

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Leucemia mieloide crônica: Expansão de células *Natural Killer* de
pacientes refratários ou intolerantes aos inibidores de tirosino quinase**

GUILHERME RASIA BOSI

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Leucemia mieloide crônica: Expansão de células *Natural Killer* de
pacientes refratários ou intolerantes aos inibidores de tirosino quinase**

GUILHERME RASIA BOSI

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Bosi, Guilherme Rasia

Leucemia mieloide crônica: Expansão de células Natural Killer de pacientes refratários ou intolerantes aos inibidores de tirosino quinase / Guilherme Rasia Bosi. -- 2017.

80 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. Células Natural Killer. 3. Cultura celular. 4. Interleucina-21. 5. Inibidores tirosino quinase. I. Silla, Lucia Mariano da Rocha, orient. II. Título.

*“ Na realidade, nunca encontrei uma pessoa cuja
maior necessidade não fosse senão o amor.”*

Elisabeth Kübler-Ross

Agradecimentos

Aos meus pais, fonte de inspiração, que possibilitaram a minha vinda a Porto Alegre, inicialmente para a residência em Hematologia e Hemoterapia; ao meu irmão Henrique, com quem dividi apartamento, gastos, vivências e aprendizados. Gostaria de fazer menção especial a minha namorada Paula, que por muitas vezes foi meu alicerce, exemplo de garra e minha maior incentivadora.

Agradeço também à minha orientadora, Dra Lucia Mariano da Rocha Silla, exemplo de profissional, apaixonada pelas ciências hematológica e que me oportunizou a realização desta pós-graduação.

Aos meus queridos professores, preceptores e colegas do Serviço de Hematologia do HCPA, em especial à Dra Laura Maria Fogliatto, por todo apoio e incentivo durante a elaboração deste projeto.

À Maria Aparecida Lima da Silva por sua disponibilidade junto ao laboratório do Centro de Terapia e Tecnologia Celular-HCPA. Sem a sua prestatividade este trabalho não teria acontecido.

Aos pacientes pela delicadeza e sensibilidade de compartilhamento de experiências que me permitiram ser uma pessoa melhor no âmbito da ciência, mas também no âmbito sentimental.

RESUMO

Introdução: A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa clonal cuja transformação neoplásica da célula-tronco hematopoiética ocasiona o acúmulo das células mieloides e seus progenitores. As células *Natural Killer* (NK) são componentes fundamentais da imunidade inata, apresentando a habilidade de defender rapidamente o organismo contra patógenos infecciosos e também possui ação contra células tumorais. No entanto, pacientes com LMC parecem ter menor contagem de células NK à medida que a doença progride, bem como a citotoxicidade diminuída nas células NK restantes. A terapia adotiva com células NK pode ter um papel potencial no tratamento de pacientes com LMC.

Materiais e métodos: Nosso estudo pretende explorar a viabilidade de se utilizar células NK autólogas para o tratamento de portadores de LMC, resistentes ou intolerantes aos inibidores de tirosino quinase (TKIs), além de conhecer o perfil epidemiológico desta população. Para tanto, precisamos esclarecer se, a partir de uma amostra de sangue periférico destes pacientes, conseguimos expandir células NK em número suficiente para a infusão *in vivo* no futuro. Foram analisadas amostras de sangue periférico de 6 pacientes com LMC. As células NK foram expandidas a partir de células mononucleares do sangue periférico após depleção dos linfócitos T. Elas foram co-culturadas com células apresentadoras de antígeno clone 9 K562, posteriormente modificadas para expressar interleucina-21 na membrana (mIL-21).

Resultados: Trinta e nove por cento dos pacientes acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram refratários ou intolerantes ao imatinibe. A sobrevida global em 8 anos de pacientes que fizeram uso de três ou mais linhas de tratamento foi significativamente menor quando comparada aos pacientes que conseguiram manter o imatinibe como a primeira linha de tratamento. Falha em atingir resposta citogenética completa, resposta molecular maior e interrupção do tratamento foram associadas com maior chance de progressão para terceira linha de tratamento. Todas as culturas apresentaram expansão adequada e clinicamente significativa das células NK. Aparentemente,

não há diferença para a expansão das células NK conforme TKI em uso, tempo de evolução da doença e resposta atual.

Conclusão: Este estudo demonstrou a efetividade da plataforma com mIL-21 para expansão de células NK em pacientes com CML refratários ou intolerantes aos inibidores de tirosina quinase. Os achados do nosso estudo são promissores e criam a possibilidade do uso de células NK autólogas neste grupo de pacientes.

Palavras-chave: Leucemia mieloide crônica, Células Natural Killer, Cultura celular, Inibidores Tirosina Quinase, Interleucina-21

ABSTRACT

Introduction: Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder which neoplastic transformation of hematopoietic stem cells leads to the accumulation of myeloid cells and their progenitors. Natural killer (NK) cells are a fundamental part of innate immunity, with a major role in rapid response against infectious agents and activating immune system against tumoral cells. Patients with CML, however, seem to have lower NK cell counts as disease progresses, as well as diminished cytotoxicity in those NK cells remaining. Adoptive NK cell therapy may have a potential role in treatment of CML patients.

Methods: The study aims to explore the feasibility of using autologous NK cells for the treatment of patients with CML resistant or intolerant to tyrosine-kinase inhibitors (TKIs), and the epidemiological profile of this population. Therefore, we need to clarify whether, from a peripheral blood sample of these patients, we were able to expand enough NK cells for infusion in vivo in the future. Peripheral blood samples from 6 CML patients were analyzed. NK cells were expanded from peripheral blood mononuclear cells after depletion of T cells. They were co-cultured with clone 9 K562 aAPCs (artificial antigen presenting cells), which were posteriorly modified to also express membrane interleukin-21 (mIL-21).

Results: Thirty nine percent of patients were refractory or intolerant to imatinib. Overall 8-year survival rate of the patients who went through three or more lines of treatment was significantly lower compared to the ones who were able to maintain imatinib as their first-line therapy. Failure in achieve complete cytogenetic response, major molecular response and treatment interruption were associated with progressing to the third line treatment. All cultures performed had adequate and clinically significant expansion of NK cells. Seemingly, there is no difference for NK cell expansion according to TKI in use, disease evolution time and current response.

Conclusion: The study demonstrated the effectiveness of the mIL-21 platform for NK cell expansion in CML patients refractory or intolerant to TKIs. Findings of this study are promising and generate the prospect of the possibility of using autologous NK cells in this group of patients.

Keywords: Chronic myelogenous leukemia, Natural Killer cells, Tyrosine kinase inhibitors; Interleukin-21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias de busca e seleção de artigos	Página 14
Figura 2: Chronic myelogenous leukemia patient's therapeutic evolution	Página 63
Figura 3: Cumulative survival according to stage of disease at diagnosis	Página 65
Figura 4: Cumulative survival for patients that achieved MMR with imatinib	Página 66
Figura 5: Comparison of survival according to interruption in the first line of treatment	Página 67
Figura 6: Cumulative survival in CML patients stratifying according to the number of treatment lines	Página 68
Figura 7: Number of NK cells cultured	Página 79
Figura 8: Immunophenotyping of patient 6 in D28, showing predominance of CD56+/CD16+ cells	Página 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios para definição de crise blástica	Página 16
Tabela 2: Critérios para definição de fase acelerada	Página 17
Tabela 3: Definições de respostas em leucemia mieloide crônica	Página 20
Tabela 4: Definição de resposta aos TKI em primeira linha de tratamento	Página 21
Tabela 5: KIR e seus ligantes HLA	Página 31
Tabela 6: Baseline characteristics of the population	Página 62
Tabela 7: Overall population characteristics according to the number of treatments needed	Página 64
Tabela 8: Patient characteristics	Página 78
Tabela 9: Characteristics of the mBL21-NK cell product	Página 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: *abelson leukemia virus*

ACA: Alterações citogenéticas adicionais

APC: Células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen presenting cells*)

BCR: *breakpoint cluster region*

CTLR: do inglês, *C-type lectin receptors*

DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro

ELN: European LeukemiaNet

GVL: Enxerto contra leucemia (do inglês, *graft-versus-leukemia*)

HLA: Antígeno leucocitário humano (do inglês, *human leukocyte antigen*)

IFN- γ : Interferon gama

IL-2: Interleucina-2

IL-15: Interleucina-15

IL-18: Interleucina-18

IL-21: Interleucina-21

kDa: kilodaltons

KIR: do inglês, *killer immunoglobulin-like receptors*

LIR1: do inglês, *leukocyte inhibitory receptor 1*

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

MDACC: MD Anderson Cancer Center

MHC: Complexo de histocompatibilidade maior (do inglês, *major histocompatibility complex*)

microL: microlitros

MO: Medula óssea

NCR: do inglês, *natural cytotoxicity receptors*

NK: *Natural Killer*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

Ph: Cromossomo *Philadelphia*

RCyC: Resposta citogenética completa

RHC: Resposta hematológica completa

RM: Resposta molecular

RMM: Resposta molecular maior

SP: Sangue periférico

TCTH: Transplante de células tronco hematopoiéticas

TKI: Inibidores de tirosino quinase (do inglês, *tyrosine-kinase inhibitor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações	14
2.2 Leucemia Mieloide Crônica	15
2.2.1 Introdução	15
2.2.2 Fisiopatologia.....	17
2.2.3 Prognóstico	18
2.2.4 Resposta ao Tratamento	19
2.2.5 Resistência aos TKI.....	21
2.2.6 Tratamento	22
2.3 Efeito enxerto contra leucemia.....	26
2.4 Células Natural Killer.....	28
2.4.1 Biologia das células NK	28
2.4.2 Função.....	29
2.4.3 Desenvolvimento	29
2.4.4 Receptores de células NK	30
2.4.5 Papel das células NK frente a doenças	32
2.4.6 Relação entre células NK e LMC e terapia com TKI.....	34
2.4.7 Aplicações terapêuticas das células NK	35
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivos primários.....	38
4.2 Objetivos secundários	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

6. ARTIGO EM INGLÊS: What happens to relapsed, refractory or intolerant Chronic Myeloid Leukemia patients without access to clinical trials?**Erro!**

Indicador não definido.

