transcrito *BCR-ABL1*

Para quantificarmos os transcritos *BCR-ABL1*, foram preparados dois chips. As sondas utilizadas foram marcadas com FAM (repórter) em 5' e QSY (*quencher*) em 3'. Para cada amostra, a reação foi realizada com volume final de 15 µL da seguinte forma: 1X de QuantStudio 3D Digital PCR MasterMix v2 (Thermo Fisher), sonda a uma concentração final de 0,1 µM, primer senso e antisenso a uma concentração final de 0,2 µM, 1,5 µL de cDNA e água estéril para um volume final de 15 µL.

Para quantificação do transcrito *BCR-ABL1*, o chip foi amplificado, utilizando-se o sistema ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: 10 minutos a 96°C, seguido por 39 ciclos de amplificação (56°C por 2 minutos e 98°C por 30 segundos), 60°C por 2 minutos e resfriamento a 10°C. Após a amplificação, a leitura do chip foi feita no equipamento QuatStudio 3D e analisado pelo software QuatStudio 3D Analysis Suite Cloud Software.

5.6.3 Citometria de Fluxo

Amostras de sangue periférico em EDTA foram utilizadas para o painel imunofenotípico dos marcadores de exaustão de linfócitos T. Foi utilizado um painel com seis anticorpos monoclonais em um único tubo (Tabela 5). As populações linfocitárias foram selecionadas imunofenotipicamente com base na expressão das moléculas CD3, CD4 e CD8.

Tabela 5 - Painel de anticorpos monoclonais

	AcMo/fluorocromo	Clone	Fonte Comercial	Volume
Linhagem hematológica	CD45 V500	HI30	BD	1µL
Linfócito T	CD3 FITC	HIT3a	Biolegend	1µL
	CD4 PERCP-CY 5.5	SK3	BD	5µL
	CD8 PE/Cy7	HIT8a	Biolegend	1µL
Receptor inibitório	PD-1 (CD279) APC	MIH4	BD	20µL
	TIM-3 (CD366) PE	7D3	BD	5µL

Alíquotas de 50 µL de amostra de SP previamente homogeneizado por inversão, na concentração de 0,5 a 2,0 x10⁶ células/mL, foram colocadas em tubo Falcon. Em seguida, foram acrescentados os anticorpos monoclonais descritos na tabela 1 (AcMo) conjugados com V500, FITC, PERCP-Cy 5.5, PE/Cy7, APC e PE em volumes titulados. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente e protegidos da luz por 15 minutos.

Após este período, as hemácias foram lisadas com 500 µL de solução de lise VersaLyse (Beckman Coulter, Marseille, France) e incubadas por mais 10 minutos. Foram adicionados 2 mL de PBS aos tubos, que foram homogeneizados e centrifugados a 28 g por 5 minutos em temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado por inversão e foi adicionado 350 µL de solução de PBS contendo 1% de paraformaldeído. A aquisição dos eventos foi feita no citômetro de fluxo Navios (Beckman Coulter), sendo adquiridos 100.000 eventos no total. A análise foi feita pelo software InfinicytTM versão 1.7. As estratégias de

gates para seleção da população de células a serem estudadas estão representadas nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Definição de *gates* para separação de linfócitos T CD4+ e CD8+

Figura 5 - Definição de *gates* para avaliar expressão de PD-1 e TIM-3 em linfócitos T

5.5 Análise estatística

Por tratar-se de um estudo piloto, foi realizada uma amostragem por conveniência.

As características dos pacientes foram descritas utilizando frequência (percentagem) para variáveis categóricas e mediana, média e desvio padrão para variáveis contínuas. Associação entre variáveis categóricas foram testadas pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, este último quando o N de algum grupo era inferior a cinco. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar variáveis

contínuas entre os grupos de pacientes recaídos e não recaídos. Para a comparação de três ou mais grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para estimar a sobrevida livre de recaída e incidência cumulativa de recaída molecular, foi utilizado o método de Kaplan Meier. Para comparação de sobrevida entre os grupos foi utilizado o teste de log-rank. Os valores de p foram considerados estatisticamente significativos, quando inferiores a 0,05 (bicaudal) com intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística e gráficos foram realizados utilizando os softwares GraphPad Prism versão 7, SPSS versão 21.0 e R versão 3.6.1.

6 Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Seleção dos pacientes

O recrutamento para o estudo foi feito de dezembro de 2016 a outubro de 2017. Para avaliação de pacientes elegíveis ao protocolo, foi realizada consulta ao banco de dados do ambulatório de LMC do ICESP e HC-FMUSP (Figura 6). Até o final do recrutamento, 536 pacientes estavam cadastrados no banco. Este banco de dados inclui pacientes tratados no serviço desde 2001.

Figura 6 - Fluxograma de avaliação de pacientes elegíveis para o protocolo no ambulatório

Do total de 536 pacientes tratados no serviço, 19% (n=103) apresentavam RM4 por pelo menos 12 meses e mais de três anos de tratamento com imatinibe. Duzentos cinquenta e três pacientes (47%) estavam em primeira fase crônica, porém não eram elegíveis a descontinuação. Os critérios de exclusão destes pacientes foram: troca de inibidor (n=111, 44%), ausência de resposta molecular profunda (n=73, 28,5%), menos de 3 anos de tratamento com imatinibe (n=51, 20%), transplante de células tronco hematopoiéticas (n=8, 3%), uso de dasatinibe e nilotinibe em primeira linha (n= 5, 2%), descontinuação prévia (n=4, 2%) e presença de mutação T315I (n=1, 0,4%).

6.2 Características dos pacientes selecionados

Sete pacientes foram convidados a participar e se recusaram. Trinta e um pacientes assinaram o TCLE e descontinuaram o tratamento com imatinibe, descritos na Tabela 6. No momento da descontinuação, a mediana da dose de imatinibe em uso era de 400 mg (300-600 mg). Catorze pacientes (47%) apresentavam RM5 (*BCR-ABL*^{IS} ≤0,0001%).

Tabela 6 - Características dos pacientes que descontinuaram imatinibe (n=31)

Variável	N=31
Mediana de idade ao diagnóstico em anos	40 (18-88)
Mediana de idade no início do protocolo em anos	56 (30-97)
Sexo feminino/ masculino	13 (42%) / 18 (48%)
Escore Sokal	
Baixo	17 (55%)
Intermediário	1 (3%)
Alto	0 (0%)
Dado faltante	13 (42%)
Escore EUTOS	
Baixo	17 (55%)
Alto	1 (3%)
Dado faltante	13 (42%)
Uso prévio de IFN	9 (29%)
Mediana de tempo de uso de IFN (n=9) em meses	18 (3-72)
Transcrito <i>BCR-ABL1</i>	
b2a2 (e13a2)	7 (23%)
b3a2 (e14a2)	20 (64%)
b2a2 e b3a2	4 (13%)
Mediana de tempo de diagnóstico em anos	10.1 (3,2-23,2)
Mediana de tempo de tratamento com imatinibe em anos	9,7 (3-14,9)
<i>BCR-ABL1</i>^{IS} ≤10% com 3 meses de tratamento	
Sim	21 (68%)
Não	1 (3%)
Dado faltante	9 (29%)
<i>BCR-ABL1</i>^{IS} ≤1% com 6 meses de tratamento	
Sim	28 (90%)
Não	1 (3%)
Dado faltante	2 (7%)
<i>BCR-ABL1</i>^{IS} ≤0,1% com 12 meses de tratamento	
Sim	26 (84%)
Não	1 (3%)
Dado faltante	4 (13%)
Mediana de tempo de RM3 em anos	8 (2-11)
Mediana de tempo de RM4 em anos	6.9 (1.6-10.3)
RM4,5	
sim	19 (61%)
não	12 (39%)
RM5	
sim	14 (45%)
não	17 (55%)

6.3 Avaliação de desfechos

Treze pacientes (42%) perderam a resposta molecular maior após a descontinuação do imatinibe. Todas as perdas de resposta foram confirmadas com uma segunda amostra, antes de reiniciar o tratamento com imatinibe. Um paciente evoluiu para óbito dois meses após o início do protocolo de causa não relacionada ao protocolo ou a LMC.

Nos primeiros seis meses de descontinuação, sete pacientes apresentaram recaída molecular, quatro recaíram entre 6-12 meses e dois pacientes recaíram no segundo ano de seguimento (Figura 7). Com incidência cumulativa de recaída molecular de 19% aos 6 meses, 32% aos 12 meses e 44% aos 24 meses (Figura 8).

Figura 7 - Sobrevida livre de terapia após 24 meses de descontinuação

Figura 8 - Incidência cumulativa de recaída molecular após 24 meses de descontinuação

Seis pacientes apresentaram uma primeira amostra com perda de RMM, porém não confirmada pela segunda amostra. O resultado de transcritos *BCR-ABL*^{IS} variou de 0,1-0,24% nestas primeiras amostras. Três destes pacientes não recaíram até o final do estudo. Estes resultados não confirmados ocorreram no segundo mês de seguimento em 5/6 casos e apenas um no 11º mês do protocolo. Na Tabela 7, é apresentado o risco relativo de recaída molecular pelas características dos pacientes.

Tabela 7 - Análise univariada de fatores relacionados à recaída molecular

Variável	Risco relativo	IC 95%	Valor <i>p</i>
Idade > 56 anos	0,59	0,19-1,81	0,4
Sexo masculino	0,57	0,36-3,37	0,9
Quebra b3a2	0,94	0,30-2,87	0,9
Uso prévio de IFN	0,36	0,08-1,6	0,2
RM4,5 prévia	0,32	0,10-0,97	0,03
Tempo de uso de imatinibe ≥ 10 anos	0,65	0,23-1,77	0,4
Tempo de RM3 ≥ 8 anos	0,53	0,17-1,64	0,3
Tempo RM4 ≥ 7 anos	1,25	0,41-3,72	0,7

Dentre as variáveis analisadas, somente RM4,5 prévia mostrou ser um fator relacionado a menor taxa de recaída molecular (Figura 9).

Figura 9 - Incidência cumulativa de recaída molecular pela resposta molecular prévia

6.4 Evolução da resposta molecular durante a fase de descontinuação

Nas Figuras 10 a 13, são apresentados os resultados de qRT-PCR ao longo do tempo dos pacientes estratificados pela RM prévia e por evolução durante a fase de descontinuação (recaída molecular ou não).

