



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

David Wendell Isacksson Damasceno

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA ANTES E APÓS O INÍCIO DO
TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE**

Belém – PA
2019

David Wendell Isacksson Damasceno

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA ANTES E APÓS O INÍCIO DO
TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro.

Belém – PA
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

D155a Damasceno, David Wendell Isacksson
Avaliação funcional de neutrófilos circulantes em
portadores de leucemia mielóide crônica antes e após o
início do tratamento com mesilato de imatinibe / David
Wendell Isacksson Damasceno. — 2019.
76 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Carolina Heitmann Mares
Azevedo Ribeiro
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Leucemia mielóide crônica. 2. Mesilato de
imatinibe. 3. Neutrófilo. 4. Fagocitose. I. Título.

CDD 616.99419

FOLHA DE APROVAÇÃO

David Wendell Isacksson Damasceno

Avaliação funcional de neutrófilos circulantes em portadores de leucemia mielóide crônica antes e após o início do tratamento com mesilato de imatinibe.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em:

Banca Examinadora

___ Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro (Orientadora)
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

___ Prof^a. Dr^a. Maria Fani Dolabela
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

___ Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior
Instituição: Programa de Pós-Graduação profissional em Análises Clínicas/UFPA

Belém – PA
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Valéria e Denys que são os bens mais preciosos que Deus me deu, pela grande dedicação, sustento, apoio nas horas mais difíceis e amor incondicional. Graças a eles eu sempre tive exemplo, força e incentivo para partir em busca de meu crescimento pessoal e profissional.

Ofereço também a todos os portadores de leucemia mielóide crônica, esperando que todas as informações aqui relatadas venham de alguma maneira contribuir para que tenham uma qualidade de vida melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, iluminar, ser meu porto seguro e me conceder saúde e forças para realizar tantos sonhos e seguir sempre em frente.

Aos meus pais responsáveis pela minha felicidade.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e carinho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann pela oportunidade, incentivo, paciência, troca de conhecimentos e investimento para meu crescimento científico e profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Pará Raquel, Ariane, Érica, Renaira, Gabriela, Cleidiane, Larissa e Brendo pela valiosa ajuda e bons momentos compartilhados, sempre com alegria e otimismo, em várias etapas desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus professores pela oportunidade de expandir meus horizontes e concretizar a minha pós-graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos colegas do serviço de hematologia do Hospital Ophir Loyola de Belém-PA, representados pelo chefe Dr. Thiago Xavier Carneiro, pelo acolhimento, cooperação e pela possibilidade de realização do trabalho em conjunto.

Aos pacientes que se dispuseram a participar deste estudo, sempre esperançosos. Obrigado pela confiança. Vocês me motivam a continuar.

EPÍGRAFE

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho. ”

Abraham Lincoln

RESUMO

DAMASCENO, D.W.I. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM PORTADORES DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA ANTES E APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO COM MESILATO DE IMATINIBE. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

Objetivo: Avaliar a função dos neutrófilos em portadores de leucemia mielóide crônica (LMC) antes e após o início do tratamento com mesilato de imatinibe (MI). **Material e Métodos:** Participaram da pesquisa 13 pacientes diagnosticados com LMC (casos novos), com idade média de 51 anos, de ambos os sexos, selecionados no ambulatório de hematologia do Hospital Ophir Loyola, Belém-PA. Realizou-se nesse grupo três coletas sanguíneas. A primeira coleta no momento do diagnóstico com o paciente sem tratamento (Grupo B1), a segunda coleta após um mês do tratamento com MI (Grupo B2) e a terceira coleta após quatro meses de tratamento (Grupo B3). O grupo controle (Grupo A) constituiu de 13 voluntários sadios de ambos os sexos. Além do hemograma e leucograma, realizou-se também os ensaios de fagocitose e o teste citoquímico de redução espontânea do tetrazólio nitroazul (NBT) para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. **Resultados:** A avaliação da função fagocítica indicou diferença estatística quando comparado o Grupo A com os Grupos B1, B2 e B3, $p=0,0001$. Os grupos B1, B2 e B3 apresentaram menores índices fagocíticos (IFs) com $2,07\pm 0,5$; $1,99\pm 0,4$ e $1,97\pm 0,6$ respectivamente, em relação ao Grupo A com $3,72\pm 0,8$. Na avaliação do metabolismo oxidativo não houve diferença estatística entre o grupo A com os grupos B1, B2 e B3, $p=0,2997$. **Discussão:** Os resultados demonstraram que os pacientes sem tratamento apresentaram menor IF em relação ao grupo controle. Isso significa que mesmo o paciente possuindo inúmeras células do processo proliferativo, estas células estão com as suas funções diminuídas. Os pacientes tratados com MI também apresentaram menor IF em relação ao grupo controle. Ainda que o número de leucócitos e neutrófilos tenha reduzido nestes pacientes, a capacidade fagocítica destas células manteve-se diminuída. Não houve diferença estatística quanto à ativação do metabolismo oxidativo na prova de redução do NBT. Isso significa que a produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase não apresenta alteração independente do tratamento com MI. **Conclusão:** Houve redução da quantidade de neutrófilos circulantes após o início do tratamento com MI. A função fagocítica dos neutrófilos manteve-se diminuída após o início do tratamento com MI. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos não apresenta alteração independente do tratamento com MI. Logo, estudos adicionais são importantes para avaliar o exato mecanismo de alteração de função envolvidos nesses pacientes para permitir um melhor direcionamento em relação à terapia utilizada.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica, Mesilato de Imatinibe, Neutrófilo, Fagocitose.

ABSTRACT

DAMASCENO, D.W.I. FUNCTIONAL EVALUATION OF CIRCULATING NEUTROPHILS IN CARRIERS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA BEFORE AND AFTER THE START OF TREATMENT WITH IMATINIB MESYLATE. DISSERTATION (Master degree), Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2019.

Objective: To evaluate neutrophil function in patients with chronic myeloid leukemia (CML) before and after initiation of treatment with imatinib mesylate (IM). **Material and Methods:** The study included 13 patients diagnosed with CML (new cases), with a mean age of 51 years, of both sexes, selected at the hematology outpatient clinic of the Ophir Loyola Hospital, Belém-PA. In this group three blood samples were taken. The first collection at the time of diagnosis with the untreated patient (Group B1), the second collection after one month of IM treatment (Group B2) and the third collection after four months of treatment (Group B3). The control group (Group A) consisted of 13 healthy volunteers of both sexes. In addition to the blood count and leukogram, the phagocytosis assays and the cytochemical test for spontaneous reduction of nitroazul tetrazolium (NBT) were also performed to evaluate the neutrophil oxidative metabolism. **Results:** The evaluation of phagocytic function indicated statistical difference when compared Group A with Groups B1, B2 and B3, $p = 0.0001$. Groups B1, B2 and B3 presented lower phagocytic indices (IFs) with 2.07 ± 0.5 ; 1.99 ± 0.4 and 1.97 ± 0.6 respectively, compared to Group A with 3.72 ± 0.8 . In the oxidative metabolism evaluation there was no statistical difference between group A with groups B1, B2 and B3, $p = 0.2997$. **Discussion:** The results showed that untreated patients had lower IF compared to the control group. This means that even if the patient has innumerable cells of the proliferative process, these cells have their functions diminished. Patients treated with IM also had lower IF compared to the control group. Although the number of leukocytes and neutrophils decreased in these patients, the phagocytic capacity of these cells remained decreased. There was no statistical difference regarding the activation of oxidative metabolism in the NBT reduction test. This means that the production of ROS by the NADPH oxidase system does not change independently of IM treatment. **Conclusion:** There was a reduction in the amount of circulating neutrophils after initiation of IM treatment. The phagocytic function of neutrophils remained decreased after initiation of IM treatment. Neutrophil oxidative metabolism does not change independently of IM treatment. Therefore, additional studies are important to evaluate the exact mechanism of function alteration involved in these patients to allow a better orientation regarding the therapy used.

Key words: Chronic Myeloid Leukemia, Mesylate Imatinib, Neutrophils, Phagocytosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Formação do Cromossomo Filadélfia (Ph).