7. ARTIGO EM INGLÊS: Expansion of Natural Killer cells from intolerant or refractory chronic myelogenous leukemia patients with Interleukin-21**Erro!**

Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa clonal cuja transformação neoplásica da célula-tronco hematopoiética ocasiona o acúmulo das células mieloides e seus progenitores¹. Esta doença é o resultado de uma anormalidade genética caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph), originado da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Esta translocação forma a fusão do gene ABL (*abelson leukemia virus*) proveniente do cromossomo 9 com o gene BCR (*breakpoint cluster region*) do cromossomo 22^{2,3}. O oncogene híbrido BCR-ABL ativado promove a fosforilação de uma proteína quimérica. Esta proteína é responsável pela proliferação de um clone maligno de células inicialmente mieloides na medula óssea devido à atividade excessiva da tirosina quinase⁴.

O conhecimento desta anormalidade tem papel fundamental no desenvolvimento da terapia para esta condição. A introdução dos inibidores de tirosina quinase (TKI, do inglês *tyrosine-kinase inhibitor*), tratamento direcionado para a oncoproteína BCR-ABL, mudou drasticamente a história clínica dos pacientes com LMC. O mesilato de imatinibe foi a primeira droga desta classe^{5,6}. Entretanto, devido à resistência medicamentosa relacionada ao imatinibe uma segunda geração de TKI foi criada^{7,8}. Atualmente, nilotinibe e dasatinibe também estão aprovadas como tratamento de primeira para LMC e produzem maior benefício do que o imatinibe no que se refere aos parâmetros de resposta molecular, citogenética e hematológica^{9,10}. Entretanto, é comum que pacientes em uso de TKI apresentem efeitos colaterais destas drogas e por isso tenham que alterar o esquema de tratamento¹¹.

Apesar de todos estes avanços o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) ainda é considerado como único tratamento capaz de promover a cura da LMC. Atualmente, o TCTH é indicado em pacientes com LMC em fase crônica que apresentem refratariedade a uma ou mais linhas de tratamento ou ainda intolerância a dois TKIs diferentes, além daqueles portadores da mutação T315I. Pacientes que se apresentem em fase acelerada

ou crise blástica também têm indicação para realização do transplante ^{12,13}. O TCTH alogênico, no entanto, é um procedimento complexo acompanhado de elevada morbi-mortalidade.

O efeito do enxerto contra leucemia (GVL, do inglês, *graft-versus-leukemia*) descreve, em linhas gerais, uma resposta imuno-mediada capaz de induzir o estado de remissão continuada de uma doença onco-hematológica tratada através de TCTH e, em última análise, o GVL é o mecanismo de cura deste procedimento. Existem duas células capazes de reconhecer e lisar células neoplásicas: os linfócitos T citotóxicos e as células *natural killer* (NK) e ambas possuem ação central no mecanismo das reações GVL ^{14,15}. Este efeito foi primeiramente descrito em pacientes com LMC submetidos ao TCTH ¹⁶. A possibilidade de explorar o efeito GVL, sem utilizar o TCTH, proporcionaria a possibilidade de utilizar os benefícios do TCTH sem os malefícios gerados pelos linfócitos T alogênicos que causam a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) razão da não desprezível morbi-mortalidade do transplante.

As células NK são componentes fundamentais da imunidade inata, apresentando a habilidade de defender rapidamente o organismo contra patógenos infecciosos e também possui ação contra células tumorais ¹⁷. A funcionalidade das células NK é controlada por uma grande variedade de receptores de superfície, os quais podem atuar na inibição ou ativação celular. Esta dualidade regula a citotoxicidade das células NK ¹⁸. Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC do inglês, major histocompatibility complex) de classe I próprias do organismo e assim previnem a ativação das células NK contra alvos próprios ¹⁹.

O envolvimento das células NK frente a diversas condições patológicas já é reconhecido. Uma das funções primordiais das células NK é a vigilância imunológica que se dá através do reconhecimento de células neoplásicas como alvo ²⁰. As células NK fornecem proteção imunológica contra diversos tipos de infecções virais ²¹⁻²³, e também estão implicadas na patogênese e regulação de patologias autoimunes e no controle de doenças alérgicas ¹⁸.

Assim como para outras neoplasias, as células NK possuem marcada atividade citotóxica contra diferentes tipos de leucemia, atuando na linha de

frente de combate contra as células tumorais. Na LMC, o número de células NK parece diminuir com a progressão da doença da fase crônica para a crise blástica; entretanto, a translocação do gene BCR-ABL afeta células dendríticas, gerando mecanismos que facilitarão que as células doentes escapem da lise mediada pelas células NK ²⁴. A terapia alvo com TKI também possui efeitos sobre as células NK. Imatinibe e dasatinibe possuem impactos positivos sobre a quantidade e citotoxicidade das células NK, enquanto que para o nilotinibe, o impacto exercido pelo sobre a citotoxicidade das células NK é menor ²⁵⁻²⁷.

Em estudos *in vitro*, demonstramos que células NK obtidas da medula óssea de portadores de LMC são capazes de desenvolver atividade citotóxica contra as células BCR-ABL positivas do próprio paciente ²⁸. Nosso estudo pretende explorar a viabilidade de se utilizar células NK autólogas para o tratamento de portadores de LMC, resistentes ou intolerantes aos TKIs. Para tanto, precisamos esclarecer se, a partir de uma amostra de sangue periférico destes pacientes, conseguimos com a plataforma tecnológica estabelecida em nosso Centro de Tecnologia e Terapia Celular, expandir células NK em grau clínico, ou seja, em números suficientes para a infusão *in vivo*. Também é necessário conhecer o perfil epidemiológicos e desfechos clínicos desta população de interesse.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Esta revisão da literatura foi elaborada através de revisão bibliográfica de artigos científicos publicados em revistas, periódicos e jornais nacionais e internacionais. O objetivo da revisão foi levantar dados relacionando ao uso terapêutico de células NK com o efeito doença do enxerto versus hospedeiro (DECH) em pacientes com LMC antes da realização de transplante de células tronco hematopoiéticas. Foram selecionadas as publicações nas bases de dados do PubMed, ScienceDirect e Scielo, utilizando-se associados e/ou isoladamente os unitermos “hematopoietic stem cell transplantation”, “natural killer cell”, “graft-versus-host-disease”, “graft-versus-leukemia-effect”, “chronic myelogenous leukemia”, “tyrosine kinase inhibitors” e “KIR receptor” para artigos publicados entre 1980 e 2017, conforme apresentado na figura 1.

	Pubmed		SCIELO
	55327	1	73
	32767	2	34
7	444	1+2	0
4	351	1+4	2
5	294	1+5	1
2	50	1+6	6
6	1779	2+3	1
4	409	2+4	0
19	3436	2+5	10
	444	2+6	0
29	68	1+2+3	0
16	36	1+2+4	0
13	44	1+2+5	0
18	36	1+2+6	0

1 - Natural Killer cell
 2 - Chronic Myelogenous Leukemia OR chronic myeloid leukemia
 3 - Hematopoietic stem cell transplantation
 4 - Graft-versus-leukemia-effect
 5 - Tyrosine kinase inhibitors
 6 - KIR receptor

Figura 1. Estratégias de busca e seleção de artigos

2.2 Leucemia Mieloide Crônica

2.2.1 Introdução

A LMC é uma desordem mieloproliferativa clonal cuja transformação neoplásica da célula-tronco hematopoiética ocasiona o acúmulo das células mieloides e seus progenitores ¹. A incidência da LMC é de 1 a 1,5 casos para cada 100 mil habitantes/ano e representa aproximadamente 15% de todas as leucemias. A mediana de idade ao diagnóstico é de aproximadamente 67 anos, com menos de 10% dos casos em pacientes com menos de 20 anos, e costuma incidir mais frequentemente em homens ^{29,30}.

A apresentação clínica da LMC, assim como a sua evolução, é extremamente heterogênea ³¹. Tradicionalmente, a doença evolui em três fases: crônica, acelerada e crise blástica. Na fase crônica ocorre proliferação clonal maciça das células granulocíticas, mantendo estas a capacidade de diferenciação. A maioria dos pacientes é diagnosticada durante esta fase, sendo que até 40% dos pacientes são assintomáticos ^{32,33}. Fase crônica é definida pela contagem de blastos inferior a 15%, basófilos inferior a 20% além da soma entre blastos e promielócitos menor do que 30% no sangue periférico e na medula óssea ⁵.

Posteriormente, num período de tempo que varia de 3 a 5 anos, o clone leucêmico acumula alterações genéticas secundárias e a doença passa a ser de difícil controle e pode progridir para uma leucemia aguda ou crise blástica ³². Nesta fase ocorre acúmulo de células blásticas em sangue periférico ou medula óssea ou ainda agregado de blastos extramedular (Tabela 1) ^{13,34}. Por tratar-se de uma proliferação clonal da célula-tronco hematopoiética pluripotente os blastos podem sofrer diferenciação mieloide ou linfoide, sendo necessária análise imunofenotípica para correta determinação ³⁵. Aproximadamente 80% dos pacientes evoluem para crise blástica com diferenciação mieloide ou indiferenciada e os demais apresentam blastos com linhagem linfoide ³⁶. Crise blástica extramedular mais comumente acomete pele, linfonodos, sistema nervoso central e baço; entretanto, pode acometer qualquer outro sítio ³⁷.