Figura 10 - Transcritos *BCR-ABL*^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4 que apresentaram recaída molecular (n=7)

Figura 11 - Transcritos *BCR-ABL1*^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4,5 que apresentaram recaída molecular (n=6)

Figura 12 - Transcritos *BCR-ABL1*^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4 que não apresentaram recaída molecular (n=4)

Figura 13 - Transcritos *BCR-ABL1*^{IS} durante a fase de descontinuação em pacientes com RM4,5 que não apresentaram recaída molecular (n=13)

Dentre os pacientes (n=17) que não apresentaram perda de RMM durante os 24 meses do estudo, apenas dois não apresentaram, em momento algum, níveis de transcritos *BCR-ABL*^{IS} superior a 0,01%, sendo que em média cada paciente apresentou quatro resultados acima deste valor e oito pacientes apresentaram em duas amostras consecutivas.

Após o final do estudo, os 17 pacientes que não apresentaram recaída molecular, continuaram o seguimento com monitoramento da resposta a cada três meses. Em agosto/2020, com mediana de 40 meses de seguimento (33-42 meses), não houve casos de recaída tardia (Figura 14).

Figura 14 - Transcritos *BCR-ABL*^{IS} no terceiro ano de descontinuação, pós-estudo (n=17)

6.5 Recuperação da resposta após a reintrodução do imatinibe

Todos os trezes pacientes que apresentaram recaída molecular reiniciaram o tratamento com imatinibe na dose em que utilizavam antes de entrarem no estudo. A mediana de tempo entre a coleta da primeira amostra de qRT-PCR e o início do retratamento foi de 42 dias (21-221 dias). Duas pacientes estavam gestantes quando perderam a RMM e foi aguardada a resolução da gestação antes da reintrodução do imatinibe, pelo risco teratogênico. As Figuras 15 e 16 mostram a recuperação da RMM e RM4 nos pacientes que falharam a descontinuação.

Figura 15 - Recuperação da RMM após reintrodução de imatinibe

Figura 16 - Recuperação da RM4 após reintrodução de imatinibe

Até agosto de 2020, nenhum paciente que apresentou recaída molecular necessitou de troca de inibidor ou apresentou perda de resposta ao tratamento.

6.6 Parâmetros hematológicos durante a fase de descontinuação

Durante a fase da descontinuação, foi coletado hemograma pelo menos a cada três meses dos pacientes (Tabela 8). Não houve variação dos valores de leucócitos, neutrófilos e linfócitos absolutos. No entanto, apenas dois pacientes não apresentaram aumento do nível de hemoglobina. Em média, o valor de hemoglobina elevou-se 1g/L (0,1-2,4g/dL) nos primeiros três meses de descontinuação.

Tabela 8 - Valores hematológicos durante a fase de descontinuação

	Basal	1-3 meses	4-6 meses	12 meses	24 meses	Valor p*
N pacientes	31	27	25	20	17	-
Hemoglobina (g/L)						
Mediana	124	142	139	140	141	<0,001
Mín-Máx	101-153	108-162	115-171	93-170	107-160	
Leucócitos (x10 ⁹ /L)						
Mediana	5,8	6,6	6,6	6,1	6,3	ns
Mín-Máx	3,6-11,7	2,9-13	2,8-12,1	3,9-10,7	2-10,5	
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)						
Mediana	3,2	3,5	3,5	3,3	3,7	ns
Mín-Máx	1,5-6,8	1,8-9,5	1,8-9,2	1,7-7,1	1-7,9	
Linfócitos (x10 ⁹ /L)						
Mediana	1,9	2	2	1,9	1,9	ns
Mín-Máx	0,8-3	0,9-3,3	0,85-2,8	0,9-3,1	0,9-3	
Plaquetas (x10 ⁹ /L)						
Mediana	185	207	212	216	207	ns
Mín-Máx	78-381	96-370	101-416	103-383	72-420	

Abreviaturas: Mín, mínimo; Max, máximo; ns, não significativo.

6.7 Eventos adversos

Foram documentados 41 eventos adversos durante a descontinuação do imatinibe, descritos na Tabela 9. Nove (29%) pacientes reportaram fadiga, mialgia ou prurido compatíveis com a síndrome de descontinuação. Apenas um paciente apresentou mialgia grau 2 com dificuldade de desempenhar atividades diárias com resolução do quadro após doze meses, sem terapias farmacológicas.

Tabela 9 - Eventos adversos do estudo

Evento	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Anemia	-	1 (3%)	-	-	-
Insuficiência cardíaca	-	-	-	-	1 (3%)
Infarto miocárdio	-	1 (3%)	-	-	-
Diarreia	1 (3%)	-	-	-	-
Pancreatite	-	-	1 (3%)	-	-
Fadiga	1 (3%)	-	-	-	-
Infecção	-	3 (10%)	-	-	-
Hiperglicemia	4 (13%)	4 (13%)	-	-	-
Hipertrigliceridemia	3 (10%)	-	1 (3%)	-	-
Dor muscular	-	1 (3%)	-	-	-
Mialgia	5 (16%)	2 (6%)	-	-	-
Cefaleia	1 (3%)	-	-	-	-
Isquemia cerebrovascular	-	1 (3%)	-	-	-
Perda gestacional	-	-	-	1 (3%)	-
Broncoespasmo	-	1 (3%)	-	-	-
Dermatite bolhosa	1 (3%)	-	-	-	-
Prurido	1 (3%)	-	-	-	-
Úlcera de pele	-	1(3%)	-	-	-
Tumor de pele	-	1 (3%)	-	-	-
Hipertensão	-	2 (6%)	1 (3%)	-	-
Trombose abdominal	-	1 (3%)	-	-	-

Piora de níveis glicêmicos e triglicérides foram observadas em mais de 10% dos pacientes, sendo que houve melhora em todos os casos que reiniciaram o imatinibe. Eventos metabólicos grau 2 foram documentados somente em pacientes que já apresentavam diabetes ou hipertrigliceridemia. Consideramos os eventos metabólicos e os sintomas de síndrome da retirada como relacionados ao estudo.

Um paciente de 56 anos foi a óbito no segundo mês de descontinuação por insuficiência cardíaca e broncopneumonia. Este paciente já apresentava antecedente de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca grau 2 pela classificação da New York Heart Association e fibrilação atrial. Este óbito não foi atribuído a LMC, pois o paciente estava em RMM e também não foi relacionado ao procedimento do estudo.

Uma paciente de 35 anos engravidou no segundo mês de descontinuação com perda da RMM concomitante. Fez uso de IFN a partir do segundo trimestre de gestação, sem perda de resposta hematológica e sem intercorrências até o final. A cesariana ocorreu com 39 semanas, com recém-nascido do sexo feminino saudável. O imatinibe foi iniciado após uma semana do parto e a paciente recuperou a RMM. Outra paciente de 29 anos apresentou gestação anembrionária no segundo mês de descontinuação.

6.8 PCR digital

Foram analisadas 15 amostras com pelo menos RM4 pelo qRT-PCR para avaliação por dPCR, sendo nove amostras indetectáveis. Um chip (amostra 6) não foi amplificado por dPCR. Estes resultados estão reportados na Tabela 10 e Figura 17.

Tabela 10 - Resultado de qRT-PCR e dPCR de quinze pacientes com RM4

Amostra	qRT-PCR			dPCR				
	Transcritos <i>BCR</i>	Transcritos <i>BCR-ABL1</i>	<i>BCR-ABL1/BCR</i> % IS	Amplificados	Não amplificados	Cópias/ μ L	IC cópias/ μ L	Precisão
1	807 000	0	Indetectável	17	33 038	18,5	13,8-24,8	34%
2	419 000	0	Indetectável	1	12 568	2,2	0,3-15,4	610%
3	394 000	0	Indetectável	2	17 330	1,5	0,4-6,1	299%
4	243 000	0	Indetectável	2	33 141	2,5	1,0-6,0	140%
5	369 000	0	Indetectável	2	16 648	1,6	0,4-6,3	300%
6	13 000	0	Indetectável	-	-	-	-	-
7	484 000	0	Indetectável	3	31 059	1,4	0,4-4,2	210%
8	413 000	0	Indetectável	3	27 098	6,3	3,3-12,1	92%
9	334 000	0	Indetectável	0	28 710	1,6	0,5-5,0	210%
10	386 000	3	0,0015	16	31 813	25,8	20-33,4	29%
11	283 000	3	0,0021	18	32 619	39,6	31,7-49,4	25%
12	224 000	12	0,0053	15	35 382	10,5	6,5-16,8	61%
13	271 000	6	0,0044	14	30 555	13,9	9,6-20,2	45%
14	403 000	9	0,0044	6	28 866	4,6	2,2-9,7	110%
15	442 000	146	0,065	8	33 131	14,3	10,2-19,8	39%

Figura 17 - Número de cópias de transcritos *BCR-ABL1* por dPCR

6.9 Resultado de citometria de fluxo

6.9.1 Resultado de análise de subpopulações de linfócitos T e NK

Analizamos os resultados do painel de linfócitos T e NK obtidos pela avaliação de rotina, realizada antes da descontinuação do imatinibe (Tabelas 11 e 12, Figura 18).

Tabela 11 - Comparação das medianas dos valores absolutos de linfócitos T CD4, CD8 e NK antes da descontinuação ($\times 10^9/L$)

	T CD4+	T CD8+	NK CD3-/CD56+
Grupo RLT (n=17)	0,825	0,418	0,289
Grupo com recaída molecular (n=13)	0,966	0,507	0,205
Valor de p^*	0,30	0,26	0,20

* teste U de Mann-Whitney U, bicaudal

Tabela 12 - Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4, CD8 e NK antes da descontinuação

	T CD4+	T CD8+	NK CD3-/CD56+
Grupo RLT (n=17)	45	22	15
Grupo com recaída molecular (n=13)	47	25	10
Valor de p^*	0,90	0,40	0,07

* teste U de Mann-Whitney, bicaudal

* Teste de Kruskal-Wallis

Figura 18 - Comparação da percentagem de células NK pela resposta molecular prévia e recaída molecular após descontinuação

6.9.2 Análise da expressão de marcadores de exaustão linfocitária em linfócitos T

A coleta do painel de marcadores de exaustão linfocitária foi realizada entre janeiro de 2019 a julho de 2019. Durante este período e após, nenhum paciente apresentou recaída molecular. Nos pacientes que coletaram a amostra após a reintrodução de imatinibe (grupo imatinibe, n=13), esta análise foi realizada com uma mediana de 19 meses após a reintrodução do tratamento (9-26 meses). Nos pacientes que estavam em RLT (grupo RLT, n=17) sem imatinibe, a coleta foi realizada com uma mediana de seguimento de 24 meses (18-27 meses). Nas Figuras 19 a 21, estão representadas as proporções de linfócitos T e expressão dos marcadores PD-1 e TIM-3.