Figura 2: Domínios funcionais do produto do gene ABL.

Figura 3: Domínios funcionais do produto do gene BCR.

Figura 4: Principais atividades do híbrido *BCR-ABL* na célula.

Figura 5: Hematopoiese na Fase Crónica da LMC.

Figura 6: Cascata de recrutamento de neutrófilos.

Figura 7: Mecanismos de morte celular por neutrófilos.

Figura 8: Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe.

Figura 9: Obtenção de leucócitos do sangue periférico.

Figura 10: Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan (B).

Figura 11: Delineamento experimental.

Figura 12: Relação neutrófilo-linfócito (RNL) em pacientes com LMC Ph¹ positiva na primeira coleta (Grupo B1), na segunda coleta (Grupo B2) e na terceira coleta (Grupo B3).

Figura 13: Presença ou não de neutrofilia em pacientes com LMC Ph¹ positiva na primeira coleta (Grupo B1), na segunda coleta (Grupo B2) e na terceira coleta (Grupo B3).

Figura 14: Capacidade fagocítica *in vitro* do grupo controle (Grupo A) e dos pacientes em estudo na primeira coleta (Grupo B1), na segunda coleta (Grupo B2) e na terceira coleta (Grupo B3).

Figura 15: Percentual de neutrófilos NBT positivos do grupo controle (Grupo A) e dos pacientes em estudo na primeira coleta (Grupo B1), na segunda coleta (Grupo B2) e na terceira coleta (Grupo B3).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados referentes a gênero, idade e etnia do grupo controle e dos pacientes em estudo.

Tabela 2: Dados clínico-hematológicos do grupo controle e dos pacientes em estudo na primeira, segunda e terceira coleta.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Perfil do hemograma nas diferentes fases da LMC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	Leucemia Murina de Abelson
ATP	<i>Trisfosfato de adenosina</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
CD62L	L-selectina
CD11a	Subunidade α da integrina LFA-1
CD11b	Subunidade α da integrina Mac-1
c-kit/CD 117	Receptor de células primordiais
ER	Explosão respiratória
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>
G-CFS	Fatores de estímulos de granulócitos
G-CSF-R	Receptor fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CFS	Fator estimulador de colônias granulócito-macrófago
HU	Hidroxiuréia
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IF	Índice Fagocítico
IFN-alfa	alfa-Interferon
IL-1	Interleucina-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LFA-1	Antígeno 1 associado a função linfocitária
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
Mac-1	Antígeno de macrófago 1
MI	Mesilato de Imatinib
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Receptor do fator de crescimento plaquetário
Ph	<i>Philadelphia</i>
PMNs	Polimorfonucleadas

RNL	Relação neutrófilo/linfócito
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TK	Tirosina quinase
TMOalo	Transplante de Medula Óssea Alogênico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Leucemogênese	19
2.2 Leucemia	19
2.3 Leucemia mielóide crônica	20
2.3.1 O CROMOSSOMO PHILADELPHIA.....	22
2.3.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO DA TK DO BCR-ABL	25
2.3.3 EPIDEMIOLOGIA DA LMC	27
2.4 Diagnóstico.....	27
2.5 Neutrófilo	31
2.5.1 FAGOCITOSE.....	34
2.5.2 NADPH OXIDASE, BURST OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	35
2.6 Tratamento	36
2.6.1 MESILATO DE IMATINIBE	37
2.6.1.1 Mecanismo de ação	38
2.6.1.2 Farmacocinética.....	39
2.6.1.3 Perfil de toxicidade e Resistência ao Mesilato de Imatinibe	40
2.6.1.4 Resposta ao tratamento	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivo Específico	43
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
4.1 Local de realização do estudo	44
4.2 Seleção da amostra	44

4.2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO	44
4.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	45
4.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	45
4.3 Aspectos Éticos	46
4.4 Coleta de Dados	46
4.4.1 INFORMAÇÕES HEMATOLÓGICAS	46
4.5 Material	46
4.6 Métodos	47
4.6.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	47
4.6.2 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA	47
4.6.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES.....	48
4.6.3.1 Obtenção e Preparo dos Neutrófilos Circulantes	48
4.6.3.2 Avaliação da Capacidade Fagocítica	50
4.6.4 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO	51
4.7 Análise Estatística	52
5 RESULTADOS	53
5.1 Características gerais dos pacientes	53
5.2 Avaliação do Hemograma e Leucograma	53
5.3 Avaliação da Função Fagocítica.....	56
5.4 Avaliação do metabolismo oxidativo	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A	73
ANEXO B	75

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que existam 10.800 casos novos de leucemia no Brasil em 2018, sendo 5.940 homens e 4.860 mulheres (INCA, 2018). A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica responsável por 15% de todas as leucemias e ocorre com mesma frequência ao redor do mundo. Possui incidência anual de 1,6 casos por 100.000 habitantes. Acomete adultos de ambos os sexos, em faixa etária entre 40 e 60 anos e com predomínio masculino (CORTES, 2004).

A LMC caracteriza-se pela proliferação e acúmulo de células mielóides e expressão do cromossomo *Philadelphia* (Ph), resultado da translocação recíproca e equilibrada entre os genes BCR do cromossomo 22 e ABL do cromossomo 9. O gene híbrido BCR-ABL formado codifica proteínas tirosina-quinase com atividade aumentada capaz de alterar o ciclo celular normal viabilizando a leucemogênese (JOHANSSON et al., 2002; HOLLAND et al., 2003; SEUÁNEZ et al., 2004). Esse gene quimérico ativa a sinalização mitogênica, reduz a apoptose e adesão das células ao estroma (GOUVEIA, 2007). Observa-se ainda uma superprodução de células da linhagem granulocítica, principalmente neutrófilos e ocasionalmente monócitos, resultando em acentuada esplenomegalia e elevada leucometria (KEATING et al., 2005).

A progressão clínica da LMC é trifásica. A fase primária da doença é denominada de fase crônica e se caracteriza pelo aumento da proliferação clonal das células granulocíticas. Maior parte dos portadores de LMC é diagnóstica nessa fase e as manifestações clínicas podem ser controladas por quimioterapia oral. Os portadores podem apresentar sintomas como fadiga, fraqueza, cefaleia, irritabilidade, febre, suor noturno, perda de peso ou até mesmo serem assintomáticos (SUZANA et al., 2008; D'ANTONIO, 2005; BERGANTINI et al., 2005).

O diagnóstico é realizado considerando aspectos clínicos, citogenéticos e hematológicos. Os achados laboratoriais frequentes são leucocitose com desvio a esquerda, basofilia, eosinofilia, anemia discreta e diminuição da fosfatase alcalina intraleucocitária. O desenvolvimento da LMC para a fase intermediária chamada de

fase acelerada é representado pelo aumento de blastos na medula óssea e sangue periférico, leucocitose persistente, basofilia, anemia e trombocitopenia. Em clínica, o portador torna-se refratário a terapia utilizada na fase crônica e pode apresentar progressão da hepato-esplenomegalia. A evolução para fase final aguda ou crise blástica caracteriza-se pelo aumento dos blastos leucêmicos e muitos portadores evoluem a óbito em três a seis meses nesse estágio da doença. (SUZANA et al., 2008; BORTOLHEIRO, 2008).

As estratégias terapêuticas utilizadas na LMC estavam limitadas à quimioterapia convencional com a utilização da hidroxiureia (HU), alfa-Interferon (IFN-alfa) e ao transplante de medula óssea alogênico (TMOalo). No entanto, todas essas opções apresentam limitações quanto à eficácia e tolerabilidade (STONE, 2004). O único tratamento curativo é o TMOalo, mas seu sucesso depende de vários fatores como idade, estadiamento da doença e histocompatibilidade entre o doador e o receptor (BERGANTINI et al., 2005).

Atualmente, o mesilato de imatinib (MI) é o fármaco de primeira linha usado no tratamento da LMC, pois se demonstrou mais específico, efetivo e com melhor resposta em nível hematológico, citogenético e molecular que as demais opções terapêuticas (MOREIRA, BOECHAT, 2009). No entanto, outros medicamentos inibidores de tirosinoquinase, como o dasatinibe e o nilotinibe, são novas alternativas à falha terapêutica ou intolerância ao imatinibe.