Tabela 1. Critérios para definição de crise blástica

	Definição
ELN ¹³	<ul style="list-style-type: none"> - Blastos \geq 30% em SP ou MO - Proliferação blástica extramedular, exceto baço
OMS ³⁴	<ul style="list-style-type: none"> - Blastos \geq 20% em SP ou MO - Proliferação blástica extramedular, exceto baço - Grandes focos ou aglomerados de blastos em biópsia de medula óssea

A fase intermediária, chamada de fase acelerada, é caracterizada por sintomas constitucionais como febre, sudorese noturna, dor óssea, perda de peso além de esplenomegalia progressiva. Ocorre dificuldade em controle das contagens, assim como refratariedade ao tratamento convencional ³⁸. Os pacientes podem desenvolver alterações cariotípicas adicionais, sendo mais frequentes as trissomias do 8 e do 19 e isocromia i(17q) ^{39,40}. Antes do desenvolvimento dos TKI, a fase acelerada apresentava tempo médio de evolução de aproximadamente um ano ³⁸. Existem três versões distintas de critérios para definição de fase acelerada da LMC, publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ³⁴, European LeukemiaNet (ELN) ¹³ e MD Anderson Cancer Center (MDACC) ¹. Estes critérios foram agrupados na tabela 2.

Tabela 2. Critérios para definição de fase acelerada

	Definição
ELN¹³	<ul style="list-style-type: none"> - Blastos em SP ou MO 15-29% - Blastos e promielócitos > 30% em SP ou MO, com blastos < 30% - Basófilos ≥ 20% em SP - Plaquetopenia persistente ≤ 100 x 10⁹/L não relacionada ao tratamento - Anormalidades cromossômicas em células Ph+, rota maior, sob tratamento
MDACC¹	<ul style="list-style-type: none"> - Blastos ≥ 15 e < 30% em SP - Blastos e promielócitos ≥ 30% em SP - Basófilos ≥ 20% em SP - Plaquetas ≤ 100 x 10⁹/L não relacionada ao tratamento - Evolução clonal
OMS³⁴	<ul style="list-style-type: none"> - Persistente ou aumento de leucócitos (> 10 x10⁹/L), não responsivo ao tratamento - Persistente ou aumento da esplenomegalia, não responsivo ao tratamento - Trombocitose persistente (> 1000 x10⁹/L), não responsiva ao tratamento - Trombocitopenia persistente (< 100 x10⁹/L), não responsiva ao tratamento - Basófilos ≥ 20% em SP - 10-19% de blastos em SP ou MO - Anormalidades cromossômicas adicionais em células Ph+, que incluem rota maior, cariótipo complexo ou anormalidades do 3q26.2 - Nova anormalidade cromossômica clonal que ocorra durante o tratamento - Resistência hematológica ao primeiro TKI (ou falha em atingir RHC) - Indicação hematológica, citogenética ou molecular de resistência a dois TKI sequenciais - Ocorrência de duas ou mais mutações no BCR-ABL1 durante o tratamento com TKI

2.2.2 Fisiopatologia

A LMC é o resultado de uma anormalidade genética caracterizada pela presença do cromossomo Ph, originado da translocação entre os braços longos

dos cromossomos 9 e 22. Esta translocação forma a fusão do gene ABL proveniente do cromossomo 9 com o gene BCR do cromossomo 22 ^{2,3}. O oncogene híbrido BCR-ABL ativado promove a fosforilação de uma proteína quimérica geralmente de 210 kDa (p210BCR-ABL), responsável pela proliferação de um clone maligno na medula óssea devido à atividade excessiva da tirosina quinase ^{1,4}. Na LMC, o ponto de ruptura do BCR ocorre entre os éxons 12 e 16. Quando este ponto de ruptura ocorre entre o primeiro e segundo éxons a proteína de fusão gerada tem tamanho menor (p190), sendo esta alteração mais frequente nos pacientes com leucemia linfoblástica aguda ⁴. Estas variações são responsáveis pelas diferenças fenotípicas ocorridas na doença ⁴¹.

Podem ocorrer alterações citogenéticas adicionais (ACA), sendo as mais frequentes, trissomias do cromossomo 8 (+8) e 19 (+19), cromossomo Ph extra (+Ph), isocromossomo 17 i(17q) e ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11), todas também conhecidas como alterações de “rota principal” ⁴². Embora as deleções do cromossomo 9 não apresentem valor prognóstico, as alterações de “rota principal” estão associadas a piores respostas ⁴³.

O conhecimento desta anormalidade tem papel fundamental no desenvolvimento da terapia para esta condição. A introdução dos TKI, tratamento direcionado para a oncoproteína BCR-ABL, mudou drasticamente a história clínica dos pacientes com LMC ⁶.

2.2.3 Prognóstico

Diversos escores prognósticos foram desenvolvidos no cenário da LMC com intuito de prever o tempo da fase crônica e risco de progressão da doença ⁴⁴, sendo os escores de Sokal, Hasford e EUTOS os mais utilizados na prática clínica, todos devendo ser calculados em pacientes virgens de tratamento ⁴⁵⁻⁴⁷.

Sokal⁴⁵ leva em consideração idade do paciente; tamanho do baço, medido em centímetros abaixo de rebordo costal esquerdo; contagem de plaquetas e porcentagem de blastos circulantes e Hasford⁴⁶ associa a porcentagem de basófilos e eosinófilos a estas variáveis. Estes escores foram

validados e publicados antes do advento dos TKI, entretanto, ainda são úteis e conseguem prever sobrevida relativa em pacientes em uso de Imatinibe ⁴⁸. O escore EUTOS⁴⁷ avalia tamanho do baço e porcentagem de basófilos e foi validado em uma coorte com pacientes usuários de Imatinibe em primeira linha de tratamento.

2.2.4 Resposta ao Tratamento

A resposta que o paciente atinge com o uso do TKI é fator prognóstico importante. Os objetivos do tratamento visam o alcance da resposta hematológica completa (RHC), de respostas citogenéticas maiores e de respostas moleculares profundas (Tabela 3). RHC é definida como número de leucócitos inferior a 10000/microL, ausência de granulócitos imaturos e menos do que 5% de basófilos; contagem plaquetária inferior a 450000/microL e baço não palpável ao exame físico. Resposta citogenética maior é atingida quando há redução para níveis inferiores a 35% de metáfises de *Ph*. Na resposta ótima ao tratamento, espera-se que o paciente atinja RHC até três meses do início de um TKI, alcance resposta citogenética maior até os 6 meses e aos 12 meses resposta citogenética completa ¹³. Aos 3 meses, a obtenção de uma presença de transcritos BCR-ABL > 10% parece ter impacto prognóstico negativo ^{49,50}. Após, espera-se que o paciente atinja respostas moleculares maiores (RMM), caracterizada pela redução de transcritos BCR-ABL a uma quantidade superior a 3 logaritmos ou proporção de BCR-ABL1/ABL1 $\leq 0,1\%$, e cada vez mais profundas (Tabela 4) ¹³.

Por muitos anos procurou-se avaliar amostras de sangue periférico ou medula óssea de pacientes com LMC assintomáticos, com intuito de diagnosticar-se precocemente recaídas. Com o advento da tecnologia para análise molecular, passou-se a monitorizar pacientes com LMC respostas citogenéticas e com isso, pode-se identificar os pacientes que tendem a apresentar respostas mais duradouras e por consequência menores riscos de recaída ⁵¹. Níveis profundos de resposta molecular podem ser definidos de acordo com a padronização internacional para análise de PCR BCR-ABL a partir

da redução de 4 logaritmos ⁵². Evidências sugerem que a obtenção de respostas moleculares profundas, principalmente quando atingidas precocemente, correlacionam-se com melhores desfechos a longo prazo, tais como sobrevida e progressão ⁵³.

Tabela 3. Definições de respostas em leucemia mieloide crônica¹³

Definições	
RHC	<ul style="list-style-type: none"> - Leucócitos totais < 10000/microL - Basófilos < 5% - Ausência de mielócitos, promielócitos e mieloblastos - Plaquetas < 450000/microL - Baço não palpável
Resposta citogenética	
Maior	<ul style="list-style-type: none"> - Completa: Ausência de metáfises de Ph ou < 1% de núcleos positivos de BCR/ABL de pelo menos 200 núcleos no FISH - Parcial: 1-35% de metáfises de Ph
Menor	- 36-65% de metáfises de Ph
Mínima	- 66-95% de metáfises de Ph
Ausência	- > 95% de metáfises de Ph
Resposta molecular	
maior	
RM3	- Doença detectável com proporção de BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0,1% (≥ 3 log de redução) conforme escala internacional
RM4	- Doença detectável com proporção de BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0,01% (≥ 4 log de redução) conforme escala internacional
RM4.5	- Doença detectável com proporção de BCR-ABL/ABL1 ≤ 0,0032% (≥ 4,4 log de redução) conforme escala internacional
RM5	- Doença detectável com proporção de BCR-ABL1/ABL1 ≤ 0,0001% (≥ 5 log de redução) conforme escala internacional

Tabela 4. Definição de resposta aos TKI em primeira linha de tratamento (adaptado de Baccarani *et al*)¹³

	Resposta ótima	Warning	Falha
Início de tratamento	NA	Pacientes de alto risco ou alterações, ACA/Ph+, "rota principal"	NA
3 meses	BCR-ABL \leq 10% e/ou Ph+ \leq 35%	BCR-ABL $>$ 10% e/ou Ph+ 36-95%	Ausência RHC e/ou Ph+ $>$ 95%
6 meses	BCR-ABL $<$ 1% e/ou Ph+ 0	BCR-ABL 1-10% e/ou Ph+ 1-35%	BCR-ABL $>$ 10% e/ou Ph+ $>$ 95%
12 meses	BCR-ABL \leq 0,01%	BCR-ABL $>$ 0,1-1%	BCR-ABL $>$ 1% e/ou Ph+ $>$ 0%
Após e a qualquer momento	BCR-ABL \leq 0,01%	ACA/Ph- (-7 ou -7q)	Perda de RHC Perda de RCyC Perda confirmada de RMM Mutações ACA/Ph+

NA: não se aplica

2.2.5 Resistência aos TKI

Resistência ou intolerância ao tratamento padrão com TKI pode ocorrer. Estima-se que aproximadamente 25 a 30% dos pacientes inicialmente tratados com imatinibe possam exibir resistência primária⁵, definida como ausência de resposta hematológica completa após 3 meses de tratamento; ausência de qualquer resposta citogenética em 6 meses; ausência de resposta citogenética maior em 12 meses; elevação das contagens de leucócitos em duas ocasiões subsequentes ou recaída após remissão hematológica completa ou resposta citogenética maior⁵⁴. A resistência primária comumente ocorre por mecanismos independentes ao BCR-ABL e pode reverter com simples aumento da dose do TKI. Entretanto, cerca de 10% dos pacientes ainda apresentam-se resistentes mesmo com esta mudança posológica⁵⁵.