Figura 19 - Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4 e CD8 em pacientes em RLT e pacientes em uso de inibidor

Figura 20 - Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD4 com expressão de PD-1 e TIM-3

- teste U de Mann-Whitney, bicaudal

Figura 21 - Comparação das medianas das percentagens de linfócitos T CD8 com expressão de PD-1 e TIM-3

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

A descontinuação de ITQ é recomendada somente para pacientes que estão com resposta molecular profunda, ou seja, com pelo menos RM4 ($BCR-ABL1^{IS} \leq 0,01\%$) sustentada. Em estudos que avaliaram pacientes com LMC tratados em primeira linha com imatinibe ^(30, 62), aproximadamente 65% dos pacientes continuavam em uso deste inibidor após dez anos de seguimento e 63-89% apresentavam resposta molecular profunda.

Na população de pacientes com LMC, tratados no HCFMUSP nos últimos 20 anos, encontramos 356 pacientes (66% do total) com LMC em primeira fase crônica e 103 pacientes com RMP (29%) em tratamento com imatinibe, considerando RM4 como critério de inclusão no protocolo. A incidência de RM4 na nossa casuística foi semelhante à taxa descrita por outros grupos com pacientes fora de estudos clínicos ^(106, 107).

O uso de ITQ de segunda geração em primeira linha possibilita que mais pacientes alcancem RMP e em menor período de tempo. Em cinco anos, estima-se que RM4,5 é alcançada por 52% dos pacientes tratados com nilotinibe, 42% com dasatinibe e 31-33% com imatinibe ^(63, 64). De fato, em casuística publicada por Etienne et al. ⁽¹⁰⁸⁾ com 27% dos pacientes tratados com ITQ de segunda geração em primeira linha, a incidência de RMP foi de 46% com uma mediana de sete anos de seguimento. Como no SUS, os ITQ de segunda geração não estão disponíveis para tratamento em primeira linha, optamos por não incluir pacientes que estavam em uso de nilotinibe ou dasatinibe.

Os pacientes incluídos no protocolo foram selecionados de acordo com a avaliação do médico do ambulatório. Certamente, há um viés de seleção da amostra, refletido pelo fato de que se trata de uma casuística com mediana de dez anos de tempo de diagnóstico e sete anos de RMP, e possivelmente com boa aderência ao tratamento e ao monitoramento.

Os escores de Sokal e EUTOS não estavam disponíveis em 42% dos casos, pela falta de descrição de tamanho de baço ao diagnóstico. No entanto, apenas um paciente apresentava Sokal alto risco e EUTOS intermediário, sugerindo que se tratou de uma população com características de bom prognóstico.

No estudo STIM1, o escore de Sokal foi um fator prognóstico para a recaída molecular. Em outros estudos que tiveram como critério de inclusão RM4 ^(56, 58), pacientes com Sokal intermediário ou alto representaram 43-56% do grupo avaliado, porém este não foi um fator para a recaída.

O escore de Sokal superestima a população de pacientes de alto risco quando comparado ao ELTS, que foi elaborado para estimar a probabilidade de sobrevida em população tratada com ITQ. Isto pode justificar a razão pela qual o Sokal não foi preditor de recaída, pois a maioria dos pacientes incluídos em estudos de descontinuação poderiam ser reclassificados como baixo risco por outros escores. A maior parte dos estudos incluiu apenas o escore de Sokal e, portanto, não é possível avaliar o impacto dos demais escores de risco em descontinuação.

Outra característica do grupo estudado que mostra ser de evolução favorável é o fato de que 90% dos pacientes apresentavam resposta ótima pelo ELN 2020 ⁽³¹⁾, quando consideramos os parâmetros de resposta molecular aos três, seis e doze meses de tratamento com imatinibe.

Em relação à quebra de transcrito *BCR-ABL1*, é relatado que o transcrito b3a2 (ou e14a2) está associado a maiores taxas de resposta ao tratamento, porém sem impacto na SG ^(109, 110). Este dado não é confirmado por todos os estudos, como mostrou o grupo alemão em casuística de 1.494 pacientes ⁽¹¹¹⁾, em que não houve diferença de resposta e sobrevida em pacientes com transcritos b3a2 ou b2a2 (ou e13a3) e, ainda, é descrito que com os métodos de monitoramento disponíveis a quantificação de transcritos b3a2 pode ser subestimada ⁽¹¹²⁾.

A prevalência de transcritos b3a2 em todos os pacientes tratados em nosso serviço é de 52% e, no estudo, estava presente em 64% dos nossos pacientes. Não foi observado que o tipo de transcritos *BCR-ABL1* foi significativo para recaída molecular, conforme já notado em outros estudos.

A taxa de recaída molecular e SLT aos 24 meses, encontrada na amostra, foram semelhantes ao descrito na literatura de 44% e 55% respectivamente. Porém, 6/13 das recaídas ocorreram após os primeiros seis meses. Em 10 estudos que tiveram como critério de recaída a perda da RMM, 89% de um total de 1.601 casos recaíram nos primeiros seis meses.

Uma justificativa para este achado pode ter sido o fato de que, neste estudo, para a reintrodução do imatinibe, a recaída molecular foi confirmada por duas amostras e não apenas uma. Foi observado que as amostras confirmatórias de seis pacientes não comprovaram a perda de RMM e isto ocorreu principalmente no segundo mês de seguimento. Três destes pacientes perderam a RMM posteriormente, porém, com esta estratégia, outros três pacientes continuaram sem ITQ até o final do estudo. Isto sugere que oscilações nos níveis de transcritos não são eventos raros (20% dos pacientes) e a confirmação do resultado pode evitar que pacientes sejam

considerados como recaídos e saíram dos protocolos de descontinuação precocemente.

Quando avaliamos os valores de transcritos dos pacientes que não recaíram nos 24 meses de seguimento, observamos que oito pacientes apresentaram duas amostras consecutivas com perda de RM4 e que apenas dois pacientes estiveram sempre abaixo da RM4. Isto mostra que os níveis de transcritos, mesmo em pacientes que não recaem, podem ter muita variação.

Também optamos por considerar a recaída molecular como a perda da RMM, e não a perda da RMP, no caso RM4. Como diversos estudos demonstraram segurança em aguardar a perda da RMM, a perda da RM4 não implicou maior risco de recaída ^(54, 55).

Este é o primeiro estudo de descontinuação em que o qRT-PCR adota como controle interno o gene *BCR*. Não observamos que o uso deste gene como controle interno influenciou os desfechos de recaída e segurança, quando comparados com outros estudos. No entanto, mesmo com a padronização pela escala internacional, é esperado que ocorra mais variações da quantificação de transcritos em situações de baixa carga tumoral ⁽³⁵⁾.

A estabilidade da resposta molecular profunda é considerada por muitos autores como um fator para manutenção da RMM em pacientes em uso de ITQ, bem como para recaída molecular em pacientes que estão em descontinuação ^(95, 110). Contudo, não observamos a estabilidade da resposta molecular na nossa amostra.

Pelas recomendações do NCCN e ELN ^(31 113), o monitoramento molecular dos pacientes deve ser mensal, nos primeiros seis meses de descontinuação e, então, bimestral até o final no primeiro ano. No estudo, foi importante ter monitorado os

pacientes mensalmente por doze meses, pois detectamos quase metade das recaídas após os seis meses.

Também é recomendado que o tempo entre a coleta do teste de qRT-PCR e a disponibilização do resultado seja inferior a 4-6 semanas. O tempo médio para coletar duas amostras e reiniciar o imatinibe foi de seis semanas, demonstrando que foi possível seguir as recomendações, incluindo dupla-verificação. Não há consenso na literatura sobre a frequência de monitoramento após os primeiros seis meses ⁽¹¹⁴⁾.

O tempo de RMP é até o momento o principal fator relacionado à recaída molecular após a descontinuação de ITQ ⁽⁵⁶⁾. Os pacientes incluídos no estudo apresentavam tempo médio de RMP de 6.9 anos e é recomendado que este tempo seja superior a dois ou três anos, dependendo do ITQ que o paciente está em uso ^(31, 115). Portanto, isso pode justificar o motivo pelo qual não identificamos tal fator como significativo para recaída molecular. O mesmo raciocínio se aplica ao tempo de tratamento com imatinibe e ao tempo de RMM.

Não há consenso quanto ao benefício da associação de IFN com ITQ no tratamento dos pacientes LMC. O estudo SPIRIT do grupo francês mostrou melhores taxas de resposta molecular em pacientes que receberam a combinação ⁽¹¹⁶⁾. Porém, o grupo alemão em estudo semelhante não mostrou este benefício clínico ⁽⁶²⁾. Há uma ressalva pelo fato de que a maioria dos pacientes apresenta eventos adversos com IFN e tem que suspender o uso definitivamente. No STIM1, mostrou-se menor recaída na população que havia feito uso prévio de IFN, o que não foi confirmado por outros estudos ^(56, 117).

Na nossa casuística, nove pacientes fizeram uso prévio de IFN antes de iniciar o tratamento com imatinibe e por um curto período de tempo. Não

conseguimos demonstrar que o uso de IFN foi significativo para a não recaída molecular.

Em estudo que avaliou pacientes em RMP monitorados por qRT-PCR com sensibilidade de $4,5\log$ ⁽⁶¹⁾, a recaída molecular foi significativamente inferior nos pacientes que apresentaram RM indetectável pelo método.

A sensibilidade dos testes de qRT-PCR realizados no nosso serviço foi superior a $5\log$ e foi possível estratificar a resposta molecular em RM4 ou RM4,5. Na nossa coorte, 39% dos pacientes não apresentavam RM4,5. Conseguimos demonstrar que pacientes com RM4,5 apresentaram menor taxa de recaída molecular comparados com pacientes que apresentavam somente RM4 e, ainda, que a recaída foi mais precoce nos pacientes com RM4.