Os neutrófilos também denominados leucócitos polimorfonucleares, são os mais numerosos dentre os granulócitos presentes no sangue periférico. Estas células respondem rapidamente aos estímulos quimiotáticos, realizando funções fagocitárias e são importantes na resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). Essas células contribuem para a manutenção da resposta imunológica contra infecções bacterianas, e outros patógenos, sendo muito importantes na defesa do organismo. Desse modo, tendo em vista que os neutrófilos são muito importantes na defesa do organismo, considerando a significância de suas funções, bem como a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, a identificação de possíveis alterações quantitativas e qualitativas dessas células sob os efeitos do MI em portadores de LMC representa um avanço na compreensão da estratégia terapêutica dessa doença. Pois, apesar do MI apresentar boa tolerância e

vantagens em termos de resposta hematológica, é de fundamental relevância avaliar os neutrófilos circulantes em portadores de LMC ao tratamento com MI a fim de que realmente essa medicação possa contemplar o sucesso terapêutico em sua abrangência e plenitude para melhor qualidade de vida e bem estar do paciente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a função de neutrófilos circulantes em portadores de LMC antes e após o início do tratamento com MI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemogênese

A leucemogênese é o processo que resulta do desenvolvimento de uma expansão clonal maligna oriunda de uma única célula progenitora sanguínea devido a alterações genéticas no precursor hematopoiético das células afetadas (GREAVES, 2002). Essas alterações genéticas provocam a formação de um clone leucêmico que apresenta como característica principal a perda da capacidade de diferenciação que junto com a sua exacerbada proliferação leva ao acúmulo na medula óssea e expressão no sangue periférico. De modo semelhante a outras neoplasias, tais alterações genéticas envolvem variados genes como o gene ABL (*Abelson Murine Leukemia*) e o gene BCR (*breakpoint cluster region*) encarregados pelo controle do ciclo celular, regulação da apoptose e atividades tirozinoquinase. (STOCK; THIRMAN, 2000).

2.2 Leucemia

As leucemias correspondem a um grupo de doenças caracterizadas pela proliferação desregulada e maligna de células hematopoiéticas na medula óssea, envolvendo qualquer linhagem hematopoética ou seus precursores. Mesmo que cada tipo de leucemia progrida de modo diferente, as células proliferantes substituem os constituintes normais; ocasionalmente levam à perda da funcionalidade da medula óssea, além de poder infiltrar outros órgãos e levar a morte caso não haja o tratamento adequado (BAIN, 2003).

Na medula óssea normal são bem evidentes os processos de proliferação e maturação das séries eritrocitárias, megacariocitárias e granulocitárias, sendo presentes em menos de 5% as células blásticas. Todavia, nas leucemias ocorre uma

substituição difusa dos elementos celulares normais por células leucêmicas apresentando processo maturativo lento e incompleto. Logo, tornou-se tradicional uma classificação com os critérios morfológicos dos elementos celulares envolvidos na leucemogênese. Desse modo, classificaram-se as leucemias em mielóides e linfóides com base na análise dos esfregaços de medula óssea e/ou sangue periférico. Além disso, conforme a evolução da doença, as leucemias foram classificadas em leucemias agudas – aquelas que sem o tratamento levam a morte em semanas ou meses, e leucemias crônicas – em que a falta de tratamento leva a morte em anos (COTRAN, 1994).

As leucemias agudas são caracterizadas por apresentarem alteração no processo de maturação, possuindo um infiltrado leucêmico constituído basicamente por células blásticas. Já as leucemias crônicas são caracterizadas por um alto processo proliferativo, mantendo sua capacidade de diferenciação em células maduras (CAVALCANTE JR, 1995).

2.3 Leucemia mielóide crônica

Em 1827, o médico francês Alfred Armand Louis Marie Velpeau registrou os primeiros casos de leucemias quando uma paciente de 63 anos apresentou doença com sintomas de febre, fraqueza, esplenomegalia, hepatomegalia e sangue com características que destoavam da normalidade. O raciocínio imediato da causa da doença foi o surgimento de “corpúsculos brancos”. Em 1845, o médico inglês, patologista e fisiologista John Hughes Bennett, descreveu pela primeira vez a leucemia como distúrbio sanguíneo. Contudo, o médico francês Donné Alfred foi quem descreveu a leucemia como uma doença de fato (HUNTLY; GILLILAND, 2005).

Na Escócia, Bennett relatou vários casos de pacientes que foram a óbito em que apresentaram aumento anormal do volume de baço, além de alterações na cor e consistência sanguíneas. Utilizando para descrever a doença o termo “leucocythemia”, retornou a mencioná-lo em 1852 para intitular o livro que escreveu

registrando o primeiro caso de cura. Entretanto, foi apenas em 1856 que o patologista alemão Rudolf Ludwig Karl Virchow utilizou o termo "leucemia". Virchow conseguiu descrever o excesso de glóbulos brancos nos doentes a partir da síndrome clínica relatada por Velpeau e Bennett. Incerto da causa da presença elevada de glóbulos brancos no sangue, relatou suas observações apenas como "leucemia", do grego "glóbulos brancos", para mencionar a condição analisada (HUNTLY; GILLILAND, 2005).

A diferenciação entre os leucócitos normais e anormais foi possível em 1877 devido à técnica de coloração criada por Paul Ehrlich sendo relevante para o avanço da classificação das leucemias. O termo "leucemia aguda" foi introduzido por Wilhelm Ebstein em 1889, justamente para diferenciar os casos de leucemia crônica daqueles de progressão rápida (EBSTEIN, 1889 *apud* LITCHTMAN, 1995).

Em 1869, Neumann reconheceu que a medula óssea produzia os glóbulos brancos, além de criar a denominação mielóide. Após 10 anos, Mosler descreveu que o exame da medula óssea era indispensável para o diagnóstico das leucemias. Naegli identificou o mieloblasto como célula com potencial carcinogênico. O diferencial dos elementos da LMC ficou mais consistente tanto por causa da identificação do mieloblasto sendo precursor da série granulocítica como do intenso uso de esfregaço de sangue periférico e da introdução da coloração com peroxidase (HUNTLY; GILLILAND, 2005).

Em 1920, conhecia-se o curso da doença com basofilia e trombocitose. Muitos estudos foram publicados no decorrer dos anos de pacientes portadores de LMC, sendo nessa época a mediana de sobrevida de três anos sem tratamento, embora alguns registros relatassem sobrevida maior do que dez anos. Em meados de 1930, havia a sensação de que o aumento da quantidade de mieloblastos relacionava-se com a morte no final da doença, mesmo não se falando em crise blástica. A esta fase dramática denominou-se "metamorfose" até 1959, antes da descoberta do cromossomo Ph¹ (GEARY, 2000).

Escasso era o conhecimento sobre a etiologia da LMC havia somente alguns relatos de exposição ao benzeno como também a irradiação sofrida por trabalhadores da área da saúde ao raio-X nos anos 20, até a segunda guerra mundial onde ficou demonstrada a relação entre exposição a radiação e o

desenvolvimento da LMC em um estudo epidemiológico, após as duas bombas atômicas no Japão (LANGE, MOLONEY e YAMAWAKI, 1954). Somente em 1960 a patogênese da LMC começou a ser melhor elucidada, pois Nowel e Hungerford descobriram o cromossomo Ph cujo braço longo estava ausente (NOWELL e HUNGERFORD, 1960). A LMC foi a primeira doença maligna humana a ser consistentemente associada a uma anormalidade cromossômica específica.

2.3.1 O CROMOSSOMO PHILADELPHIA

Em 1960, um cromossomo muito pequeno foi identificado em cultivo de células sanguíneas de pacientes com LMC (NOWELL e HUNGERFORD, 1960). Posteriormente, comprovou-se nessa patologia uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 em que há o encurtamento visível dos braços longos de um dos cromossomos 22 (ROWLEY, 1973). Este cromossomo anormal ficou conhecido como cromossomo Ph (GOLDMAN & MELO, 2003; KURZROCK et al., 2003). Existente em 95% dos pacientes com LMC, o cromossomo Ph é oriundo da translocação equilibrada entre o gene ABL (*Abelson Murine Leukemia*) encontrado no cromossomo 9, com o gene BCR (*breakpoint cluster region*) no cromossomo 22, resultando na formação do gene quimérico denominado BCR-ABL (BARTRAM, 1983); figura 1.