Por outro lado, resistência secundária, definida como perda de resposta, geralmente está relacionada a fatores BCR-ABL dependentes. Os mecanismos descritos relacionados a este fenômeno são: superexpressão dos transcritos BCR-ABL; mutação de ponto no domínio tirosino quinase ABL; amplificação

genômica da proteína BCR-ABL ⁵⁶. As mutações ponto são a alteração mais frequente no cenário de pacientes com progressão da LMC após uso de um TKI. Cerca de 50% dos pacientes possuem mutações detectadas ^{56,57}, sendo a mutação T315I a mais frequente ⁵⁶. Dasatinibe e nilotinibe possuem perfis de resistência muito semelhantes, assim como imatinibe e também o bosutinibe ambos apresentam resistência à mutação T315I ^{56,58,59}.

2.2.6 Tratamento

Até a década de 1980, o tratamento da LMC era insatisfatório. Inicialmente a escolha terapêutica recaía sobre arsênico e radioterapia, capazes apenas de proporcionar certo alívio sintomático. Nos anos 50, o tratamento de escolha era o bussulfano, com melhora da qualidade de vida, mas também sem impacto na sobrevida global dos pacientes. Foi posteriormente substituído pela hidroxycarbamida. Remissão citogenética através de medicamentos foi primeiramente descrita com alfa-interferon e por este motivo, entre os anos 1980 e 2000, os pacientes que não eram elegíveis ao TCTH recebiam este tratamento ⁶⁰⁻⁶². No entanto, o TCTH era a terapêutica de escolha, principalmente quando o cenário era formado por pacientes jovens, em fase crônica no primeiro ano após diagnóstico ⁶³, com doador aparentado antígeno leucocitário humano (HLA) idêntico, visto que a sobrevida livre de leucemia em 5 anos era de aproximadamente 60%, contrastando com a ausência desta resposta nos usuários de interferon ou hidroxiureia ⁶⁴⁻⁶⁶.

A partir de 1990, o enfoque da terapêutica da LMC mudou para a síntese de moléculas capazes de inibir a atividade de tirosino quinase da proteína BCR-ABL. O mesilato de imatinibe, primeira droga desta classe, apresenta um efeito inibidor específico sobre três tirosinas quinases: ABL (BCR-ABL, v-ABL, c-ABL), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e c-Kit. Através desta característica promove uma atividade antiproliferativa em linhagens celulares que expressam proteína ABL ativada e levam à morte celular por apoptose ⁶⁷.

Em 2002, o imatinibe foi aprovado para tratamento de primeira linha dos pacientes portadores de LMC baseado nos resultados obtidos pelo estudo IRIS

(*International Randomized Study of Interferon and STI571*). Após um seguimento mediano de 19 meses, a taxa estimada de resposta citogenética maior aos 18 meses era de 87,1% para o grupo do imatinibe e de 34,7% no grupo que recebeu interferon e citarabina ($p < 0,001$). As taxas estimadas de resposta citogenética completa foram de 76,2% para o imatinibe e 14,5% para o interferon e citarabina ($p < 0,001$). Aos 18 meses, a sobrevida livre de progressão para fase acelerada ou crise blástica foi de 96,7% e 91,5% respectivamente ($p < 0,001$)⁵. Os estudos de seguimento destes pacientes também mostravam que os pacientes persistiam com resposta sustentada ao tratamento em longo prazo. Após um período mínimo de 8 anos, 55% dos pacientes permaneciam em uso do imatinibe, comprovando a boa tolerância ao tratamento, tendo como resultado: sobrevida livre de progressão de 92% e sobrevida global estimada de 85%⁶.

Para superar o fenômeno da resistência medicamentosa uma segunda geração de TKI foi criada. O nilotinibe, um potente inibidor da BCR-ABL quinase, estruturalmente semelhante ao imatinibe, porém com maior afinidade ao receptor, e o dasatinibe, inibidor potente da BCR-ABL quinase, assim como da Src quinase, c-kit e fator de crescimento derivado das plaquetas, fazem parte dessa nova geração de drogas^{7,8}. Ambas medicações estão aprovadas, também como primeira linha de tratamento para LMC, visto que produzem maior benefício do que o imatinibe no que se refere aos parâmetros de resposta molecular, citogenética e hematológica, assim como no que tange à progressão da doença^{9,10}. Além delas, o bosutinibe também compõe o grupo dos TKI de segunda geração. Seu uso encontra-se liberado nos Estados Unidos e na Europa para os pacientes intolerantes ou resistentes ao tratamento prévio⁶⁸. Quando comparado com o imatinibe, o bosutinibe produz respostas citogenéticas e moleculares similares, entretanto, os pacientes em uso de bosutinibe apresentam maiores taxas de efeitos adversos como diarreia e vômitos, dispepsia e reações anafiláticas. Devido a estes efeitos colaterais houve maiores níveis de descontinuação do bosutinibe (19%), quando comparado ao braço de pacientes em uso de imatinibe (6%)⁶⁹.

Considerando-se que imatinibe, dasatinibe e nilotinibe são opções estudadas e liberadas como primeira linha de tratamento da LMC, a decisão acerca de qual melhor TKI para iniciar-se um tratamento deve recair sobre

algumas variáveis. Deve-se levar em consideração os resultados a longo prazo, custos e principalmente perfil de comorbidades do paciente. Estas variáveis também contribuem na decisão quanto ao melhor esquema terapêutico a ser adotado em segunda linha ¹³. A presença de efeitos colaterais maiores, graus 3 e 4, os quais geralmente ocorrem no início do tratamento, podem ser responsáveis por até 10% das descontinuações terapêuticas ^{13,70}. Além disso, a ocorrência de efeitos colaterais está relacionada a menores taxas de aderência ao tratamento e conseqüentemente respostas mais pobres ⁷¹.

É comum que pacientes em uso de TKI apresentem efeitos colaterais destas drogas ¹¹. Estes eventos adversos, decorrem em grande parte dos efeitos “fora do alvo” destas medicações. Estes efeitos resultam da não seletividade quanto à inibição da proteína BCR-ABL e acabam por lesar tecidos saudáveis e são mais frequentes no grupo dos TKIs de segunda geração ⁷². Dentre os pacientes em uso de imatinibe, até 50% experimentarão algum grau de toxicidade, porém apenas uma pequena minoria terá que suspender o tratamento devido aos eventos adversos ⁷⁰. A associação entre o nilotinibe e doença arterial periférica e coronariana já está bem estabelecida, por outro lado, o dasatinibe apresenta maior incidência de complicações pleurais e respiratórias. Além disso, todos os TKI podem ocasionar toxicidade cardiológica, assim como mielossupressão ^{11,13}.

Em 2013 foi aprovado o uso de ponatinibe, um TKI de terceira geração, único TKI com ação contra a mutação do T315I ⁷³. Além de pacientes que apresentem esta mutação, o ponatinibe também pode ser utilizado em pacientes em fase crônica que falharam a primeira linha de tratamento ¹³.

Pacientes que se apresentam ou progridam da fase crônica para a fase acelerada apresentam maior dificuldade de controle da doença. Ainda assim, evidências mostram que cerca de 80% dos pacientes tratados com imatinibe atingem RCyC e 63% chegam a apresentar RMM. Já, um percentual ainda maior de pacientes que fazem uso de dasatinibe ou nilotinibe atingem RCyC e RMM, 90% e 76% respectivamente ⁷⁴. Por outro lado, os pacientes que evoluam para crise blástica possuem redução drástica na expectativa de vida ⁷⁵. Os tratamentos iniciais existentes possuem como objetivo principal permitir que o

paciente seja submetido ao TCTH na fase crônica, se possível ¹³. Existem duas formas de crise blástica: mieloide e linfoide. A crise blástica linfoide, com linfócitos da linhagem B, ocorre em aproximadamente 30% dos casos e tende a apresentar respostas ligeiramente superiores ao tratamento do que a crise blástica mieloide ⁷⁶. Pode ser necessário o acréscimo de tratamentos quimioterápicos convencionais aos TKI para melhores resultados, especialmente no cenário da crise blástica linfoide ⁷⁷.

Apesar de todos estes avanços o TCTH ainda é considerado como único tratamento capaz de promover a cura. Apesar disso, somente 15% a 30% dos pacientes serão candidatos a este procedimento, tendo como principal limitante a idade e a indisponibilidade de doador compatível. Além disso, apresenta elevada morbimortalidade ¹². Os primeiros estudos feitos no contexto do TCTH em pacientes com LMC datam da década de 1980, inicialmente com a realização de TCTH singênico. Em um primeiro momento, todos os pacientes em fase crônica apresentaram RCyC, porém 25% apresentaram recidivas em até 30 meses pós-transplante ⁷⁸. Após esta constatação, passou-se a estudar a realização de TCTH com doadores aparentados. A sobrevida livre de leucemia em três anos não diferiu estatisticamente, entretanto os pacientes tratados com TCTH de doadores aparentados apresentaram menor risco de recidiva sobretudo aqueles que receberam enxerto sem depleção de linfócitos e que apresentaram DECH. Deste modo, concluiu-se a importância do efeito GVL no cenário da LMC ⁷⁹.