Já é descrito que, mesmo em pacientes que alcançam RLT, há persistência de células leucêmicas detectáveis por métodos mais sensíveis, como detecção direta de DNA, sem necessariamente maior risco de recaída. No estudo TWISTER ⁽⁵⁴⁾, todos os pacientes em RLT apresentavam detecção do gene *BCR-ABL1* por quantificação de DNA e também foi observado um decaimento desta carga tumoral após seis anos de descontinuação ⁽¹⁰⁰⁾. Nos pacientes que alcançaram RLT aos 24 meses, observamos que no terceiro ano de seguimento houve estabilização e queda de transcritos *BCR-ABL1*. Em avaliação de linhagem de células *BCR-ABL1* positivas em pacientes que estão em RLT, foi demonstrado que predominam células linfóides, e não da linhagem granulocítica ⁽¹¹⁸⁾. Isto sugere que, mesmo em pacientes com doença residual positiva, não necessariamente predominam células multipotentes com capacidade de diferenciação para diferentes linhagens.

Na avaliação de amostras com resultado indetectável por qRT-PCR (com sensibilidade de pelo menos 5log), observamos que houve amplificação em todos os chips por dPCR. Mori et al realizaram avaliações por PCR digital pela plataforma Biomark™, com sensibilidade de 10^{-7} antes de iniciar a descontinuação de ITQ, só encontrando 25 amostras positivas no total de 107 pacientes. No entanto, os dados referentes à sensibilidade do dPCR são conflitantes ⁽¹¹⁹⁾.

De fato, observamos, nos nossos resultados, que o número de cópias apresentou grande variação entre as amostras e que não alcançamos o nível de precisão desejável, menor de 12%. Para correção deste viés, seria necessário aumentar o número de replicatas por amostra.

Também se questiona se o dPCR dispensaria o controle interno, como é feito no qRT-PCR. Em estudo recente de Cortés et al., a metodologia de dPCR foi comparada com qRT-PCR para quantificação de transcritos *BCR-ABL1*, padronizando os dois métodos pela escala internacional. Para tal, o gene controle *ABL1* foi quantificado por ambas as metodologias. Encontrou-se uma sensibilidade semelhante entre os dois métodos, sugerindo não haver vantagem para quantificação de *BCR-ABL1* por dPCR. Porém, neste estudo, não foram avaliadas amostras com resultados indetectáveis por qRT-PCR e a concordância entre os métodos foi menor em amostras com transcritos *BCR-ABL1* < 0,1% IS.

Para otimização do dPCR, é necessário trabalhar com um número de 200-2.000 cópias por μ L, chamado de intervalo dinâmico. Portanto, quando consideramos o número de cópias do controle interno, que, no caso de *BCR* está entre 100.000-400.000 para a quantificação de baixas quantidades de transcritos *BCR-ABL1*, seria

necessário executar o teste com diluições diferentes para quantificação da sequência alvo e do controle e aumentar o número de replicatas.

Logo, não é possível concluir pelos nossos dados se, de fato, o dPCR mostrou-se mais sensível que o qRT-PCR ou qual o número de resultados falsos positivos. Alikian et al. ⁽⁸¹⁾ que compararam três diferentes plataformas de dPCR confirmaram o fato de que a principal vantagem desta metodologia é dispensar curvas de calibração e melhorar a reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. No entanto, não parece melhorar a sensibilidade para detecção de transcritos *BCR-ABL1* em pacientes com RMP. A falsa-positividade em amostras com baixa carga tumoral pode ocorrer por contaminação ou amplificação de sequências inespecíficas ⁽¹²⁰⁾.

Além do achado de que pacientes com RM4 apresentaram maior taxa de recaída molecular, também observamos que a proporção de linfócitos NK foi menor em pacientes com RM4 que apresentaram perda da RMM. Já é descrito que a recuperação imunológica dos pacientes com LMC tratados com ITQ é importante para a resposta ao tratamento. A expansão de linfócitos NK (CD3-CD56+) está associada com RMP ^(102, 121). A recaída molecular, após a descontinuação, é menor em pacientes que apresentam maior proporção de linfócitos NK maduros com aumento da secreção de TNF- α e IFN gama ^(122, 123).

Este achado da importância dos linfócitos NK é descrito em pacientes do estudo EURO-SKI que, como foi citado anteriormente, incluiu pacientes com RM4. Nossos dados sugerem que alguns pacientes em RM4 poderiam não apresentar completa recuperação da resposta imunológica dos linfócitos NK e, portanto, teriam maior risco de recaída.

Treze pacientes no estudo apresentaram recaída molecular e foram tratados novamente com imatinibe. Todos recuperaram a RMM e apenas um paciente não recuperou a RM4. Isto está de acordo com os dados publicados que mostram que 98% dos pacientes recuperam a RMM ⁽⁷⁰⁾.

Em relação aos eventos adversos relacionados à descontinuação, observamos que 29% dos pacientes apresentaram síndrome da retirada variando de grau 1 a 2. Não houve necessidade de reintrodução do imatinibe por este motivo. Não é descrito na literatura, mas observamos que alguns pacientes apresentaram aumento de glicose e triglicérides, durante a fase de descontinuação, e melhora destes parâmetros, quando o imatinibe foi reintroduzido.

Estes achados sugerem que o imatinibe pode ter uma ação metabólica por receptores *off-target*. Pacientes tratados em primeira linha com nilotinibe apresentam mais alterações metabólicas, quando comparados aos pacientes tratados com imatinibe ⁽⁶³⁾. Um paciente foi a óbito no segundo mês de descontinuação em RMM por insuficiência cardíaca descompensada, não relacionada à LMC. Na coorte do EURO-SKI, foram reportados 16 óbitos não relacionados à LMC, sendo dez em pacientes na fase de descontinuação por diferentes causas: infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca e outras neoplasias ⁽⁵⁶⁾.

Duas pacientes engravidaram durante o estudo e ambas perderam a RMM. Uma paciente apresentou aborto com seis semanas, mas a outra gestação evoluiu sem intercorrências. Não é recomendado que as pacientes engravidem em uso de ITQ pelo risco teratogênico dessas drogas ^(31, 124). Para as pacientes que desejam engravidar, orienta-se suspender o ITQ somente com RMP sustentada e, na literatura,

é descrito que as pacientes têm boa evolução com recuperação da resposta, após a reintrodução do tratamento ^(124–126).

Não observamos nenhuma recaída tardia, ou seja, após 24 meses de descontinuação. Nos pacientes em RLT, avaliamos a expressão dos receptores inibitórios PD-1 e TIM-3 nos linfócitos T CD4+ e CD8+. A expressão de PD-1 em linfócitos T CD8+ foi maior nos pacientes em RLT comparados com pacientes em uso de imatinibe e em RMM. Não houve diferença na expressão de TIM-3 ou da dupla expressão de PD-1 e TIM-3.

Já é descrito que células leucêmicas precursoras expressam o ligante do PD-1 e um dos mecanismos de escape imunológico é o aumento da expressão de linfócitos T PD-1+ ⁽¹²⁷⁾. Na LMC ao diagnóstico, ocorre uma expansão de células mielóides supressoras que promovem o recrutamento e expansão de linfócitos T reguladores (TREG) ⁽¹²⁸⁾. Os TREGs, por sua vez, são importantes para tolerância imunológica, sendo a expressão de receptores inibitórios em linfócitos T um dos mecanismos para modulação da resposta imunológica ⁽¹²⁹⁾.

O imatinibe também inibe uma proteína tirosina quinase linfócito-específica que, ao ser inativada, induz apoptose de TREGs e consequentemente redução da população de linfócitos T com expressão de receptores inibitórios como PD-1 ⁽¹³⁰⁾. Esta ação *off-target* do imatinibe junto com a inibição do *ABL* também é importante para os pacientes alcançarem resposta molecular profunda, como já demonstrada por vários trabalhos ^(102, 104, 130). Nossos dados reforçam o fato de que, após a suspensão do ITQ, ocorre uma expansão de linfócitos T CD8+PD-1+.

No entanto, não foi feita uma avaliação funcional dos linfócitos T e NK para comprovar se, de fato, há um comprometimento imunológico nos pacientes em RLT

e exaustão linfocitária. A expressão de múltiplos receptores inibitórios correlaciona-se com maior perda de função efetora do linfócito T CD8⁺ ^(131, 132). A dupla expressão de PD-1 e TIM-3 em linfócitos CD-8⁺ correlaciona-se, por exemplo, com maior recaída em leucemia mieloide aguda e risco de infecção pós transplante de órgãos ^(94, 133). Como não encontramos expansão de linfócitos com dupla expressão de PD-1 e TIM-3, é possível que os pacientes em RLT não apresentem aumento de exaustão linfocitária.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

A sobrevida livre de terapia aos 24 meses em pacientes com LMC com critério de inclusão de RM4 foi de 54%, semelhante aos estudos publicados.

Todos os pacientes com recaída molecular recuperaram a resposta e não houve casos de progressão para fases avançadas ou necessidade de troca de ITQ, sugerindo que o protocolo foi seguro.

A RM4,5 antes da descontinuação foi o único fator associado a um risco menor de recaída molecular.

O PCR digital detectou transcritos *BCR-ABL1* em amostras indetectáveis por qRT-PCR com sensibilidade de 5log, porém pelo baixo número de cópias detectadas, o resultado não se mostrou conclusivo.

Pacientes em remissão livre de terapia apresentam aumento da população de linfócitos T CD8+ PD-1+ TIM-3-, quando comparados com pacientes em uso de imatinibe, sugerindo efeito imunomodulatório do ITQ.

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

1. De Oliveira Santos M. Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil. Editorial. Rev Bras Cancerol. 2020;66(1):e-00927.
2. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med. 1996;2(5):561-6.
3. Bower H, Björkholm M, Dickman PW, Höglund M, Lambert PC, Andersson TML. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. J Clin Oncol. 2016;34(24):2851-7.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
5. Von Hansemann D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische bedeutung. Virchows Arch A Pathol Anat. 1890;119:299-326.
6. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies in human leukemia. ii. chronic granulocytic leukemia. J Natl Cancer Inst. 1961;27(5):1013-35.
7. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243(5405):290-3.
8. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice. Cancer Res. 1970;30(8):2213-22.