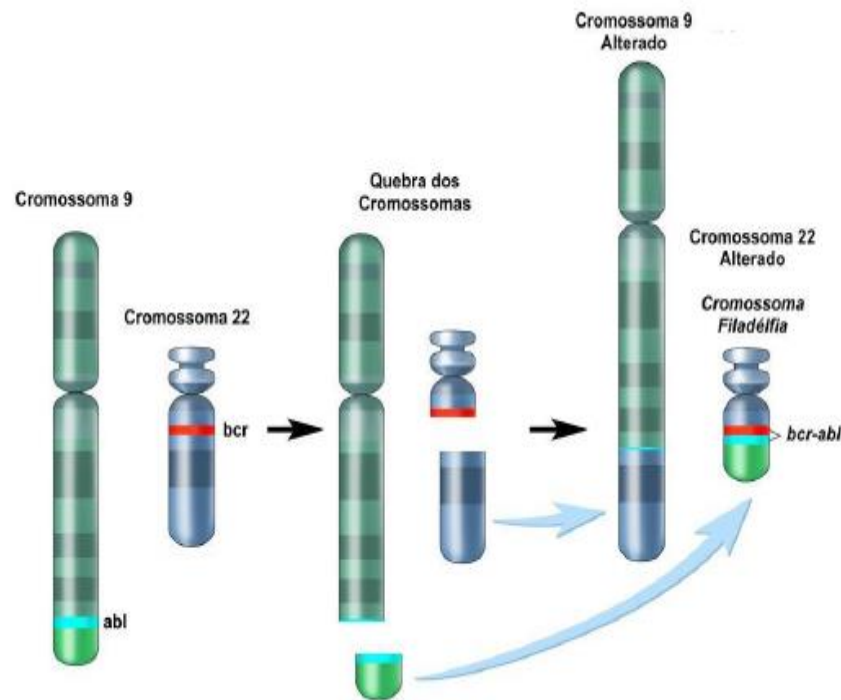


Figura 1: Formação do Cromossomo Filadélfia (Ph). Fonte: Adaptado de Cancer National Institute, 2010.

Esse gene híbrido resultante BCR-ABL codifica uma proteína de fusão anormal com tamanho de 210 kDa. Esta proteína possui atividade TK aumentada desempenhando um papel central na leucemogênese por se encarregar pela progressão da LMC (BEN-NERIAH, 1986; CLARKSON et al., 1997; FADERL et al, 1999; VERFAILLIE, 1999; DRUKER et al, 2001). Tanto mecanismo da translocação dos genes BCR e ABL quanto a transformação de fato na LMC ainda é desconhecido. Além disso, a proximidade desses genes na interfase das células hematopoiéticas pode favorecer a translocação entre os mesmos (HUNTLY et al., 2001). O gene ABL-BCR presente no cromossomo 9 é expresso em 70% dos casos de LMC, porém o BCR-ABL presente no cromossomo Ph é expresso em todos os casos de LMC.

O gene ABL encontrado no cromossomo 9 codifica a proteína ABL com tamanho de 145 kDa que possui atividade TK. Estruturalmente, ao longo do gene, existem diferentes domínios importantes na transdução de sinais e na regulação do

crescimento (DEININGER, GOLDMAN, MELO, 2000). O terminal amínico (N) possui um local de miristoilação que permite a interação da proteína codificada com outras proteínas de membrana e domínios homólogos SRC (SH) capazes de regular a atividade TK. Tanto a zona central quanto o terminal carboxílico (C) compreendem locais de ligação de estruturas como DNA e actina (Figura 2).

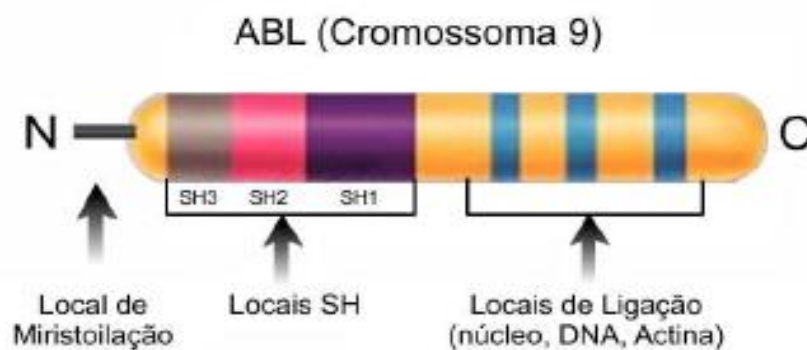


Figura 2: Domínios funcionais do produto do gene ABL. Fonte: Adaptado de Fardel et al., 1999.

A proteína BCR de tamanho 160 kDa é codificada pelo gene BRC localizado no cromossomo 22. Em sua estrutura, esse gene possui diversos pontos funcionais. O terminal amínico (N) apresenta um domínio que possibilita a dimerização *in vivo* e outro que compreende a atividade de cinase de serina-treonina. A zona central codifica um fator de troca de guanosinas, o *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEF) que atua mediando na ativação da proteína RHO responsável por ativar fatores de transcrição como o NF- κ B. O terminal carboxílico (C) codifica uma GTPase com desempenho na proteína RAC que está envolvida tanto na regulação da polimerização da actina quanto na atividade da NADPH oxidase das células fagocíticas (ADVANI, PENDERGAST, 2002); figura 3.

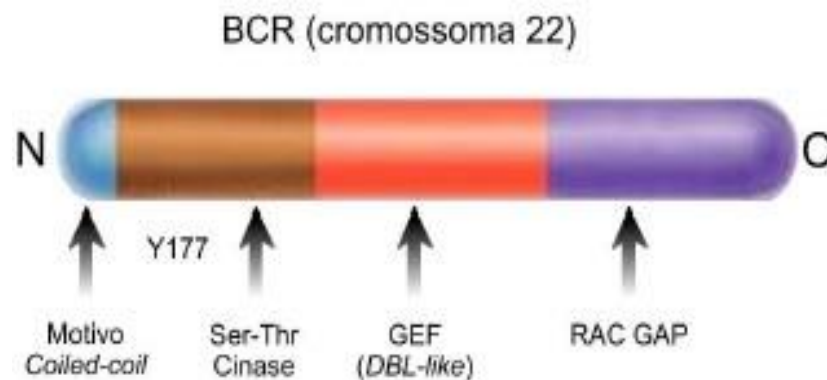


Figura 3: Domínios funcionais do produto do gene BCR. Fonte: Adaptado de Fardel et al., 1999.

2.3.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS E VIAS DE SINALIZAÇÃO DA TK DO BCR-ABL

A oncoproteína BCR-ABL acarreta a ativação constante da TK, resultando na fosforilação de inúmeros substratos citoplasmáticos que ativam cascatas de transdução de múltiplos sinais atingindo tanto o crescimento quanto a diferenciação celular. É inevitável que esses transcritos de BCR-ABL realizem modificações nas vias regulatórias intracelulares capazes de promover mutações que comprometem o ciclo celular e promovem danos para célula. A ativação das vias de sinalização está relacionada às alterações características da LMC. Dentre essas alterações estão: interação com vias bioquímicas como a via RAS, independência de fatores de crescimento para proliferação celular, diminuição da apoptose pela via STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*), hiperativação da molécula antiapoptótica BCLxl, inativação da molécula pró-apoptótica BAD via AKT; desregulação da citadesão celular, havendo liberação prematura de células mieloides imaturas na circulação (efeito da CRKL); alterações na angiogênese; e aumento da instabilidade genética responsável pela progressão da doença (BOLLMANN; GIGLIO, 2011); figura 4.