Atualmente, o TCTH é indicado em pacientes com LMC em fase crônica que apresentem refratariedade a uma ou mais linhas de tratamento ou ainda intolerância a dois TKIs diferentes, além daqueles portadores da mutação T315I. Pacientes que se apresentem em fase acelerada ou crise blástica também possuem indicação para realização do transplante. Os regimes de condicionamento mieloablativo são preferenciais, sempre que possível ¹³.

2.3 Efeito enxerto contra leucemia

O efeito GVL, do inglês *graft-versus-leukemia*, descreve, em linhas gerais, uma resposta imuno-mediada capaz de conservar o estado de remissão continuada de uma doença onco-hematológica tratada através de TCTH. Inicialmente, o GVL era considerado como um componente menor da DECH. No entanto, admite-se atualmente, que os mecanismos envolvidos nestas duas situações estão intimamente associados ^{14,15}; porém, estudos em modelos animais, além de algumas evidências em humanos, indicam que GVL e DECH podem funcionar independentemente ⁸⁰. DECH requer o reconhecimento dos antígenos apresentados pelas moléculas do MHC, através das células T do doador, gerando uma resposta efetora envolvendo linfócitos e citocinas ¹⁵. Esta resposta pode ser direcionada a uma série de tecidos, incluindo pele, mucosas, medula óssea, pulmões e vias biliares. Por outro lado, nas reações GVL, a alo-resposta suprime a doença leucêmica residual ⁸¹.

Existem duas células capazes de reconhecer e lisar células neoplásicas: os linfócitos T citotóxicos e as células NK e ambas possuem ação central no mecanismo das reações GVL ¹⁴.

Os genes do complexo MHC codificam duas classes de moléculas de superfície. As moléculas de classe I são expressas na superfície das células nucleadas, e atuam na fase efetora da imunidade apresentando os antígenos para os linfócitos T CD8+, enquanto as de classe II são restritas aos monócitos, linfócitos B e células dendríticas. Monócitos e células dendríticas atuam apresentando fragmentos de antígenos para os linfócitos T CD4+ (*helper*) e por isso também são conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APC) ⁸². Existem múltiplas variações nas moléculas do MHC e as diferenças entre elas podem gerar respostas de linfócitos T aloreativos, trazendo um risco de rejeição do órgão transplantado, quando trata-se de transplantes de órgãos sólidos, ou uma produção de citocinas desregulada gerando um quadro inflamatório grave, conhecidos clinicamente como DECH ⁸³.

Por outro lado, o mecanismo de reconhecimento das células alvo pelas células NK não é completamente elucidado ⁸⁴. Dois grupos de receptores de

superfície celular inibitórios, que contrariamente ao inicialmente imaginado, interagem com as moléculas do MHC prevenindo lise, já são conhecidos. O primeiro destes grupos, conhecido como receptores KIR (do inglês, *killer immunoglobulin-like receptors*) age sobre moléculas de classe I ⁸⁵. No cenário do TCTH as células NK do doador são inibidas através de interações com moléculas MHC classe I do receptor. Esta interação faz com que as células NK infundidas tolere as células normais. Entretanto, as células tumorais, que tendem a apresentar expressão alterada destas moléculas em sua superfície, são reconhecidas e lisadas ¹⁹.

A DECH é uma condição clínica que possui diversas apresentações e vários graus de severidade, podendo levar alguns pacientes ao óbito. Quando ocorre após transcorridos 100 dias do TCTH geralmente está correlacionado ao DECH crônico, embora esta classificação não seja totalmente adequada, visto que há descrição de uma síndrome semelhante ao DECH agudo ocorrendo após este período ^{83,86}. Os principais alvos do DECH agudo são fígado, trato gastrointestinal, pele e pulmões ⁸³. Por outro lado, o DECH crônico, um processo mais fibrótico junto aos órgãos acometidos, pode incidir em até 70% dos pacientes pós-transplante e é a principal causa de mortalidade não relacionada à recidiva da doença base ^{87,88}. Em ambas as situações o tratamento se dá através de imunossupressão ⁸⁶.

Na década de 1980, percebeu-se o impacto positivo da DECH nas recaídas de leucemia. Na ocasião, notou-se que os pacientes que sobreviviam a um quadro grave de DECH apresentavam sobrevida maior do que os pacientes que não eram acometidos por esta condição ⁸⁹. Estudos posteriores mostraram que pacientes com LMC que eram submetidos ao TCTH com depleção de linfócitos T apresentavam maior possibilidade de recidiva da doença, fato que confirmava a importância dos linfócitos frente ao desenvolvimento de GVL. Além disso, também evidenciou-se que pacientes com LMC são mais suscetíveis aos efeitos GVL mediados por linfócitos ^{16,79}.

2.4 Células *Natural Killer*

2.4.1 Biologia das células NK

As células NK são grandes linfócitos granulares que correspondem até 15% das células sanguíneas na circulação periférica e também podem ser encontradas no baço, cavidade peritoneal, fígado, pulmões, linfonodos, timo e útero durante a gestação ⁹⁰. Morfologicamente são células semelhantes aos grandes linfócitos com citoplasma granular, sendo estes grânulos azurofílicos sua característica histológica mais marcante. Associado a isso, apresentam citoplasma mais abundante quando comparados aos linfócitos típicos. Os grânulos citoplasmáticos das células NK são importantes na ação citotóxica e contêm uma proteína chamada perforina, além de um grupo de enzimas conhecidas como granzimas ⁹¹.

A capacidade citotóxica das células NK frente a uma célula-alvo identificada ocorre através de dois mecanismos principais. Exocitose das granzimas através da perforina acabam induzindo apoptose do alvo celular. O segundo mecanismo refere-se a apoptose dependente da caspase através da associação de alguns receptores como o Fas/CD59. Citotoxicidade celular dependente de anticorpos também pode ser um mecanismo de ataque às células tumorais principalmente pelas células CD56^{dim} ¹⁸.

Fenotipicamente as células NK são conhecidas pela expressão de CD56, uma isoforma da molécula de adesão celular neural, em sua superfície, associado a ausência de marcadores comuns em linfócitos T, tais quais CD3 e receptor de células T ⁹⁰. A molécula de adesão celular neural não possui função conhecida junto às células NK, embora estudos sugiram que ela pode mediar interações entre as células NK e seus alvos celulares ⁹². A intensidade de expressão do CD56 na superfície celular diferencia dois subtipos de células NK com funcionalidades distintas ⁹⁰.

2.4.2 Função

As células NK são componentes fundamentais da imunidade inata, apresentando a habilidade de defender rapidamente o organismo contra patógenos infecciosos e também possui ação contra células tumorais. Além disso, também atuam secretando citocinas, como interferon gama (IFN- γ), que auxiliam nas respostas inata e adaptativa da imunidade ¹⁷. Diferentemente dos linfócitos T, as células NK são capazes de lisar células-alvo através de mecanismos independentes ao MHC ⁹³.

Aproximadamente 90% das células NK na corrente sanguínea são do subtipo CD56^{dim}, as quais expressam um receptor de baixa afinidade em altos níveis para a região constante da imunoglobulina G, FC γ RIIIa (CD16). As demais células NK circulantes são conhecidas como CD56^{bright} ⁹³. As células NK CD56^{dim} possuem propriedades citolíticas complexas, capazes de eliminar células tumorais ou infectadas sem sensibilização prévia ⁹⁴. Além disso, possuem maior ação citotóxica contra alvos sensíveis as células NK, tais quais a linhagem celular K562 ⁹⁵. As células CD56^{dim} apresentam, em repouso, uma densidade variável de receptores KIR em sua superfície, situação que parece ser muito relevante na prevenção de condições autoimunes bem como frente a transformação maligna. Por outro lado, a minoria de células NK circulantes, composta pelo grupo das células CD56^{bright} possuem ação mais direcionada na regulação imunológica que se dá através da produção de múltiplas citocinas e quimiocinas. Estas células expressam receptores de alta e intermediária afinidade para interleucina-2 (IL-2) e apresentam expansão *in vivo* ou *in vitro* em resposta a baixa dose de IL-2 ⁹⁴.

2.4.3 Desenvolvimento

Assim como ocorre com os linfócitos B e T, as células NK derivam da célula tronco hematopoiética CD34+ na medula óssea. Entretanto, seus precursores medulares ainda não foram identificados sugerindo que a maturação e desenvolvimento pode ocorrer em outros sítios anatômicos. Estudos recentes

mostram que as células NK também podem ser desenvolvidas no fígado e nos linfonodos ^{18,96}. Diversos fatores de transcrição, como Ets-1, Id2, Ikaros e PU.1 já foram identificados ⁹⁷. A maturação das células NK é regulada através do Gata-3 e IRF-2 e após sofre diferenciação funcional por meio do CEBP- γ , MEF e MITF ¹⁸. Além disso, a interleucina-15 mostrou-se essencial para o desenvolvimento, homeostase e sobrevivência destas células. Entretanto, estudos recentes associam a atividade da interleucina-21 (IL-21) frente a proliferação e maturação das células NK. *In vitro*, APCs modificadas geneticamente para expressar IL-21 promovem maior proliferação de células NK humanas, com maiores telômeros e menor senescência, o que pode significar maior potencial de expansão *in vivo* destas células. Além disso, apresentam significativos na imunidade antitumoral ⁹⁸. A atividade citolítica das células NK maduras é estimulada pela IL-2 e em menor escala pelas interleucinas 7 e 12 ⁹⁹.

2.4.4 Receptores de células NK

A funcionalidade das células NK é controlada por uma grande variedade de receptores de superfície, os quais podem atuar na inibição ou ativação celular. Esta dualidade regula a citotoxicidade das células NK. De um modo geral, o grupo de receptores inibitórios é composto pelos receptores KIR, os receptores de lectina tipo C (CTLR, do inglês *C-type lectin receptors*) (CD94-NKG2A) e também pelos receptores inibidores de leucócitos (LIR1, do inglês *leukocyte inhibitory receptors*). Por outro lado, os receptores de ativação são os receptores de citotoxicidade natural (NCR, do inglês *natural cytotoxicity receptors* – NKp46 e NKp44), os próprios CTLR (CD94-NKG2A) e os receptores *Ig-like* (2B4) ¹⁸. Considerando que alguns destes receptores de ativação também são encontrados em outras células é imprescindível que a ativação de células NK esteja sobre um controle rígido dos receptores inibitórios ¹⁰⁰.

Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas MHC de classe I próprias do organismo e assim previnem a ativação das células NK. A teoria do *missing self* proposta em 1986 por Kärre e colaboradores¹⁰¹ pressupõe que as células NK protegem os tecidos com expressão adequada destas moléculas

MHC de classe I e lisam as células que expressem de forma aberrante o MHC classe I. Sabe-se que muitas células infectadas por vírus ou tumorais diminuem a expressão do MHC classe I com a intenção de escapar do reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos, mas deste modo tornam-se vulneráveis à ação das células NK ¹⁸.

Existem ao menos 15 subtipos diferentes de KIR identificados no cromossomo 19q13.4. Estruturalmente, os receptores KIR contém dois ou três domínios extracelulares *Ig-like* e reconhecem moléculas MHC de classe I. A funcionalidade do KIR depende do tamanho do domínio citoplasmático, sendo que o curto (S) apresenta ação ativadora enquanto que o longo (L) é inibidor. O número destes domínios extra e intracelular designam a nomenclatura destes receptores (ex.: KIR2DL ou KIR3DS). O grupo KIR inclui receptores para determinantes polimórficos de HLA-A, HLA-B, HLA-C, além dos não clássicos HLA-E e HLA-G. O HLA-C é particularmente importante no reconhecimento de células já que existem diversas ligações específicas bem descritas para antígenos associados a este HLA ⁹⁴. A tabela 5 apresenta a especificidade de cada HLA classe I com seu receptor KIR.

Tabela 5. KIR e seus ligantes HLA (adaptado de Thielens *et al*)¹⁰²

KIR	Ligante
KIR2DL1	HLA-C
KIR2DL2	HLA-C
KIR2DL3	HLA-C
KIR3DL1	HLA-B
KIR3DL2	HLA-A
KIR3DL4	HLA-G
KIR2DS1	HLA-C
KIR2DS4	HLA-C

Os CTLRs estão situados no cromossomo 12p.12.3-p13.1 e dividem uma subunidade comum (CD94) ligada a uma segunda subunidade de um dos membros do grupo NKG2 (A, B, C ou E). Estes também podem ser encontrados expressos nos linfócitos T citotóxicos ¹⁰³. Destes, apenas o heterodímero CD94/NKG2A é inibitório e possui um par de tirosinas promotoras de inibição no citoplasma ⁹⁴. NKG2D é um quinto transcrito que exhibe uma baixa semelhança com os outros membros NKG2 e não formam par com o CD94. Os ligantes para o receptor NKG2D são as moléculas relacionadas ao MHC classe I MICA e MICB, cuja expressão está sob controle de elementos promotores similares a células sob estresse, como por exemplo o choque térmico, e estão supra reguladas no cenário de infecção por citomegalovírus, assim como em uma diversidade de neoplasias epiteliais e hematológicas. Em contrapartida são minimamente expressas em células de tecidos normais. Em alguns casos este é o único receptor gatilho responsável por ativar a lise de células tumorais ^{94,104}.

2.4.5 Papel das células NK frente a doenças

O envolvimento das células NK frente a diversas condições patológicas já é reconhecido. Uma das funções primordiais das células NK é a vigilância imunológica que se dá através do reconhecimento de células neoplásicas como alvo. *In vivo* já se comprovou que a atividade das células NK pode controlar a propagação metastática, bem como o crescimento tumoral. Estudo publicado em 2000 evidencia que a baixa atividade citotóxica periférica está correlacionada com aumento no risco de desenvolvimento de câncer em adultos ²⁰. Além disso, algumas citocinas como as interleucinas 12 e 18 (IL-12 e IL-18), ativadas durante a fase final da diferenciação de células NK aumentam a citotoxicidade contra células tumorais, assim como a produção de IFN- γ que também agirá diretamente em alvos neoplásicos ¹⁸.

As células NK fornecem proteção imunológica contra diversos tipos de infecções virais. Já está bem documentado o papel destas células frente a infecções por flavivírus, tais quais dengue, febre amarela e febre do Nilo ocidental. Também há documentação quanto a infecções por hepatites virais,

HIV, influenza e vírus sincicial respiratório ²¹⁻²³. Geralmente, a resposta específica das células NK decorrente das infecções virais depende de outras células. Há interação com neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para que ocorra regulação do meio de citocinas e respostas dos linfócitos T *helper*. Além disso, as células NK limitam diretamente o efeito dos linfócitos T CD4+ nos linfócitos T CD8+ ¹⁰⁵.

Há evidências que comprovam a ligação entre as células NK e a patogênese e regulação de doenças autoimunes. As células NK são capazes de destruir células autorreativas ou desempenham um papel indireto pela regulação da resposta imune adaptativa. Elas podem interferir com as APCs no gatilho da resposta autoimune induzindo a proliferação de linfócitos T e B autorreativos. Além disso, também podem prevenir respostas autoimunes através da inibição da apresentação de antígenos próprios pelas células dendríticas ¹⁰⁶. Estudos em diversos órgãos acometidos por doenças autoimunes já identificaram grande quantidade de células NK mostrando que estas são recrutadas como primeira linha de defesa às reações autoimunes ¹⁰⁷. Polimorfismos no receptor das células NK também estão implicados no desenvolvimento e progressão deste grupo de patologias ¹⁰⁸. Algumas das doenças autoimunes cujo papel das células NK já é conhecido são: diabetes mellitus tipo 1, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doenças tireoidianas, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico ^{18,107}.

Evidências também apontam para a capacidade das células NK em suprimir potenciais alergênicos e deste modo atuam no controle de doenças alérgicas. *In vitro*, as células NK são capazes de polarizar-se em dois subconjuntos com distinta funcionalidade, NK1 e NK2, análogas aos subgrupos de linfócitos T, Th1 e Th2. Além disso, algumas células NK regulatórias secretam interleucina 10 e são capazes de suprimir a produção de IgE ¹⁰⁹. Outro mecanismo ocorre na asma, situação em que as células NK contribuem para a melhora da resposta alérgica das vias aéreas. Neste grupo de pacientes há aumento da atividade das células NK no sangue periférico, sugerindo que há migração destas para os pulmões durante o processo inflamatório ^{18,110}.

2.4.6 Relação entre células NK e LMC e terapia com TKI

O papel das células NK frente à LMC passou a apresentar relevância clínica desde quando se descreveu o efeito GVL em pacientes com esta patologia que haviam sido submetidos ao TCTH ¹⁶. Entretanto, o modo de ação das células NK na LMC ainda não está completamente elucidado ²⁷. Assim como para outras neoplasias, as células NK possuem marcada atividade citotóxica contra diferentes tipos de leucemia, atuando na linha de frente de combate contra as células tumorais ²⁴. Mas na LMC o número de células NK parece diminuir com a progressão da doença da fase crônica para a crise blástica, assim como apresentam reduzida citotoxicidade ¹¹¹. Na LMC, a translocação do gene BCR-ABL afeta células dendríticas, permitindo que estas ativem células NK aumentando a sua expressão de ligantes NKG2D, além disso também controla diretamente a expressão de NKG2DL, sendo que a molécula MICA é a mais expressa ¹¹². A exposição crônica do NKG2D leva a molécula MICA a secretar uma proteína solúvel chamada sMICA. Elevados níveis circulantes de sMICA refletem expansão tumoral e induzem uma modulação negativa do NKG2D que persiste na superfície das células tumorais facilitando que estas escapem da lise mediada pelas células NK ²⁷.

A terapia alvo para LMC através dos TKIs também possui efeitos sobre as células NK. O imatinibe parece ser capaz de diminuir os níveis de sMICA, além da expressão de NKG2D nos linfócitos T. Ambas alterações são capazes de estimular a lise celular mediada pelas células NK ²⁵. Além disso, o imatinibe age sobre as células dendríticas promovendo ativação das células NK. Estudo realizado com pacientes portadores de tumores estromais gastrointestinais, cujo tratamento também é realizado com imatinibe evidencia que há um incremento na produção de IFN- γ pelas células NK, fato que correlaciona-se com aumento na resposta antitumoral ¹¹³.

Pacientes em uso de TKIs de segunda geração também parecem se beneficiar do efeito destas drogas sobre a atividade das células NK. Estudo *in vitro* realizado com dasatinibe adicionado a meios de cultura celular demonstra que ocorre aumento no número absoluto de células NK, especialmente no

cenário da linfocitose induzida pela medicação, além de maior efeito citotóxico destas células ²⁶. O desenvolvimento de linfocitose durante o tratamento com dasatinibe está associado a maiores taxas de sobrevida ¹¹⁴. Por outro lado, o impacto exercido pelo nilotinibe sobre a citotoxicidade das células NK é menor, já que induz a morte celular das células NK CD56^{bright} acarretando menor produção de citocinas ²⁷.

2.4.7 Aplicações terapêuticas das células NK

A partir do conhecimento adquirido sobre a ação das células NK frente a eliminação de células alvo, aplicação terapêutica, especialmente no cenário das neoplasias, vem sendo estudada e desenvolvida. Em 1983 ficou comprovada a capacidade das células NK alogênicas em eliminar células linfo ou mieloblásticas de leucemias agudas ¹¹⁵. Mais recentemente, foi demonstrado que células NK autólogas ativadas também possuem habilidade em eliminar blastos ^{116,117}.

A idealização da infusão de células NK em pacientes advém da observação de que pacientes submetidos ao TCTH alogênico que recebiam maiores doses destas células apresentavam menores taxas de mortalidade relacionada a recidivas bem como menor incidência de infecções após transplante ¹¹⁸. Além disso, estudo em modelo animal mostra que a infusão de células NK ativadas do doador após TCTH resulta em melhor efeito GVL e por outro lado reduz significativamente a chance de desenvolvimento de DECH ¹¹⁹. Há evidências de metodologias que visam a expansão de células NK *in vivo* através da administração de IL-2 exógena em pacientes com diferentes tipos de neoplasias ¹²⁰.