9. Groffen J, Heisterkamp N, Reynolds FH, Stephenson JR. Homology between phosphotyrosine acceptor site of human c-abl and viral oncogene products. *Nature*. 1983;304(5922):167-9.
10. Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1996;10(5):751-6.
11. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233(4760):212-4.
12. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210(bcr/abl) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9312-6.
13. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-82.
14. Sawyers C. Molecular consequences of the BCR-ABL translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1993;11 (Suppl. 2):101-3.
15. Verfaillie C. Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am*. 1998;12:1-29.
16. Weinberg RA. The biology of cancer. 1st ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2007.
17. Spiers A. The clinical features of chronic granulocytic leukaemia. *Clin Haematol*. 1977;6(1):77-95.
18. Swerdlow SH, Campo E, Nancy H, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R, editor. WHO

Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.

19. Sokal J, Cox E, Baccarani M, Tura S, Gomez G, Robertson J, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789-99.

20. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(11):850-8.

21. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, Guilhot F, Porkka K, Ossenkoppele G, Lindoerfer D, Simonsson B, Hehlmann R. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686-92.

22. Pfirrmann M, Clark RE, Prejzner W, Lauseker M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot F, Heibl S, Hehlmann R, Faber E, Turkina A, Ossenkoppele G, Höglund M, Zaritskey A, Giskevicius L, Olsson-Strömberg U, Everaus H, Koskenvesa P, Labar B, Sacha T, Zackova D, Cervantes F, Colita A, Zupan I, Bogdanovic A, Castagnetti F, Guilhot J, Hasford J, Hochhaus A, Hoffmann VS. 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.

23. Oyekunle A, Zander AR, Binder M, Ayuk F, Zabelina T, Christopeit M, Stübig T, Alchalby H, Schafhausen P, Lellek H, Wolschke C, Müller I, Bacher U, Kröger N. Outcome of allogeneic SCT in patients with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Ann Hematol*. 2013;92(4):487-96.

24. Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, Appelbaum FR, Anderson J, Bennett C, Goldman JM, Guilhot F, Kantarjian HM, Lichtin AE, Talpaz M, Tura S. An

evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood*. 1999;94(5):1517-36.

25. Giles FJ, Aitchison R, Syndercombe-Court D, Schey S, Newland AC. Recombinant alpha 2B interferon in combination with oral chemotherapy in late chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1992;7(1-2):99-102.

26. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, Tura S, Baccarani M, Zuffa E, Russo D, Fanin R, Zaccaria A, Fiacchini M. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994;330(12):820-5.

27. Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon- α therapy. *Ann Intern Med*. 1995;122(4):254-61.

28. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1031-7.

29. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346(9):645-52.

-
30. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ; IRIS Investigators. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(10):917-27.
31. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;1-19.
32. Cross NCP, Hughes TP, Feng L, O'Shea P, Bungey J, Marks DI, Ferrant A, Martiat P, Goldman JM. Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematol*. 1993;84(1):67-74.
33. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, Lange T, Lion T, Machova Polakova K, Dulucq S, Martinelli G, Oppliger Leibundgut E, Pallisgaard N, Barbany G, Sacha T, Talmaci R, Izzo B, Saglio G, Pane F, Müller MC, Hochhaus A. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(5):999-1003.
34. Cross NCP, White HE, Müller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(10):2172-5.
35. Cross NCP. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22(3):355-65.

36. Müller MC, Saglio G, Lin F, Pfeifer H, Press RD, Tubbs RR, Paschka P, Gottardi E, O'Brien SG, Ottmann OG, Stockinger H, Wiecek L, Merx K, König H, Schwindel U, Hehlmann R, Hochhaus A. An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. *Haematologica*. 2007;92(7):970-3.
37. White HE, Hedges J, Bendit I, Branford S, Colomer D, Hochhaus A, Hughes T, Kamel-Reid S, Kim DW, Modur V, Müller MC, Pagnano KB, Pane F, Radich J, Cross NC, Labourier E. Establishment and validation of analytical reference panels for the standardization of quantitative BCR-ABL1 measurements on the international scale. *Clin Chem*. 2013;59(6):938-48.
38. Cross NCP, White HE, Ernst T, Welden L, Dietz C, Saglio G, Mahon FX, Wong CC, Zheng D, Wong S, Wang SS, Akiki S, Albano F, Andrikovics H, Anwar J, Balatzenko G, Bendit I, Beveridge J, Boeckx N, Cerveira N, Cheng SM, Colomer D, Czurda S, Daraio F, Dulucq S, Eggen L, El Housni H, Gerrard G, Gniot M, Izzo B, Jacquin D, Janssen JJ, Jeromin S, Jurcek T, Kim DW, Machova-Polakova K, Martinez-Lopez J, McBean M, Mesanovic S, Mitterbauer-Hohendanner G, Mobtaker H, Mozziconacci MJ, Pajič T, Pallisgaard N, Panagiotidis P, Press RD, Qin YZ, Radich J, Sacha T, Touloumenidou T, Waits P, Wilkinson E, Zadro R, Müller MC, Hochhaus A, Branford S. Development and evaluation of a secondary reference panel for BCR-ABL1 quantification on the International Scale. *Leukemia*. 2016;30(9):1844-52.
39. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): A novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer*. 2006;94(12):1765-9.
40. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2531-41.

41. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, Nicolini FE, Apperley JF, Khoury HJ, Talpaz M, DiPersio J, DeAngelo DJ, Abruzzese E, Rea D, Baccarani M, Müller MC, Gambacorti-Passerini C, Wong S, Lustgarten S, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Guilhot F, Deininger MW, Hochhaus A, Hughes T, Goldman JM, Shah NP, Kantarjian H; PACE Investigators. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome–positive leukemias. *N Engl J Med*. 2013;369(19):1783-96.
42. Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, Zhang B, Myssina S, Allan EK, Nicolini FE, Müller-Tidow C, Bhatia R, Brunton VG, Koschmieder S, Holyoake TL. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 2012;119(6):1501-10.
43. Hutchinson L. Human CML stem cells insensitive to imatinib even when BCR–ABL is inhibited. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(3):126.
44. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 2011;121(1):396-409.
45. Experts in Chronic Myeloid Leukemia: Abboud C, Berman E, Cohen A, Cortes J, DeAngelo D, Deininger M, et al. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: From the perspective of a large group of CML experts. *Blood*. 2013;121(22):4439-42.
46. Valent P, Hadzijušufovic E, Schernthaner GH, Wolf D, Rea D, Le Coutre P. Vascular safety issues in CML patients treated with BCR/ABL1 kinase inhibitors. *Blood*. 2015;125(6):901-6.
47. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, Kim DW, Kim TD, Khoury HJ, Le Coutre P, Mayer J, Milojkovic D, Porkka K, Rea D, Rosti G, Saussele S, Hehlmann R, Clark RE. European

LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1648-71.

48. Cortes JE, Apperley JF, Deangelo DJ, Deininger MW, Kota VK, Rousselot P, Gambacorti-Passerini C. Management of adverse events associated with bosutinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: Expert panel review. *J Hematol Oncol*. 2018;27(1):143.

49. Paschka P, Müller MC, Merx K, Kreil S, Schoch C, Lahaye T, Weisser A, Petzold A, König H, Berger U, Gschaidmeier H, Hehlmann R, Hochhaus A. Molecular monitoring of response to imatinib (Glivec) in CML patients pretreated with interferon alpha. Low levels of residual disease are associated with continuous remission. *Leukemia*. 2003;17(9):1687-94.

50. Mahon FX, Delbrel X, Cony-Makhoul P, Fabères C, Boiron JM, Barthe C, Bilhou-Nabéra C, Pigneux A, Marit G, Reiffers J. Follow-up of complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia after cessation of interferon alfa. *J Clin Oncol*. 2002;20(1):214-20.

51. Hochhaus A, Reiter A, Sauße S, Reichert A, Emig M, Kaeda J, Schultheis B, Berger U, Shepherd PC, Allan NC, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon- α therapy for chronic myelogenous leukemia: Low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. *Blood*. 2000;95(1):62-6.

52. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-35.

53. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, Guerci-Bresler A, Legros L, Varet B, Gardembas M, Dubruille V, Tulliez M, Noel MP, Ianotto JC, Villemagne B, Carré M, Guilhot F, Rousselot P, Mahon FX. Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(3):298-305.
54. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT, Dang P, Goyne JM, Slader C, Filshie RJ, Mills AK, Melo JV, White DL, Grigg AP, Hughes TP. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122(4):515-22.
55. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, Gardembas M, Etienne G, Réa D, Roy L, Escoffre-Barbe M, Guerci-Bresler A, Tulliez M, Prost S, Spentchian M, Cayuela JM, Reiffers J, Chomel JC, Turhan A, Guilhot J, Guilhot F, Mahon FX.. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(5):424-30.
56. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, Janssen JJWM, Mayer J, Koskenvesa P, Panayiotidis P, Olsson-Strömberg U, Martinez-Lopez J, Rousselot P, Vestergaard H, Ehrencrona H, Kairisto V, Machová Poláková K, Müller MC, Mustjoki S, Berger MG, Fabarius A, Hofmann WK, Hochhaus A, Pfirrmann M, Mahon FX; EURO-SKI investigators. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(6):747-57.
57. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähteenmäki H, Kasanen T, Koskenvesa P, Söderlund S, Höglund M, Markevärn B, Sjölander A, Lotfi K, Dreimane A, Lübking A, Holm E, Björemann M, Lehmann S, Stenke L, Ohm L, Gedde-Dahl T, Majeed W, Ehrencrona H, Koskela S, Saussele S,

Mahon FX, Porkka K, Hjorth-Hansen H, Bryceson YT, Richter J, Mustjoki S. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108-16.

58. Fujisawa S, Ueda Y, Usuki K, Kobayashi H, Kondo E, Doki N, Nakao T, Kanda Y, Kosugi N, Kosugi H, Kumagai T, Harada H, Shikami M, Maeda Y, Sakura T, Inokuchi K, Saito A, Nawa Y, Ogasawara M, Nishida J, Kondo T, Yoshida C, Kuroda H, Tabe Y, Maeda Y, Imajo K, Kojima K, Morita S, Komukai S, Kawaguchi A, Sakamoto J, Kimura S. Feasibility of the imatinib stop study in the Japanese clinical setting: delightedly overcome CML expert stop TKI trial (DOMEST Trial). *Int J Clin Oncol*. 2019;24(4):445-53.

59. Mori S, Vagge E, le Coutre P, Abruzzese E, Martino B, Pungolino E, Elena C, Pierri I, Assouline S, D'Emilio A, Gozzini A, Giraldo P, Stagno F, Iurlo A, Luciani M, De Riso G, Redaelli S, Kim DW, Pirola A, Mezzatesta C, Petroccione A, Lodolo D'Oria A, Crivori P, Piazza R, Gambacorti-Passerini C. Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: The ISAV study. *Am J Hematol*. 2015;90(10):910-4.