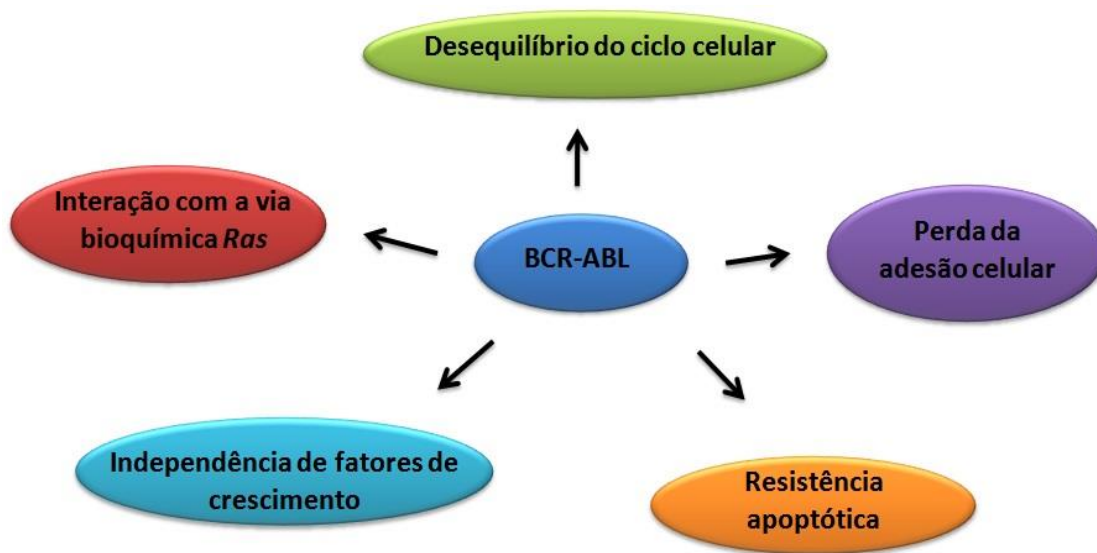


Figura 4: Principais atividades do híbrido *BCR-ABL* na célula. Fonte: Adaptado de SANTOS & FERREIRA, 2006.

Na interação com a via bioquímica *Ras* a proteína *Ras* é transdutora de sinais no ciclo GTP-GDT, onde controle positivos (GTP) e negativos (GDT) norteiam a proliferação celular. Inúmeros eventos em série fazem com que aja a ativação permanente da *Ras-GTP* gerando mudanças nas funções de regulação, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. Outra alteração característica na LMC é a independência de fatores de crescimento, visto que os fatores de crescimento (UFC) possuem funcionalidades no desenvolvimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação das células normais. A ativação de sinalizadores intracelulares, a expressão de genes do controle do ciclo celular mutados e a interação com receptores de fatores de crescimento resultam da independência do GF externos pela expressão do BCR-ABL na célula. O híbrido BCR-ABL também é capaz de hiperativar a expressão de moléculas antiapoptóticas como a BCL- x_l , além de inativar moléculas pró-apoptóticas como a BAD via AKT. Há estudos que mostram ainda a capacidade do gene BCR-ABL de inibir caspases endógenas da família IAP via PI3K/ART/NF-kB. Além disso, a adesão celular é um controle negativo na proliferação celular. Os transcritos de gene BCR-ABL como a proteína $p210^{bcr-abl}$ impedem o funcionamento do citoesqueleto pela fosforilação em substratos específicos. A proteína $p210^{bcr-abl}$ faz com que a célula hematopoiética tenha

deficiência de adesão na medula, porque um grupamento fosfato de proteínas do complexo de adesão é adicionado para impedir a interação de entre as integrinas e os microfilamentos de actina (SANTOS & FERREIRA, 2006).

2.3.3 EPIDEMIOLOGIA DA LMC

A LMC é uma doença mieloproliferativa clonal que representa aproximadamente 15% de todas as leucemias. Possui incidência anual de 1,6 casos em cada 100.000 habitantes. No Brasil, estimasse que a incidência das leucemias seja de seis casos para cada 100.000 homens e 4,8 para cada 100.000 mulheres. Possui maior frequência em adultos entre 40 e 60 anos de idade afetando ambos os sexos, porém com maior predominância no sexo masculino. Contudo, pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias, com menos de 10% dos casos de pacientes com até 20 anos. (KANTARJIAN et al., 1999; CHOPRA, 1999).

A exposição à radioatividade é principal fator de risco tanto para o desenvolvimento da LMC como para o surgimento de outros tipos de câncer (CASTRO et al., 2012). No entanto, apesar da provável relação entre LMC e radiação ionizante, na maioria dos casos não há fator predisponente conhecido (BOLLMANN; GIGLIO, 2011).

2.4 Diagnóstico

Em geral, o diagnóstico se estabelece pelos aspectos clínicos e laboratoriais (BAIN, 2007). Métodos como hemograma completo, mielograma, medição da esplenomegalia, biópsia de medula com coloração de prata, cariótipo da medula óssea, PCR-qualitativo para identificar o gene transcrito BCR-ABL, e PCR quantitativo são utilizados fazer o reconhecimento da LMC e definir a fase evolutiva dessa enfermidade (ALMEIDA et al., 2009).

A LMC é uma doença que evolui em fases e representa aproximadamente 15% de todas as leucemias. A primeira fase é a fase crônica, a segunda é a fase acelerada e a última é a fase aguda (Crise blástica). Geralmente os pacientes são diagnosticados na fase crônica, por meio de exames periódicos como o hemograma, onde frequentemente não apresentam sintoma algum da doença (BAIN, 2007). Nesse aspecto, o hemograma mostra-se como uma ferramenta relevante para a identificação da LMC, assim como sua adequada interpretação é fundamental na direção do diagnóstico. Desse modo, alguns aspectos principais do perfil do hemograma nas diferentes fases da LMC devem ser observados e estão representados no Quadro 1.

Em estágios iniciais da doença, as alterações mais frequentes observadas no hemograma são a diminuição ou aumento das plaquetas podendo chegar a valores acima de $700.000/\text{mm}^3$ em até 30% dos pacientes. A leucocitose com desvio escalonado também é uma alteração frequente que configura uma característica básica na LMC, uma vez que os leucócitos podem chegar a $500.000/\text{mm}^3$. Por meio da contagem diferencial é possível observar células da série mielóide em todos os níveis de maturação, com predomínio de mielócitos e neutrófilos segmentados. Pode-se encontrar também eosinofilia e basofilia, além do aumento nos valores absolutos de linfócitos, principalmente devido aos linfócitos T (WETZLER; BYRD; BLOOMFIELD, 2005; REDAELLI et al., 2004).

Apesar dos pacientes não apresentarem risco aumentado de infecção, inúmeras anormalidades funcionais foram constatadas *“in vitro”*. Dentre estas anormalidades, encontram-se a diminuição da adesão ao estroma da medula óssea, retardo da migração para sítios extravasculares, redução na atividade fagocítica e bactericida, menor conteúdo de lactoferrina e lisozima. A função das células “natural killer” (NK) também está reduzida por uma maturação defeituosa destas células (FUGIMIYA et al., 1987).

Alguns sintomas tipicamente apresentados pelos pacientes são letargia, aumento do volume e desconforto abdominal pela esplenomegalia e outros com relação à anemia que pode ser discreta com padrão normocrômico normocítico. A manifestação de febre, sangramentos ou trombozes não é comum nesta fase, contudo a perda de peso e a sudorese não são raras (SAWYERS, 1999).

Quadro 1 – Perfil do hemograma nas diferentes fases da LMC

Fase da doença	Parâmetro analisado	Valores encontrados
Fase Crônica	Leucograma	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose (>50.000 leucócitos/mm ³), com desvio a esquerda
	Diferencial	Predomínio de neutrófilos e mielócitos
		Contagem metamielócitos ↓
		Raros promielócitos
		Presença de até 10% de blastos
		Basófilos e eosinófilos ↑
	Eritrograma	Anemia normocítica normocrômica
		Presença de eritroblastos
	Plaquetas	Valor normal ou ↑
Fase Acelerada	Leucograma	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose crescente (> 100.000 leucócitos/mm ³)
	Diferencial	↑ Blastos (10 a 19%)
		↑ Basófilos (≥20%)
	Eritrograma	Anemia crescente
	Plaquetas	< 100.000 ou > 1.000.000
Crise Blástica	Leucograma	
	Diferencial	↑ Blastos (>20%)

Adaptado de: Bain, 2004; Bollman & Giglio, 2011; Bortolheiro & Chiattono, 2008; Grando & Wagner, 2008; Swerdlow et al., 2008; Xavier et al., 2010.