No contexto da LMC os dados publicados até o momento são de experimentos *in vitro* ^{28,121}. Em um estudo, as células NK foram coletadas a partir de uma amostra de medula óssea de pacientes portadores de LMC, em diversos estágios da doença, e ativadas através da IL-2 em meios de cultura. Os resultados evidenciaram que as células NK proliferaram melhor nas culturas com células Ph positivas e em metade destas não mais se detectavam a presença do

oncogene BCR-ABL após 14 dias ²⁸. Outro estudo, demonstrou supressão do número de células formadoras de colônia em 80% das culturas positivas para o oncogene BCR-ABL. Em contrapartida, não houve supressão da hematopoese em culturas de células normais ¹²¹.

Um dos principais limitadores quanto ao uso da terapia com células NK na prática clínica é a dificuldade técnica na obtenção de um número clinicamente suficiente destas células, além de pureza na amostra no que diz respeito à presença associada de linfócitos T. O uso de IL-2 em amostras de medula óssea resultou em expansão inadequada das células NK em metade da amostra de pacientes portadores de LMC ²⁸. Em outro estudo realizado com pacientes diagnosticados com neoplasias de trato gastrointestinal avançadas, as células NK foram expandidas *ex vivo* através da estimulação de células mononucleares de sangue periférico com OK432 e IL-2. Na amostra, cerca de 15% das culturas não apresentaram expansão ou pureza adequada ¹²². Células NK autólogas também podem ser ativadas e potencializadas através da administração de citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18, mas em nenhum destes métodos conseguiu-se proliferação sustentada ¹²³.

3. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que as células NK podem ter efeitos contra células tumorais, através de mecanismos que resultam na lise de células suscetíveis. De posse deste conhecimento o uso terapêutico de células NK como imunoterapia para o câncer foi proposto e vem sendo testado em diversos contextos clínicos. No que diz respeito ao emprego desta modalidade terapêutica para o tratamento de neoplasias hematológicas existem evidências que mostram que pacientes com Leucemia mieloide aguda (LMA) refratária beneficiam-se da infusão haploidêntica ou estimulação de células NK atingindo assim remissão e permitindo que o paciente seja elegível ao TCTH alogênico. Além disso, sabe-se que o protótipo-alvo NK suscetível é a linhagem celular de leucemia K562.

O uso de células NK expandidas através de coleta autóloga já foi testado e mostrou-se seguro em diversos contextos clínicos.

Por outro lado, o único tratamento proposto capaz de curar pacientes com LMC em fase crônica que perdem resposta aos TKI ou em fase acelerada é o TCTH alogênico, procedimento com altos níveis de morbimortalidade.

Sendo assim, uso terapêutico de células NK autólogas como ponte para a realização do TCTH alogênico, objetivando diminuir a carga tumoral do paciente é uma terapia extremamente promissora. Através dela é possível que se consiga a diminuição de complicações inerentes ao TCTH alogênico, assim como posterior melhora da sobrevida deste subgrupo de pacientes.

Entretanto, antes de iniciar-se um tratamento que promete ser revolucionário no contexto de pacientes com LMC refratária ou em progressão é imperativo que se conheça a população que será estudada, assim como se tenha garantias de que a metodologia empregada em laboratório seja eficaz frente aos tratamentos realizados previamente por todos os pacientes, bem como à própria doença.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos primários

Testar a eficácia do método de obtenção de células NK a partir sangue periférico de pacientes com LMC, em uso de TKI, após terceira linha de tratamento.

4.2 Objetivos secundários

- Traçar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de LMC, que acompanham no ambulatório do serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e que não responderam ou perderam resposta a duas linhas de TKI.
- Determinar a sobrevida de pacientes portadores de LMC refratários ao imatinibe ou que tenham realizado três ou mais linhas de tratamento.
- Determinar as características das células NK em culturas, de portadores de LMC quanto à capacidade proliferativa e possibilidade de produção celular para uso clínico
- Determinar as características das células NK em culturas, de portadores de LMC quanto à capacidade citotóxica
- Determinar as características das células NK em culturas, de portadores de LMC quanto à pureza com relação à contaminação por linfócitos T.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kantarjian H, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*. 1993; 82(3).
2. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985; 315 (6020): 550–4.
3. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973; 243 (5405): 290–3.
4. Vardiman JW. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(2): 250–60.
5. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348(11): 994–1004.
6. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood*. 2009; 114 (1126).
7. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Charles L. Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor. *Science* (80-). 2004; 305(5682): 399–401.
8. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004; 47(27): 6658–61.
9. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB,

- Undurraga MS, et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia : 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012; 119(5): 1123–9.
10. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, Souza C De, Flinn IW, Stenke L, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol*. 2011; 12(9): 841–51.
 11. Mauro MJ, Deininger MW. Management of drug toxicities in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009; 22(3): 409–29.
 12. Aranha FJP. Leucemia Mielóide Crônica – Transplante de medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(Supl. 1): 41–6.
 13. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013; 122(6): 872–84.
 14. Barrett AJ. Mechanisms of the Graft-versus-Leukemia Reaction. *Stem Cells*. 1997; 15(4): 248–58.
 15. Kourilsky P, Claverie J-M. MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv Immunol*. 1989; 45: 107–93.
 16. Kolb HJ, Mittermüller J, Holler E, Thalmeyer K, Bartram CR. Graft-versus-host reaction spares normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1996; 17(3): 449–52.
 17. Glas BR, Franksson L, Une C, Eloranta M, Öhlén C, Örn A, et al. Recruitment and Activation of Natural Killer (NK) Cells In Vivo Determined by the Target Cell Phenotype: An Adaptive Component of NK Cell-mediated Responses. *J Exp Med*. 2000; 191(1): 129–38.
 18. Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015; 8(2): 47–55.
 19. Kärre K. Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells.

- Science (80-). 1995; 267: 978–9.
20. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000; 356(9244): 1795–9.
 21. Wu S, Wang W, Gao Y. Natural killer cells in hepatitis B virus infection. *Brazilian J Infect Dis*. 2015; 19(4): 417–25.
 22. Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, et al. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med*. 2007; 204(12): 3027–36.
 23. Guo H, Kumar P, Moran TM, Garcia-Sastre A, Zhou Y, Malarkannan S. The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2009; 87(8): 579–89.
 24. Almeida-Oliveira A, Diamond HR. Atividade Antileucêmica das Células Natural Killer (NK) Antileukemic Activity of Natural Killer (NK) Cells. *Rev Bras Cancerol*. 2008; 54(3): 297–305.
 25. Boissel N, Rea D, Tieng V, Dulphy N, Brun M, Cayuela J-M, et al. BCR/ABL Oncogene Directly Controls MHC Class I Chain-Related Molecule A Expression in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Immunol*. 2006; 176(8): 5108–16.
 26. Uchiyama T, Sato N, Narita M, Yamahira A, Iwabuchi M, Furukawa T, et al. Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells in in vitro study. *Hematol Oncol*. 2013; 31: 156–63.
 27. Danier ACA, Melo RP De, Napimoga MH, Laguna-Abreu MTC. The role of natural killer cells in chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011; 33(3): 216–20.
 28. Silla LM, Pincus SM, Locker JD, Glover J, Elder EM, Donnenberg a D, et al. Generation of activated natural killer (A-NK) cells in patients with chronic myelogenous leukaemia and their role in the in vitro disappearance of BCR/abl-positive targets. *Br J Haematol*. 1996; 93(2):

- 375–85.
29. Corm S, Roche L, Micol JB, Coiteux V, Bossard N, Nicolini FE, et al. Changes in the dynamics of the excess mortality rate in chronic phase-chronic myeloid leukemia over 1990-2007: A population study. *Blood*. 2011; 118(16): 4331–7.
 30. Tefferi A, Dewald GW, Litzow ML, Cortes J, Mauro MJ, Talpaz M, et al. Chronic Myeloid Leukemia: Current Application of Cytogenetics and Molecular Testing for Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005; 80(3): 390–402.
 31. Gordon MY, Marley SB, Apperley JF, Marin D, Kaeda J, Szydlo R, et al. Clinical heterogeneity in chronic myeloid leukaemia reflecting biological diversity in normal persons. *Br J Haematol*. 2003; 122(3): 424–9.
 32. Sawyers CL. Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 340(17): 1330–40.
 33. Chen Y, Peng C, Li D, Li S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2010; 1(2): 124–32.
 34. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391–406.
 35. Bakhshi A, Minowada J, Arnold A, Cossman J, Jensen JP, Whang-Peng J, et al. Lymphoid Blast Crises of Chronic Myelogenous Leukemia Represent Stages in the Development of B-Cell Precursors. *N Engl J Med*. 1983; 309(14): 826–31.
 36. Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*. 1987; 83(3): 445–54.
 37. Specchia G, Palumbo G, Pastore D, Mininni D, Mestice A, Liso V. Extramedullary blast crisis in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 1996;

- 20(11–12): 905–8.
38. O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*. 2002; 100(5): 1628–33.
 39. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, McCredie KB, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1988; 61: 1441–6.
 40. Chase A, Huntly BJ, Cross NC. Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14(3): 553–71.
 41. Melo J. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996; 88(7): 2375–84.
 42. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol*. 2002; 107: 76–94.
 43. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Muller M C, Hanfstein B, Haferlach C, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011; 118(26): 6760–9.
 44. Francis J, Dubashi B, Sundaram R, Pradhan SC, Chandrasekaran A. Influence of Sokal, Hasford, EUTOS scores and pharmacogenetic factors on the complete cytogenetic response at 1-year in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Med Oncol*. 2015; 32(8): 1–6.
 45. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984; 63(4): 789–99.
 46. Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluijn-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(11): 850–8.

47. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. 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.
48. Höglund M, Sandin F, Hellström K, Björemann M, Björkholm M, Brune M, et al. Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: Report from the population-based Swedish CML registry. *Blood*. 2013; 122(7): 1284–92.
49. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda J, Foroni L, et al. Prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of. *Blood*. 2010; 116(19): 3758–65.
50. Branford S, Kim DW, Soverini S, Haque A, Shou Y, Woodman RC, et al. Initial molecular response at 3 months may predict both response and event-free survival at 24 months in imatinib-resistant or -intolerant patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with nilotinib. *J Clin Oncol*. 2012; 30(35): 4323–9.
51. Kaeda J, Chase A, Goldman JM. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol*. 2002; 107(2): 64–75.
52. 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.
53. Falchi L, Kantarjian HM, Wang X, Verma D, Quintás-Cardama A, O'Brien S, et al. Significance of deeper molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol*. 2013; 88(12): 1024–9.
54. Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, Guilhot F, Schiffer CA, Cortes J, et al. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response , survival , and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic

- myeloid leukemia after failure of interferon- γ treatment. *Blood*. 2017; 111(3): 1039–44.
55. Kantarjian H, Talpaz M, Brien SO, Garcia-manero G, Verstovsek S, Giles F, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome – positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 103(8): 2873–8.
 56. Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *SeminHematol*. 2003;40 (2 Suppl 3): 69–79.
 57. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007; 8(11): 1018–29.
 58. Gruber FX, Ernst T, Porkka K, Engh R a, Mikkola I, Maier J, et al. Dynamics of the emergence of dasatinib and nilotinib resistance in imatinib-resistant CML patients. *Leukemia*. 2012; 26(1): 172–7.
 59. Parker WT, Ho M, Scott HS, Hughes TP, Branford S, Dc W. Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients with multiple low-level mutations, irrespective of their resistance profile Brief report Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patien. *Blood*. 2013; 119(10): 2234–8.
 60. Goldman JM. How I treat How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood*. 2007; 110(8): 2828–37.
 61. Goldman JM, Marin D, Olavarria E, Apperley JF. Clinical decisions for chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Semin Hematol*. 2003; 40(2 Suppl 2): 13–98.
 62. Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, Appelbaum FR, Anderson J, Bennett C, et al. 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.
 63. Gale RP, Hehlmann R, Zhang MJ, Hasford J, Goldman JM, Heimpel H, et

- al. Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1998; 91(5): 1810–9.
64. Thomas ED, Clift RA, Fefer A. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*. 1986; 104(2):155–62.
65. Thomas E, Clift R. Indications for marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1989; 73(4): 861–4.
66. Goldman JM, Szydlo R, Horowitz MM, Gale RP, Ash RC, Atkinson K, et al. Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood*. 1993; 82(7): 2235–8.
67. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005; 105(7): 2640–53.
68. Cortes JE, Kim D-W, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Dyagil I, Giskevicius L, et al. Bosutinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results from the BELA Trial. *J Clin Oncol*. 2012; 28(30): 3486–92.
69. Brümmendorf TH, Cortes JE, de Souza CA, Guilhot F, Duvillié L, Pavlov D, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: Results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br J Haematol*. 2015; 168(1): 69–81.
70. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2006; 355(23): 2408–17.
71. Marin D, Bazeos A, Mahon FX, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *J Clin Oncol*. 2010; 28(14): 2381–8.
72. Santos FPS, Ravandi F. Advances in treatment of chronic myelogenous

- leukemia--new treatment options with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50 (Suppl 2): 16–26.
73. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. *N Engl J Med*. 2013; 369(19): 1783–96.
74. Ohanian M, Kantarjian HM, Quintas-Cardama A, Jabbour E, Abruzzo L, Verstovsek S, et al. Tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for patients with chronic myeloid Leukemia in accelerated phase. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2014; 14(2): 155–162.
75. Silver RT. The blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009; 22(3): 387–94.
76. Saglio G, Hochhaus A, Goh YT, Masszi T, Pasquini R, Maloisel F, et al. Dasatinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant chronic myeloid leukemia in blast phase after 2 years of follow-up in a phase 3 study: Efficacy and tolerability of 140 milligrams once daily and 70 milligrams twice daily. *Cancer*. 2010; 116(16): 3852–61.
77. Strati P, Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Konoplev S, Jorgensen JL, et al. HCVAD plus imatinib or dasatinib in lymphoid blastic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2014; 120(3): 373–80.
78. Fefer A, Cheever MA, Greenberg PD, Appelbaum FR, Boyd CN, Buckner D, et al. Treatment of chronic granulocytic leukemia with chemoradiotherapy and transplantation of marrow from identical twins. *N Engl J Med*. 1982; 306(2): 63–8.
79. Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, et al. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med*. 1994; 120(8): 646–52.
80. Silla LMR, Whiteside TL, Ball ED. The role of natural killer cells in the treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *J Hematother*. 1995; 4: 269–79.
81. Perreault C, Decary F, Brochu S, Gyger M, Belanger R, Roy D. Minor

- histocompatibility antigens. *Blood*. 1990; 76(7): 1269–80.
82. Sayegh H, Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(4): 1143–50.
 83. Teshima T, Ferrara JLM. Understanding the alloresponse: New approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol*. 2002; 39(1): 15–22.
 84. Gumperz JE, Parham P. The enigma of the natural killer cell. *Nature*. 1995; 378(6554): 245–8.
 85. Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, et al. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med*. 1993; 178(2): 597–604.
 86. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009; 373(9674): 1550–61.
 87. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringdén O, Antin JH, Cahn J-Y, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*. 2002; 100(2): 406–14.
 88. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005; 11(12): 945–56.
 89. Sullivan KM, Storb R, Buckner D, Fefer A, Fisher LI, Weiden PL, et al. Graft-versus-host disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasms. *N Engl J Med*. 1989; 320(13): 828–34.
 90. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001; 22(11): 633–40.

91. Walch M, Dotiwala F, Mulik S, Thiery J, Kirchhausen T, Clayberger C, et al. Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell*. 2014; 157(6): 1309–23.
92. Suzuki N, Suzuki T, Engleman EG. Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen- specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1991; 173: 1451–61.
93. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990; 76(12): 2421–38.
94. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002; 100(6): 1935–47.
95. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989; 143(10): 3183–91.
96. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*. 2005; 22(3): 295–304.
97. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting CN, Walunas TL, Lanier LL, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*. 1998; 9(4): 555–63.
98. Denman CJ, Senyukov V V., Somanchi SS, Phatarpekar P V., Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012; 7(1).
99. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse Functions of Il-2, Il-15, and Il-7 in Lymphoid Homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24(1): 657–79.
100. Long EO, Sik Kim H, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31(1): 227–58.

101. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986; 319(6055): 675–8.
102. Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): From biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24(2): 239–45.
103. Sobanov Y, Glienke J, Brostjan C, Lehrach H, Francis F, Hofer E. Linkage of the NKG2 and CD94 receptor genes to D12S77 in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*. 1999; 49: 99–105.
104. Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, et al. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: Cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*. 2001; 31(4): 1076–86.
105. Lam VC, Lanier LL. NK cells in host responses to viral infections. *Curr Opin Immunol*. 2017;44:43–51.
106. Morse RHA, Séguin R, McCrea EL, Antel JP. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *J Neuroimmunol*. 2001; 116(1): 107–15.
107. Popko K, Górska E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. *Cent Eur J Immunol*. 2015; 4(4): 470–6.
108. Jie H-B, Sarvetnick N. The role of NK cells and NK cell receptors in autoimmune disease. *Autoimmunity*. 2004; 37(2): 147–53.
109. Deniz G, Van De Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 132(3): 527–35.
110. Jira M, Antosova E, Vondra V, Strejcek J, Mazakova H, Prazakova J. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics: I. Effect of acute antigen-specific challenge. *Allergy*. 1988; 43(4): 294–8.
111. Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lenvik T, Soignier Y, Miller JS.

- BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood*. 2007; 101(9): 3527–33.
112. Terme M, Borg C, Guilhot F, Terme M, Borg C, Masurier C, et al. BCR/ABL Promotes Dendritic Cell – Mediated Natural Killer Cell Activation. *Cancer Res*. 2005; 65(14): 6409–17.
113. Borg C, Terme M, Taïeb J, Ménard C, Flament C, Robert C, et al. Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell – dependent antitumor effects. *J Clin Invest*. 2004; 114(3): 379–88.
114. Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, et al. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009; 23(8): 1398–405.
115. Oshimi K, Oshimi Y, Motoji T, Kobayashi S, Mizoguchi H. Lysis of leukemia and lymphoma cells by autologous and allogeneic interferon-activated blood mononuclear cells. *Blood*. 1983; 61(4): 790–8.
116. Torelli GF, Guarini A, Palmieri G, Breccia M, Vitale A, Santoni A, et al. Expansion of cytotoxic effectors with lytic activity against autologous blasts from acute myeloid leukaemia patients in complete haematological remission. *Br J Haematol*. 2002; 116(2): 299–307.
117. Torelli GF, Guarini A, Maggio R, Alfieri C, Vitale A, Foà R. Expansion of natural killer cells with lytic activity against autologous blasts from adult and pediatric acute lymphoid leukemia patients in complete hematologic remission. *Haematologica*. 2005; 90(6): 785–92.
118. Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Won DIL, et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol*. 2005; 75(4): 299–308.
119. Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone

- marrow transplantation. *J Clin Invest.* 1998; 101(9): 1835–42.
120. Farag SS, George SL, Lee EJ, Baer M, Dodge RK, Becknell B, et al. Postremission therapy with low-dose interleukin 2 with or without intermediate pulse dose interleukin 2 therapy is well tolerated in elderly patients with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 9420. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(9): 2812–9.
 121. Cervantes F, Pierson B a, McGlave PB, Verfaillie CM, Miller JS. Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture. *Blood.* 1996; 87(6): 2476–85.
 122. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, et al. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med.* 2015; 13(1): 277.
 123. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2016; 65(4): 477–84.