60. Lee SE, Choi SY, Song HY, Kim SH, Choi MY, Park JS, Kim HJ, Kim SH, Zang DY, Oh S, Kim H, Do YR, Kwak JY, Kim JA, Kim DY, Mun YC, Lee WS, Chang MH, Park J, Kwon JH, Kim DW. Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: The KID study. *Haematologica*. 2016;101(6):717-23.

61. Takahashi N, Tauchi T, Kitamura K, Miyamura K, Saburi Y, Hatta Y, Miyata Y, Kobayashi S, Usuki K, Matsumura I, Minami Y, Usui N, Fukuda T, Takada S, Ishikawa M, Fujimaki K, Gomyo H, Sasaki O, Ohishi K, Miyake T, Imai K, Suzushima H, Mitsui H, Togitani K, Kiguchi T, Atsuta Y, Ohtake S, Ohnishi K, Kobayashi Y, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group. Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: the JALSG-STIM213 study. *Int J Hematol*. 2018;107(2):185-93.

62. Hehlmann R, Lauseker M, Saußebe S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, Neubauer A, Hossfeld DK, Nerl C, Gratwohl A, Baerlocher GM, Heim D, Brümmendorf TH, Fabarius A, Haferlach C, Schlegelberger B, Müller MC, Jeromin S, Proetel U, Kohlbrenner K, Voskanyan A, Rinaldetti S, Seifarth W, Spieß B, Balleisen L, Goebeler MC, Hänel M, Ho A, Dengler J, Falge C, Kanz L, Kremers S, Burchert A, Kneba M, Stegelmann F, Köhne CA, Lindemann HW, Waller CF, Pfreundschuh M, Spiekermann K, Berdel WE, Müller L, Edinger M, Mayer J, Beelen DW, Bentz M, Link H, Hertenstein B, Fuchs R, Wernli M, Schlegel F, Schlag R, de Wit M, Trümper L, Hebart H, Hahn M, Thomalla J, Scheid C, Schafhausen P, Verbeek W, Eckart MJ, Gassmann W, Pezzutto A, Schenk M, Brossart P, Geer T, Bildat S, Schäfer E, Hochhaus A, Hasford J. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. *Leukemia*. 2017;31(11):2398-406.
63. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre PD, Etienne G, Dorlhiac-Llacer PE, Clark RE, Flinn IW, Nakamae H, Donohue B, Deng W, Dalal D, Menssen HD, Kantarjian HM. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30(5):1044-54.
64. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, Shah NP, Chuah C, Casanova L, Bradley-Garelik B, Manos G, Hochhaus A. Final 5-year study results of DASISION: The dasatinib versus imatinib study in treatment-naïve chronic myeloid leukemia patients trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2333-40.
65. Hamerschlak N, De Souza C, Cornacchioni AL, Pasquini R, Tabak D, Spector N, Steagall M. Quality of life of chronic myeloid leukemia patients in Brazil: Ability to work as a key factor. *Support Care Cancer*. 2014;22(8):2113-8.

66. Efficace F, Cardoni A, Cottone F, Vignetti M, Mandelli F. Tyrosine-kinase inhibitors and patient-reported outcomes in chronic myeloid leukemia: A systematic review. *Leuk Res*; 2013;37(2):206-13.
67. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW, Dyagil I, Glushko N, Milojkovic D, le Coutre P, Garcia-Gutierrez V, Reilly L, Jeynes-Ellis A, Leip E, Bardy-Bouxin N, Hochhaus A, Brümmendorf TH. Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: Results from the randomized BFORE trial. *J Clin Oncol*. 2018;36(3):231-7.
68. Campiotti L, Suter MB, Guasti L, Piazza R, Gambacorti-Passerini C, Grandi AM, Squizzato A. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017;77:48-56.
69. Dulucq S, Astrugue C, Etienne G, Mahon F, Benard A. Risk of molecular recurrence after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients: a systematic review of literature with a meta-analysis of studies over the last ten years. *Br J Haematol*. 2020;189(3):452-68.
70. Chen KK, Du TF, Xiong PS, Fan GH, Yang W. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia with losing major molecular response as a definition for molecular relapse: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2019;9:372.
71. Papalexandri A, Saloum R, Touloumenidou T, Papathanasiou M, Lalayanni C, Baldoumi E, Demosthenous C, Zerva P, Koutra MG, Athanasiadou A, Anagnostopoulos A. Blast crisis of CML after TKI discontinuation in a patient with previous stable deep molecular response. *Hemasphere*. 2018;2(6):e157.
72. Katagiri S, Tauchi T, Ando K, Okabe S, Gotoh M, Ohyashiki K. Low body weight and body mass index may be associated with musculoskeletal pain following

imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res Reports*. 2017;7:33-5.

73 Yu S, Cui M, He X, Jing R, Wang H. A review of the challenge in measuring and standardizing BCR-ABL1. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(10):1465-73.

74 Foroni L, Gerrard G, Nna E, Khorashad JS, Stevens D, Swale B, Milojkovic D, Reid A, Goldman J, Marin D. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2009;84(8):517-22.

75 Müller MC, Erben P, Saglio G, Gottardi E, Nyvold CG, Schenk T, Ernst T, Lauber S, Kruth J, Hehlmann R, Hochhaus A; European LeukemiaNet. Harmonization of BCR-ABL mRNA quantification using a uniform multifunctional control plasmid in 37 international laboratories. *Leukemia*. 2008;22(1):96-102.

76 Cross NCP, Hughes TP, Hochhaus A, Goldman JM. International standardisation of quantitative real-time RT-PCR for BCR-ABL. *Leuk Res*. 2008;32(3):505-6.

77 White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Wang YL, Branford S, Müller MC, Beaufils N, Beillard E, Colomer D, Dvorakova D, Ehrencrona H, Goh HG, El Housni H, Jones D, Kairisto V, Kamel-Reid S, Kim DW, Langabeer S, Ma ES, Press RD, Romeo G, Wang L, Zoi K, Hughes T, Saglio G, Hochhaus A, Goldman JM, Metcalfe P, Cross NC. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood*. 2010;116(22):e111-7.

78 Rulcová J, Zmeková V, Zemanová Z, Klamová H, Moravcová J. The effect of total-ABL, GUS and B2M control genes on BCR-ABL monitoring by real-time RT-PCR. *Leuk Res*. 2007;31(4):483-91.

- 79 Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-83.
- 80 Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *J Mol Diagn*. 2014;16(2):174-9.
- 81 Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, Cowen S, Griffiths M, Reid AG, Apperley J, White H, Huggett JF, Foroni L. RT-qPCR and RT-Digital PCR: a comparison of different platforms for the evaluation of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Clin Chem*. 2017;63(2):525-31.
- 82 Yan Z, Sun Q, Zhang H, Han Y, Qiao J, Niu M, Zhu S, Zhao K, Wu Q, Cheng H, Cao J, Zeng L, Li Z, Xu K. Advantages of digital PCR in the detection of low abundance bcr-abl1 gene in patients with chronic myeloid leukemia. *Oncol Lett*. 2019;18(5):5139-44.
- 83 White RA 3rd, Blainey PC, Fan HC, Quake SR. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing. *BMC Genomics*. 2009;10:116.
- 84 Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-62.
- 85 Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14(Suppl 2):49.

- 86 Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.
- 87 Murakami N, Riella LV. Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation. *Transplantation*. 2014;98(1):3-14.
- 88 Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med*. 2001;344(9):655-64.
- 89 Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: New insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol*. 2002;3(7):611-8.
- 90 Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:565-94.
- 91 Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, Kondo T, Ohmori K, Kurata M, Hayashi T, Uchiyama T. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(6):3220-4.
- 92 Catakovic K, Klieser E, Neureiter D, Geisberger R. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):1.
- 93 Komita H, Koido S, Hayashi K, Kan S, Ito M, Kamata Y, Suzuki M, Homma S. Expression of immune checkpoint molecules of T cell immunoglobulin and mucin protein 3/galectin-9 for NK cell suppression in human gastrointestinal stromal tumors. *Oncol Rep*. 2015;34(4):2099-105.
- 94 Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(3):173-85.

- 95 Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1245–52.
- 96 Noviello M, Manfredi F, Ruggiero E, Perini T, Oliveira G, Cortesi F, De Simone P, Toffalori C, Gambacorta V, Greco R, Peccatori J, Casucci M, Casorati G, Dellabona P, Onozawa M, Teshima T, Griffioen M, Halkes CJM, Falkenburg JHF, Stölzel F, Altmann H, Bornhäuser M, Waterhouse M, Zeiser R, Finke J, Cieri N, Bondanza A, Vago L, Ciceri F, Bonini C. Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun.* 2019;10(1):1065.
- 97 Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492–9.
- 98 Hughes A, Yong ASM. Immune effector recovery in chronic myeloid leukemia and treatment-free remission. *Front Immunol.* 2017;8:469.
- 99 Lin CF, Lin CM, Lee KY, Wu SY, Feng PH, Chen KY, Chuang HC, Chen CL, Wang YC, Tseng PC, Tsai TT. Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):10.
- 100 Ross DM, Pagani IS, Shanmuganathan N, Kok CH, Seymour JF, Mills AK, Filshie RJ, Arthur CK, Dang P, Saunders VA, Braley J, Yong AS, Yeung DT, White DL, Grigg AP, Schwarzer AP, Branford S, Hughes TP; Australasian Leukaemia and Lymphoma Group (ALLG). Long-term treatment-free remission of chronic myeloid leukemia with falling levels of residual leukemic cells. *Leukemia.* 2018;32(12):2572–9.
- 101 Christiansson L, Söderlund S, Mangsbo S, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Markevärn B, Richter J, Stenke L, Mustjoki S, Loskog A, Olsson-Strömberg U. The tyrosine kinase inhibitors imatinib and dasatinib reduce myeloid suppressor cells and release effector lymphocyte responses. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(5):1181–91.