Nota: LMC= Leucemia Mielóide Crônica

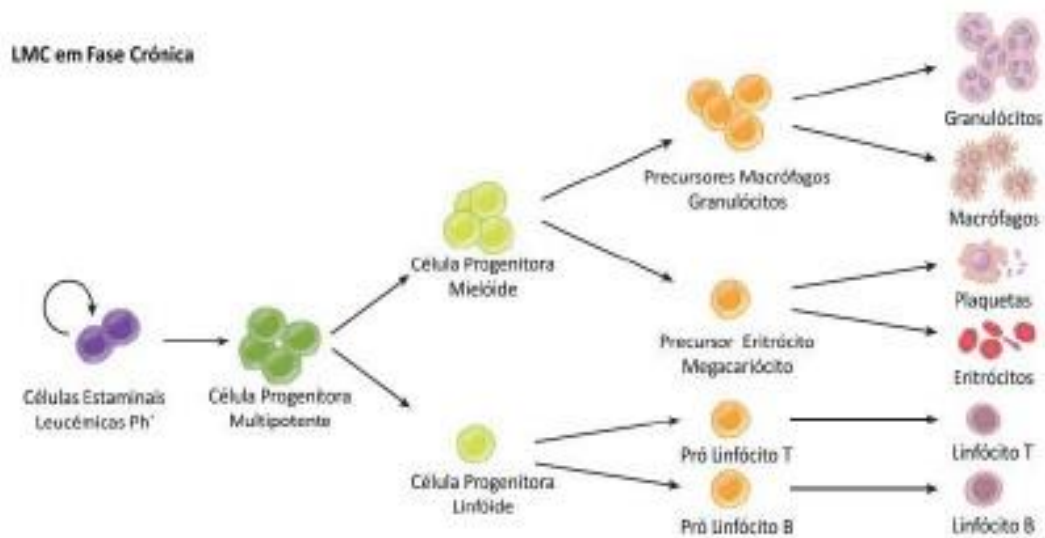


Figura 5: Hematopoiese na Fase Crônica da LMC. Fonte: Adaptado de Lobo et al., 2007.

A fase acelerada resulta da progressão da doença pelo paciente, mas sem evidenciar critérios de leucemia aguda, configurando assim, um estágio intermediário na patologia. Caracteriza-se pelo agravamento de sintomas constitucionais, esplenomagalia progressiva, refratariedade ao tratamento com progressiva leucocitose e/ou trombocitose. A anemia e a trombocitopenia também são verificadas. Observa-se um aumento percentual de blastos, promielócitos e basófilos tanto na medula óssea quanto no sangue periférico. Os pacientes podem desenvolver anormalidades genéticas adicionais que não estavam presentes no diagnóstico, sendo prováveis precedentes das manifestações clínicas e hematológicas da crise blástica (O'DWYERS et al., 2002).

Um dos principais critérios de identificação da crise blástica é a contagem de blastos. O número de blastos deve ser igual ou superior a 20% na medula óssea ou no sangue periférico ou presença de cloromas (SWERDLOW et al., 2008). Em relação à natureza da população blástica, aproximadamente 70% dos casos correspondem a linhagem mielóide. A transformação linfóide ocorre em 20% a 30% dos pacientes e a transformação bifenotípica é mais raramente encontrada. (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008; BOLLMANN; GIGLIO, 2011). No avanço da doença, as células leucêmicas perdem a capacidade de sofrer diferenciação

terminal, resultando numa expansão de células primitivas, que podem estar localizadas em tecidos não hematopoiéticos (MELO, 2007).

Na crise blástica mielóide, a transformação pode ocorrer em múltiplas linhagens ou ainda ser predominante em uma linhagem mieloblástica, eosinofílica, basofílica, monocítica, megacarioblástica ou a combinação destas (CORTES, KANTARJIAN, 2003; THIELE, KVASNICKA, 2006). Os pacientes em crise blástica de leucemia mielóide crônica possuem maior frequência de sintomas, incluindo perda de peso, febre, sudorese noturna e dor óssea. Anemia, complicações infecciosas e sangramento também são comuns (SUREDA et al., 2003).

Já na crise blástica linfóide, geralmente não ocorre displasia e nem basofilia, sendo com frequência a célula B precursora ou comum, raramente a célula T (CORTES, KANTARJIAN, 2003; BAIN, 2005). A crise blástica apresenta uma resposta precária as diferentes manobras terapêuticas utilizadas.

2.5 Neutrófilo

Os neutrófilos são células sanguíneas produzidas e armazenadas na medula óssea e quando estas células se tornam maduras, são liberadas na corrente sanguínea. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sistema imune e possuem um papel crucial como primeira linha de defesa em processos infecciosos e inflamatórios (KOBAYASHI e DELEO, 2009). Na medula óssea, a produção de neutrófilos ocorre a partir de células hematopoiéticas pluripotentes, sob estímulos de numerosos mediadores, em especial os fatores de estímulos de granulócitos (G-CFS) e de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CFS) (PEDROSA, 2013).

Os neutrófilos possuem uma meia-vida que pode variar entre 6 a 12 horas na circulação. No entanto, esse tempo de meia-vida pode se prolongar pela ação de alguns agentes ou processos infecciosos (ALMEIDA et al., 2012). Têm aproximadamente 12-15µm de diâmetro e morfologicamente são classificados como células polimorfonucleadas (PMNs). Apresentam um núcleo lobulado e são denominados granulócitos, pois possuem diversos grânulos no citoplasma, que são

delimitados por membranas que armazenam proteínas essenciais às suas funções (LUZ, 2004; VITAL, 2015).

Os grânulos citoplasmáticos são classificados em grânulos primários ou azurófilos, grânulos secundários ou específicos e grânulos terciários (FAURSCHOU, BRREGAARD, 2003). Os grânulos primários surgem quando os neutrófilos estão na fase de promielócitos e se caracterizam por conterem a enzima mieloperoxidase. Na fase de metamielócitos, os grânulos secundários são formados e passam a conter lactoferretina, colagenase, lisozima e fosfatase alcalina. E, por sua vez, os grânulos terciários contêm gelatinase e metaloproteinase (PONTES, 2016).

A quimiotaxia corresponde em um processo importante da resposta imune. Os neutrófilos são ativados pela presença de produtos microbianos, citocinas ou quimiocinas, tais como: fator de TNF- α , GM-CSF, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e interferon γ ou outras substâncias liberadas pelas células do tecido lesado e migram para o local inflamado, sítio infeccioso, fisiológico, como na embriogênese, e câncer, nas metástases. Quando estas células chegam ao local da inflamação ocorrem interações transitórias entre selectinas e células do endotélio que resultam em ligação e rolamento de neutrófilos. Esses são os primeiros passos da cascata de recrutamento de leucócitos. Uma vez ativados, ocorre o aumento da expressão de selectinas, como a E-Selectina e P-Selectina expressas no endotélio e PSGL e L-Selectina (CD62L) expressas pelos neutrófilos (PHILLIPSON e KUBES, 2011).

Esta etapa permite que os neutrófilos em circulação sejam capturados por células do endotélio próximas da área inflamada. Os receptores acoplados à proteína G nos neutrófilos rolantes ligam as quimiocinas sequestradas no endotélio, gerando sinais "de dentro para fora" que induzem mudanças conformacionais em integrinas $\beta 2$ expressas por neutrófilos que aumentam sua avidéz e afinidade, resultando em detenção de neutrófilos e rastreamento intravascular subsequente ao local de transmigração. Com a expressão das integrinas- $\beta 2$ LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18), ocorre a adesão firme de neutrófilos a células do endotélio através da ligação às integrinas ICAM-1 e ICAM-2 na superfície do endotélio (KOBAYASHI e DELEO, 2009; BORRENGAARD, 2010; LYCK e ENZMANN, 2015; VITAL, 2015). Após a adesão firme, o processo de transmigração dos neutrófilos

inicia-se para o interior dos tecidos. Na qual, ocorre predominantemente através das *Tight-junctions* entre células do endotélio (PHILIPSON, 2006).

Existem dois tipos de transmigração, o paracelular e o transcelular. No paracelular há menos proteínas juncionais e o alinhamento das células endoteliais é menos ordenada (2 a 5 minutos) entre as junções celulares, e nas junções celulares denominadas transcelular, ocorre através de uma célula endotelial, porém é mais demorada, cerca de 20 a 30 minutos, figura 6. Esta fase é regulada pelas integrinas- $\beta 2$, LFA-1 e Mac-1, nos neutrófilos e por ICAM-1 e PECAM-1, expressas em células do endotélio (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; VITAL, 2015).

Os neutrófilos tem a capacidade de eliminar diversos patógenos, restos de tecido, pelo processo de fagocitose e, seguinte liberação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, além de produção e liberação de citocinas.

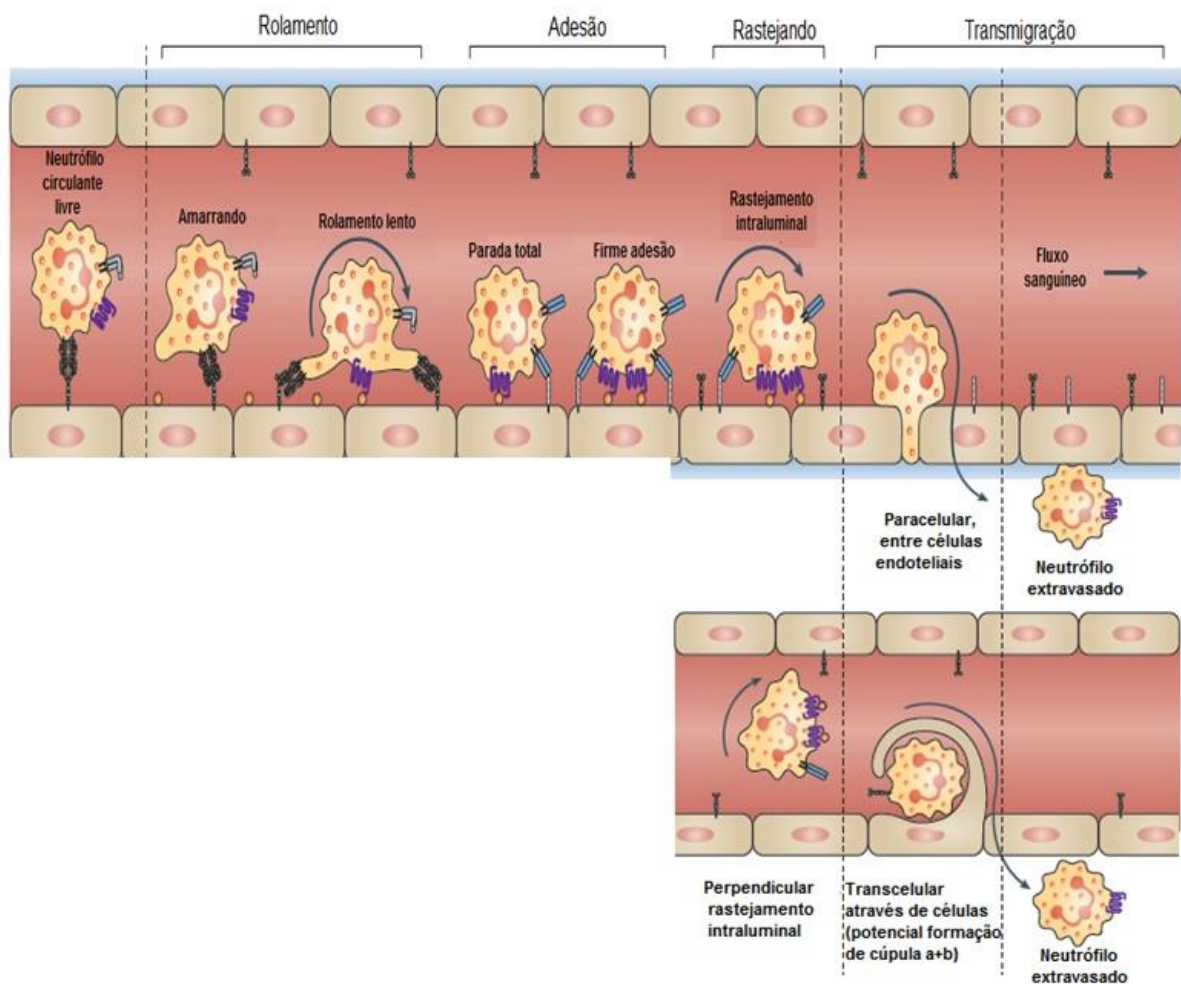


Figura 6: Cascata de recrutamento de neutrófilos. Fonte: Adaptado de Kolaczowska e Kubes, 2013.

2.5.1 FAGOCITOSE

Os neutrófilos podem eliminar patógenos no meio intra e extracelular. Esse processo é denominado de fagocitose. A fagocitose é um mecanismo de defesa essencial da resposta imune inata. Inicia-se o processo a partir do contato da célula fagocitária com o agente invasor, sendo acompanhado de sinais que ativam processos celulares, tais como rearranjo do citoesqueleto, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo. No processo de reconhecimento das partículas e sinalizações intracelulares, pode-se dizer que o processo de fagocitose ocorre através do reconhecimento e internalização do patógeno, sinalização intracelular e acoplamento da atividade fagocitária à resposta inflamatória local e sistêmica (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OLIVEIRA, 2012).

O agente invasor pode ser reconhecido tanto através da sua ligação direta aos receptores, quanto através da ligação de opsoninas em sua superfície aos receptores localizados na membrana das células fagocitárias. Na fagocitose intracelular, as sinalizações da presença de partículas sinalizadoras induzem a polimerização de moléculas de actina e a membrana citoplasmática estende-se por toda a partícula invasora, levando-a ao centro da célula. O fagossoma transforma-se em fagolisossoma, resultando na liberação do conteúdo enzimático de grânulos primários e secundários que são ricos de hidrolases ácidas, enzimas microbicidas, mieloperoxidase (MPO), lisosima, proteinases neutras (elastase, catepsina G e proteinase 3 - PR3), levando o patógeno a ser morto e digerido (PEDROZA, 2013; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013), figura 7.

A ativação da fagocitose promove nos neutrófilos uma explosão respiratória (ER), conhecida como *“burst”* oxidativo caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbia e geração de radicais livres oriundos do oxigênio. Esta ER foi descrita pela primeira vez em 1933 e, posteriormente, foi compreendido que a ativação do NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e

adenina) oxidase era responsável pelo “burst” respiratório nos neutrófilos (PONTES, 2016).