- 102 Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White DL, Hughes TP, Yong ASM. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017;129(9):1166-76.
- 103 Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenbein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood*. 2009;114(8):1528-36.
- 104 Lee MY, Park CJ, Cho YU, You E, Jang S, Seol CA, Seo EJ, Choi EJ, Lee JH. Differences in PD-1 expression on CD8+ T-cells in chronic myeloid leukemia patients according to disease phase and TKI medication. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(11):2223-2232.
- 105 Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999;107(3):587-99.
- 106 Geelen IGP, Thielen N, Janssen JJWM, Hoogendoorn M, Roosma TJA, Willemsen SP, Visser O, Cornelissen JJ, Westerweel PE. Treatment outcome in a population-based, 'real-world' cohort of patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2017;102(11):1842-9.
- 107 Bonifacio M, Scaffidi L, Binotto G, De Marchi F, Maino E, Calistri E, Bonalumi A, Angela Bonalumi, Frison L, Marin L, Medeot M, De Matteis G, Fanin R, Semenzato G, Amborosetti A, Tiribelli M. Predictive factors of stable deep molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib standard dose: a study from the Gruppo Triveneto LMC. *Blood*. 2015;126(23):597-597.
- 108 Etienne G, Dulucq S, Bauduer F, Adiko D, Lifermann F, Dagada C, Lenoir C, Schmitt A, Klein E, Madene S, Fort MP, Bijou F, Moldovan M, Turcq B, Robbesyn F, Durrieu F, Versmée L, Katsahian S, Faberes C, Lascaux A, Mahon FX.

Incidences of deep molecular responses and treatment-free remission in de novo CP-CML patients. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2521.

109 Pagnano KBB, Miranda EC, Delamain MT, Duarte GO, de Paula EV, Lorand-Metze I, Souza CA. Influence of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2017;17(11):728-33.

110 Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, Fabarius A, Proetel U, Schnittger S, Haferlach C, Krause SW, Schubert J, Einsele H, Hänel M, Dengler J, Falge C, Kanz L, Neubauer A, Kneba M, Stegelmann F, Pfreundschuh M, Waller CF, Spiekermann K, Baerlocher GM, Pfirrmann M, Hasford J, Hofmann WK, Hochhaus A, Müller MC; SAKK and the German CML Study Group. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*. 2014;99(9):1441-7.

111 Pfirrmann M, Evtimova D, Saussele S, Castagnetti F, Cervantes F, Janssen J, Hoffmann VS, Gugliotta G, Hehlmann R, Hochhaus A, Hasford J, Baccarani M. No influence of BCR-ABL1 transcript types e13a2 and e14a2 on long-term survival: results in 1494 patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(5):843-50.

112 Kjaer L, Skov V, Andersen MT, Aggerholm A, Clair P, Gniot M, Soeby K, Udby L, Dorff MH, Hasselbalch H, Pallisgaard N. Variant-specific discrepancy when quantitating BCR-ABL1 e13a2 and e14a2 transcripts using the Europe Against Cancer qPCR assay. *Eur J Haematol*. 2019;103(1):26-34.

113 Shah NP. NCCN Guidelines updates: discontinuing TKI therapy in the treatment of chronic myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019;17(55):611-3.

- 114 Baccarani M, Abruzzese E, Accurso V, Albano F, Annunziata M, Barulli S, Beltrami G, Bergamaschi M, Binotto G, Bocchia M, Caocci G, Capodanno I, Cavazzini F, Cedrone M, Cerrano M, Crugnola M, D'Adda M, Elena C, Fava C, Fazi P, Fozza C, Galimberti S, Giai V, Gozzini A, Gugliotta G, Iurlo A, La Barba G, Levato L, Lucchesi A, Luciano L, Lunghi F, Lunghi M, Malagola M, Marasca R, Martino B, Melpignano A, Miggiano MC, Montefusco E, Musolino C, Palmieri F, Pugno P, Rapezzi D, Rege-Cambrin G, Rupoli S, Salvucci M, Sancetta R, Sica S, Spadano R, Stagno F, Tiribelli M, Tomassetti S, Trabacchi E, Bonifacio M, Breccia M, Castagnetti F, Pane F, Russo D, Saglio G, Soverini S, Vigneri P, Rosti G. Managing chronic myeloid leukemia for treatment-free remission: A proposal from the GIMEMA CML WP. *Blood Adv.* 2019;3(24):4280-90.
- 115 Radich JP, Deininger M, Abboud CN, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, Curtin P, DeAngelo DJ, Gotlib J, Hobbs G, Jagasia M, Kantarjian HM, Maness L, Metheny L, Moore JO, Pallera A, Pancari P, Patnaik M, Purev E, Rose MG, Shah NP, Smith BD, Snyder DS, Sweet KL, Talpaz M, Thompson J, Yang DT, Gregory KM, Sundar H. Chronic myeloid leukemia, version 1.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2018;16(9):1108-35.
- 116 Guilhot F, Rigal-Huguet F, Guilhot J, Guerci-Bresler A, Nicolini FE, Maloisel F, Rea D, Coiteux V, Gardembas M, Vekhoff A, Jourdan E, Legros L, Escoffre-Barbe M, Rousselot P, Preudhomme C, Mahon F-X. Long term outcome of chronic phase chronic myeloid leukemia (CP CML) patients (pts) from the French Spirit Study Comparing Imatinib (IM) 400 mg to higher dose imatinib or combination with peg-interferon α 2a (PegIFN) or cytarabine (Ara-C) : a trial of the FI LMC (France intergroupe de la leucemie myéloïde chronique). *Blood.* 2014;124(21):1793.
- 117 Rousselot P, Huguet F, Rea D, Legros L, Cayuela JM, Maarek O, Blanchet O, Marit G, Gluckman E, Reiffers J, Gardembas M, Mahon FX. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood.* 2007;109(1):58-60.

- 118 Pagani IS, Dang P, Saunders VA, Grose R, Shanmuganathan N, Kok CH, Carne L, Rwodzi Z, Watts S, McLean J, Braley J, Altamura H, Yeung DT, Branford S, Yong ASM, White DL, Hughes TP, Ross DM. Lineage of measurable residual disease in patients with chronic myeloid leukemia in treatment-free remission. *Leukemia*. 2020;34(4):1052-61.
- 119 Alikian M, Gale RP, Apperley JF, Foroni L. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol Detect Quantif*. 2017;11:4-20.
- 120 Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem*. 2015;61(1):79-88.
- 121 Damele L, Montaldo E, Moretta L, Vitale C, Mingari MC. Effect of tyrosin kinase inhibitors on NK Cell and ILC3 development and function. *Front Immunol*. 2018;9:2433.
- 122 Rea D, Henry G, Khaznadar Z, Etienne G, Guilhot F, Nicolini F, Guilhot J, Rousselot P, Huguet F, Legros L, Gardembas M, Dubruille V, Guerci-Bresler A, Charbonnier A, Maloisel F, Ianotto JC, Villemagne B, Mahon FX, Moins-Teisserenc H, Dulphy N, Toubert A. Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica*. 2017;102(8):1368-77.
- 123 Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähteenmäki H, Kasanen T, Koskenvesa P, Söderlund S, Höglund M, Markevärn B, Sjölander A, Lotfi K, Dreimane A, Lübking A, Holm E, Björemann M, Lehmann S, Stenke L, Ohm L, Gedde-Dahl T, Majeed W, Ehrencrona H, Koskela S, Saussele S, Mahon FX, Porkka K, Hjorth-Hansen H, Bryceson YT, Richter J, Mustjoki S. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108-16.

- 124 Palani R, Milojkovic D, Apperley JF. Managing pregnancy in chronic myeloid leukaemia. *Ann Hematol.* 2015;94 Suppl 2:167-76.
- 125 Lasica M, Willcox A, Burbury K, Ross DM, Branford S, Butler J, Filshie R, Januszewicz H, Joske D, Mills A, Simpson D, Tam C, Taylor K, Watson AM, Wolf M, Grigg A. The effect of tyrosine kinase inhibitor interruption and interferon use on pregnancy outcomes and long-term disease control in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(7):1196-802.
- 126 Dou X, Qin Y, Huang X, Jiang Q. Planned pregnancy in female patients with chronic myeloid leukemia receiving tyrosine kinase inhibitor therapy. *Oncologist.* 2019;24(11):e1141-e1147.
- 127 Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1):74.
- 128 Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology.* 2013;138(2):105-15.
- 129 Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. T_{reg} cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(3):158-72.
- 130 Tanaka A, Nishikawa H, Noguchi S, Sugiyama D, Morikawa H, Takeuchi Y, Ha D, Shigeta N, Kitawaki T, Maeda Y, Saito T, Shinohara Y, Kameoka Y, Iwaisako K, Monma F, Ohishi K, Karbach J, Jäger E, Sawada K, Katayama N, Takahashi N, Sakaguchi S.. Tyrosine kinase inhibitor imatinib augments tumor immunity by depleting effector regulatory T cells. *J Exp Med.* 2020;217(2):e20191009.
- 131 Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8⁺ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev.* 2006;211:214-24.

132. Reiser J, Banerjee A. Effector, memory, and dysfunctional CD8⁺ T cell fates in the antitumor immune response. *J Immunol Res.* 2016;2016:8941260.
133. Brück O, Blom S, Dufva O, Turkki R, Chheda H, Ribeiro A, Kovanen P, Aittokallio T, Koskenvesa P, Kallioniemi O, Porkka K, Pellinen T, Mustjoki S. Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML. *Leukemia.* 2018;32(7):1643-56.

8 ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Principal

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

DATA NASCIMENTO:/...../.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (*grau de parentesco, tutor, curador etc.*)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

DATA NASCIMENTO:/...../.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Estudo de Interrupção de Imatinibe em Pacientes Portadores de Leucemia Mieloide Crônica Fase Crônica, com Resposta Molecular Sustentada de 4log OU $<0,01\%$ pela Escala Internacional”.

2. PESQUISADOR: Dr. Israel Bendit

CARGO/FUNÇÃO: Médico Hematologista

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Médica - Serviço de Hematologia

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

Você está sendo convidado/a a participar de um estudo clínico para descobrir se os pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC) que tomam Imatinibe podem parar de tomar essa medicação.

Para poder participar deste estudo, você deverá ter tomado Imatinibe por pelo menos três anos antes da entrada neste estudo. Além disso, você deverá ter uma quantidade muito pequena de células leucêmicas no seu sangue, determinada pelo estudo do BCR-ABL quantitativo menor que 0,01% por 01 ano (12 meses).

Antes de concordar em participar do estudo, você deve saber dos riscos e benefícios associados à sua participação, para que assim você possa tomar uma decisão informada. Esse processo é conhecido como “consentimento livre e esclarecido”.

Este termo de consentimento contém informações sobre o estudo que você pensa em participar. Leia com atenção e converse sobre o assunto com quem você quiser. Pode ser um amigo ou parente. Se tiver alguma dúvida, peça explicações ao Médico do Estudo ou alguém de sua equipe.

Quando você já estiver bem informado/a sobre o estudo e sobre os exames que serão feitos e se resolver participar, será solicitado que você assine este termo de consentimento. A sua decisão de fazer parte deste estudo é voluntária. Isso significa que você é livre para decidir se quer ou não participar do estudo. Você também poderá sair do estudo na hora que quiser. Se

preferir não participar, seus cuidados médicos não serão afetados e você poderá conversar sobre outros tratamentos ou cuidados médicos com o Médico do Estudo.

Durante o estudo, podemos tomar conhecimento de novos fatos que possam fazer com que você não queira mais participar deste estudo. Se isso acontecer, você será informado/a para que decida se quer ou não continuar no estudo.

Se você resolver sair do estudo, essa decisão deverá ser comunicada ao Médico do Estudo ou a alguém de sua equipe, para que as providências necessárias sejam tomadas.

Durante o primeiro ano do estudo você coletará mensalmente cerca de 20 mL (um pouco mais que 1 colher de sopa) de sangue que será enviado ao Laboratório de Biologia Tumoral do HC-FMUSP para testar o nível da proteína (BCR-ABL) que quantifica a carga tumoral da sua doença. Este teste é semelhante ao que seu médico vem usando para medir o nível de sua doença. Após o segundo ano de estudo até o fim do protocolo esta análise será realizada a cada dois meses. Esse acompanhamento frequente é para garantir uma verificação cuidadosa do seu sangue para fornecer tratamento médico imediato, se necessário. Se os níveis de BCR-ABL ficarem altos (mais células leucêmicas no seu sangue), se a amostra se perder ou se o resultado de PCR for difícil de ser analisado, você deverá recoletar o exame. Esta amostra adicional de sangue será usada para confirmar o aumento no nível da proteína BCR-ABL. Em alguns casos (por exemplo, quando o teste mostrar que o nível de BCR-ABL está alto), a quantidade de sangue que sobrar da análise de BCR-ABL poderá ser usada para a procura de alterações (conhecidas como mutações) no gene BCR-ABL.

Testes laboratoriais de rotina (cerca de 6-8 ml) serão coletados a cada 4 meses, junto com a coleta de BCR-ABL, durante o período em que você permanecer no estudo ou mais frequentemente, caso seu médico julgar necessário.

Durante os primeiros dois anos do protocolo, você retornará ao consultório do Médico do Estudo a cada 2 meses. Você será submetido a exame físico completo e sua pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura serão medidos. No intervalo entre as consultas médicas, você será contactado uma vez via telefone, por um enfermeiro treinado que irá questionar sobre queixas ou sintomas que você porventura possa ter. Caso necessário, uma consulta extra com o Médico do Estudo poderá ser agendada.

Após os primeiros dois anos do estudo, você passará a retornar em consultas médicas a cada 4 meses e as ligações telefônicas pela equipe de enfermagem também serão feitas a cada 4 meses, de forma intercalada com as consultas médicas.

Se a quantidade de células leucêmicas aumentar no seu sangue, e isto for confirmado em um segundo estudo de BCR-ABL, o seu médico pedirá que você volte a tomar Imatinibe. Você continuará matriculado no protocolo caso volte a receber Imatinibe. Caso você tenha reiniciado o uso de imatinibe e por algum motivo (perda de resposta ao tratamento ou efeitos colaterais proibitivos) seu médico julgar necessário a troca do imatinibe por outra medicação contra a leucemia, você será retirado do protocolo, porém manterá seguimento habitual no ambulatório de LMC do ICESP, como fazia antes da admissão no estudo.

Se você for mulher, em idade fértil, com potencial para engravidar, será solicitado que você não engravide durante o período que você permanecer no estudo. Antes da assinatura do termo de consentimento, será solicitado exame de sangue para confirmar que você não esteja grávida. Caso a paciente engravide durante o período do protocolo e a mesma necessite, em algum momento, tratamento contra a leucemia, a mesma será excluída do protocolo e voltará a receber atendimento assistencial convencional no ambulatório.

Questionários

Será pedido que você preencha um questionário durante o período do estudo sobre os sintomas da sua doença e condição de saúde. A equipe do estudo lhe dará as explicações necessárias sobre como preencher o questionário.

Risco de tratamento sem Imatinibe

Alguns pacientes que param de tomar o Imatinibe podem voltar a apresentar o crescimento das células leucêmicas. Por isso o seu médico vai testar o seu sangue a cada 4 semanas durante as primeiras 52 semanas (1 ano) contadas a partir da interrupção do tratamento com Imatinibe (e a cada 8 semanas após o primeiro ano) para acompanhar com cuidado o nível de células leucêmicas em seu sangue. Em estudos semelhantes quando o medicamento foi reiniciado, o número de células leucêmicas foi rapidamente reduzido a níveis muito baixos em todos os pacientes.

Os testes realizados em cada visita são testes comuns. O mais desconfortável geralmente é a coleta de amostras de sangue. Os riscos da coleta de sangue podem incluir irritação da pele, sangramento, manchas roxas ou dor (como uma “picada” quando a agulha é inserida em seu braço). Raramente poderá haver um pequeno coágulo de sangue (“bolinha” de sangue) ou infecção no local de inserção da agulha que geralmente desaparece espontaneamente. O manguito (braçadeira) para medir pressão arterial também pode causar desconforto ou mancha roxa na parte superior do braço.

Benefícios do tratamento

Não existe benefício médico garantido ao concordar em participar deste estudo. No entanto, ao fazer parte deste estudo você pode conseguir parar de tomar o Imatinibe com acompanhamento frequente da doença.

Somente no final do estudo poderemos concluir sobre a presença de algum benefício. As informações sobre a descontinuação do tratamento com Imatinibe podem contribuir com novas informações sobre um melhor tratamento médico que poderá beneficiar pacientes com Leucemia Mielóide Crônica no futuro.

Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa, quando estes forem disponíveis ou forem do conhecimento dos pesquisadores.

Participação voluntária

Você não é obrigado(a) a permanecer no estudo. Em outras palavras, você pode concordar em fazer parte do estudo hoje, mas depois mudar de ideia. Essa decisão não prejudicará a assistência médica recebida por você regularmente. Caso decida não participar deste estudo, converse com o médico sobre outras opções de tratamento médico.

Se você decidir deixar o estudo, deve informar ao médico ou à equipe do estudo. Eles assegurarão que os procedimentos adequados sejam seguidos e uma visita final seja feita para sua segurança.

Procedimentos após o término do estudo

Se você ainda estiver com resposta adequada e profunda ao término de sua participação no estudo, ficará a critério médico a reintrodução ou não do Imatinibe. Você voltará a ser acompanhado pela equipe do ambulatório de Leucemia Mielóide Crônica do ICESP.

Cancelamento do estudo

Se houver por alguma razão a descontinuação deste estudo a qualquer momento (como, por exemplo, se for descoberto algo que possa comprometer sua segurança), o Comitê de Ética que avaliou e aprovou este estudo deverá aprovar as razões antes da descontinuação.

Caso você seja retirado/a do estudo (por qualquer razão) ou queira sair do estudo antes do final, você não ficará sem tratamento. O Médico do Estudo decidirá qual é a melhor conduta para o seu caso.

Custo da Participação

Você (e/ou seu convênio médico) e/ou o SUS não deverá pagar por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte deste estudo clínico. Você não terá nenhuma compensação financeira ou prejuízo financeiro por participar deste estudo. Os custos de transporte para vir ao Centro de Pesquisa e a alimentação durante a permanência no Centro do participante e acompanhante será ressarcido.

Compensação por dano ao paciente

Você deve seguir todas as instruções dadas pelo Médico do Estudo. Você deverá comunicar imediatamente o Médico do Estudo sobre qualquer lesão ou sintoma associados ao estudo. Se você tiver qualquer pergunta sobre a disponibilidade de atendimento médico ou se achar que apresentou uma doença, lesão ou emergência associada ao estudo entre em contato com o Médico do Estudo ou alguém da equipe do estudo pelos telefones informados abaixo. Você receberá assistência integral pelo tempo que for necessário em situação de danos decorrentes desta pesquisa.

Assinando este termo de consentimento livre e esclarecido você não abre mão de nenhum de seus direitos legais aos quais você tem direito como participante em um estudo.

Confidencialidade

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos sob sigilo e confidencialidade. Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo. Os dados obtidos e seu material coletado durante o protocolo serão usados apenas para esta pesquisa.

Dúvidas

O médico ou a equipe do estudo responderão a qualquer pergunta que você tenha sobre este estudo clínico ou sua participação no estudo. Você pode fazer perguntas a qualquer momento durante o estudo. Por favor, ligue se tiver qualquer dúvida sobre o estudo ou sua experiência no estudo. Por favor, ligue ou compareça ao centro de estudo se você apresentar qualquer lesão, doença ou efeito colateral.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Você (ou seu representante legal) se concordar em participar deste estudo assinará 2 vias originais deste documento e rubricará todas as páginas, juntamente com o pesquisador. Uma via original será entregue a você e a outra ficará no Centro de Pesquisa.

Médico do estudo: Dr. Israel Bendit

Número de telefone: 11 3893-2530

Endereço: Av. Dr. Eneás de Carvalho Aguiar 155 1º. Andar PAMB (Laboratório de Biologia Tumoral) São Paulo – SP cep 05403-000.

Pesquisador executante: Dra. Fernanda Salles Seguro

Número de telefone: 11 4573-7631

Endereço: Av. Dr. Eneás de Carvalho Aguiar 155 1º. Andar PAMB (Centro de Pesquisa Clínica) São Paulo – SP cep 05403-000.

Nome do CEP: CAPPESQ - Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa do HCFMUSP

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, São Paulo – SP

Telefone/fax: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo de Interrupção de Imatinibe em Pacientes Portadores de Leucemia Mieloide Crônica Fase Crônica, com Resposta Molecular Sustentada de 4log OU <0,01% pela Escala Internacional”.

Eu discuti com o Dr. Israel Bendit sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do(a) Participante ou Responsável Legal

Assinatura do(a) Participante ou Responsável Legal

Data

Nome da testemunha (se aplicável)

Assinatura da Testemunha

Data

Nome do Pesquisados ou membro da equipe que explicou o
termo

Assinatura do Pesquisador ou membro da equipe que explicou o
termo

Data