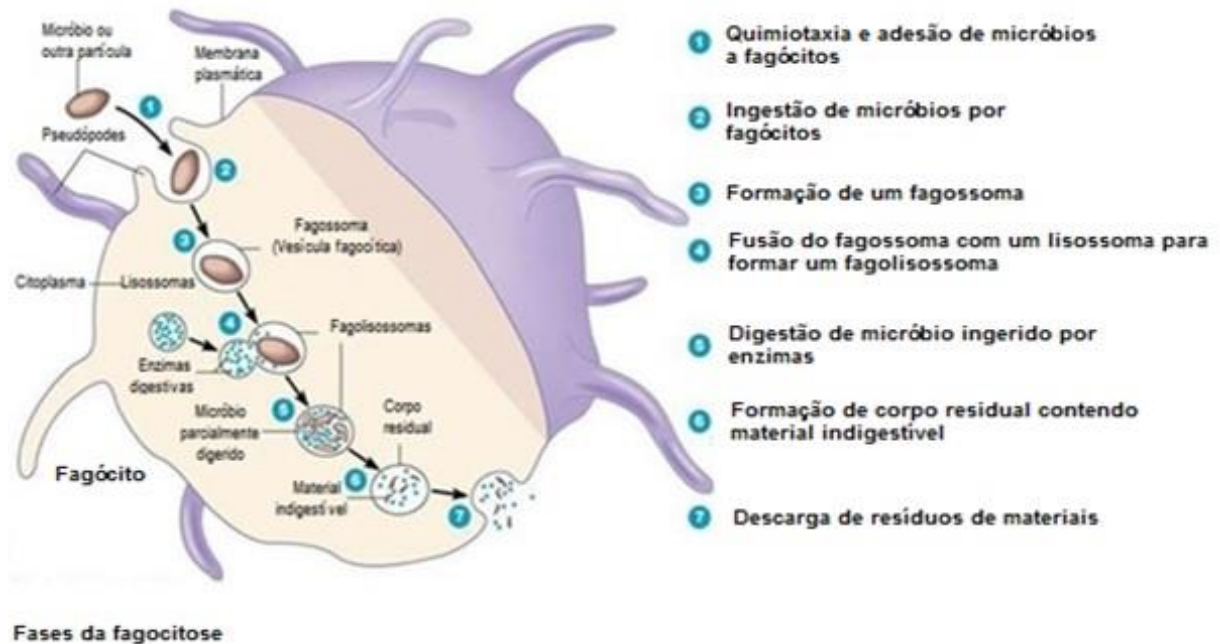


Figura 7: Mecanismos de morte celular por neutrófilos. Fonte: Adaptado de Benjamin Cummings (2004).

2.5.2 NADPH OXIDASE, BURST OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A NADPH oxidase é um complexo enzimático localizado na membrana plasmática dos fagócitos. É composto pela junção de vários constituintes na membrana citoplasmática em resposta a um sinal que ativa o neutrófilo. Dentre estes compostos estão às proteínas citossólicas $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$, proteínas integrais de membrana $p22^{phox}$ e $gp91^{phox}$, que juntas formam o citocromo $b558$. Ademais, existem também as proteínas G (Rac 2 e 2 e Rap1A) que ajudam na ativação enzimática (ROSEN et al., 1999; PESSOA, 2009).

O NADPH oxidase permanece inativo nas células em estado de repouso, a partir do momento em que há presença de um patógeno ou um estímulo externo, o seu estado se torna ativado, promovendo o mecanismo microbicida oxidante, que catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) no fagossoma (KARLSSON et al., 2000; ORSO, 2013). Sendo responsável pelas primeiras etapas da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) sua função é transportar elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o oxigênio no fluido extracelular ou no espaço intra-fagossômico para formar O_2^- . Após estimulados por fatores ambientais, mediadores inflamatórios ou durante o processo de fagocitose, os neutrófilos aumentam o consumo de oxigênio, acarretando em um conjunto de alterações metabólicas que culminam na formação de EROs ou como é também denominado “*burst*” oxidativo ou ER.

A ER caracteriza-se pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da origem de radicais livres, dentre os quais, destacam-se as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Essas moléculas são altamente reativas devido à presença de um par de elétrons não pareados na última camada, tornando estes potentes agentes oxidantes. A produção de O_2^- a partir do oxigênio molecular (O_2), leva à formação de H_2O_2 e radicais de OH, os quais podem eventualmente serem convertidos pela enzima MPO em outros oxidantes reativos como ácido hipocloroso (HOCl) (KLEBANOFF, 2005; ORSO, 2013; PEDROZA, 2013).

2.6 Tratamento

Desenvolvida na época da Primeira Guerra Mundial, a mostarda nitrogenada foi o primeiro citotóxico utilizado na LMC, todavia, apesar da melhora clínica observada, não se obteve impressão na sobrevida (GEARY, 2000). Em meados dos anos 60, o uso do agente alquilante bussulfan demonstrou uma ação mais seletiva atuando na série granulocítica. Em 1972, a HU tornou-se o medicamento de escolha

para o controle da LMC por apresentar taxas de resposta hematológica completa de até 80%. Apesar da HU ser superior ao bussulfan em relação a sobrevida, nenhuma dessas terapias induzem qualquer grau de negatificação do cromossomo Ph para alterar a história natural da doença (HEHLMANN et al., 1993).

Na década de 80, foi introduzido na terapia da LMC o alfa-interferon (IFN-alfa). Esse tratamento é capaz de aumentar as taxas de resposta hematológica e citogenética, induzir o desaparecimento do cromossomo Ph e melhorar a sobrevida dos pacientes (TALPAZ et al., 1983). Em 1986, surgem as primeiras experiências de transplante de medula óssea alogênico (TMOalo) em LMC. Essa estratégia terapêutica é considerada o único tratamento curativo para a LMC (GOLDMAN & DRUKER, 2001). O benefício do transplante é devido ao efeito imunológico enxerto *versus* leucemia, mediado pelos linfócitos do doador. Porém, a idade superior a 40 anos, fase avançada da doença, demora no diagnóstico e doador não aparentado são fatores de pior prognóstico para o transplante. Apesar do seu poder de cura, somente 15% a 30% dos pacientes serão candidatos a este procedimento (GRATWOHL, 2003).

2.6.1 MESILATO DE IMATINIBE

No decorrer dos anos revelou-se uma grande quantidade de informações a respeito dos eventos moleculares abrangentes no desenvolvimento do câncer humano. Por meio da compreensão dessas informações sobre as vias de sinalização reguladoras do crescimento, o ciclo celular e a apoptose, obtiveram-se inúmeros alvos para agentes antineoplásicos. O mesilato de imatinibe (MI) é o melhor exemplo de como o entendimento da patogênese molecular de uma neoplasia maligna humana pode levar ao avanço de uma estratégia terapêutica eficiente. (MAURO et al., 2002).

Estudos em modelo animal estabeleceram que o gene quimérico BCR-ABL atua como um oncogene leucêmico capaz de ativar naturalmente a TK, sendo essencial para transformações funcionais da proteína. Quando a TK se liga ao ATP,

ocorre a transferência de fosfato do ATP para tirosinas residuais de proteínas específicas. Após fosforiladas, essas proteínas desencadeiam inúmeras etapas que provocam os defeitos fisiopatológicos presentes na LMC. Logo, se ocorrer o bloqueio da ligação do ATP com a tirosina quinase, haverá também o bloqueio das etapas envolvidas nessa patogênese (DRUKER, 2000; FARDEL et al, 2000).

Depois de testarem diversos inibidores da tirosina quinase, o MI mostrou-se capaz de matar especificamente as células neoplásicas da LMC, porque ele é um inibidor competitivo do ATP capaz de bloquear a atividade da tirosina quinase ao se ligar nos sítios de fosforilação do BCR-ABL (GOLDMAN, 2000; SAVAGE & ANTMAN, 2002). Isso faz com que o fármaco reduza notadamente a quantidade de células leucêmicas na fase crônica da doença, além de proporcionar aumento da sobrevida aos pacientes em comparação aos agentes convencionais.

Em 2002, o MI se tornou a primeira linha de tratamento nos diagnósticos recentes em pacientes com LMC por sua capacidade de remissão citogenética completa. No entanto, caso haja interrupção do tratamento quimioterápico, os pacientes podem ter recidivas e evoluir para a fase final da neoplasia (GRANDO et al, 2008).

2.6.1.1 Mecanismo de ação

O MI age inibindo de maneira potente e específica *in vitro* e *in vivo* a TK relacionada ao gene ABL, o receptor de células primordiais (c-kit ou CD 117), o receptor do fator de crescimento plaquetário (PDGF), além de todas as formas do oncogene ABL (BCR-ABL, TEL-ABL e v-ABL), impedindo a fosforilação dos substratos envolvidos no ciclo celular devido possuir alta afinidade com o sítio de ligação do ATP (Figura 6). Sua ação é baseada na competição com o substrato da enzima TK e induz à parada da proliferação e à apoptose das células leucêmicas. O MI é capaz de induzir uma resposta hematológica rápida e completa em praticamente todos os pacientes com LMC na fase crônica, 50% na fase acelerada e

até mesmo uma pequena parcela dos pacientes que estão na crise blástica (LYSENG-WILLIAMSON & JARVIS, 2001; GRANDO et al, 2008).

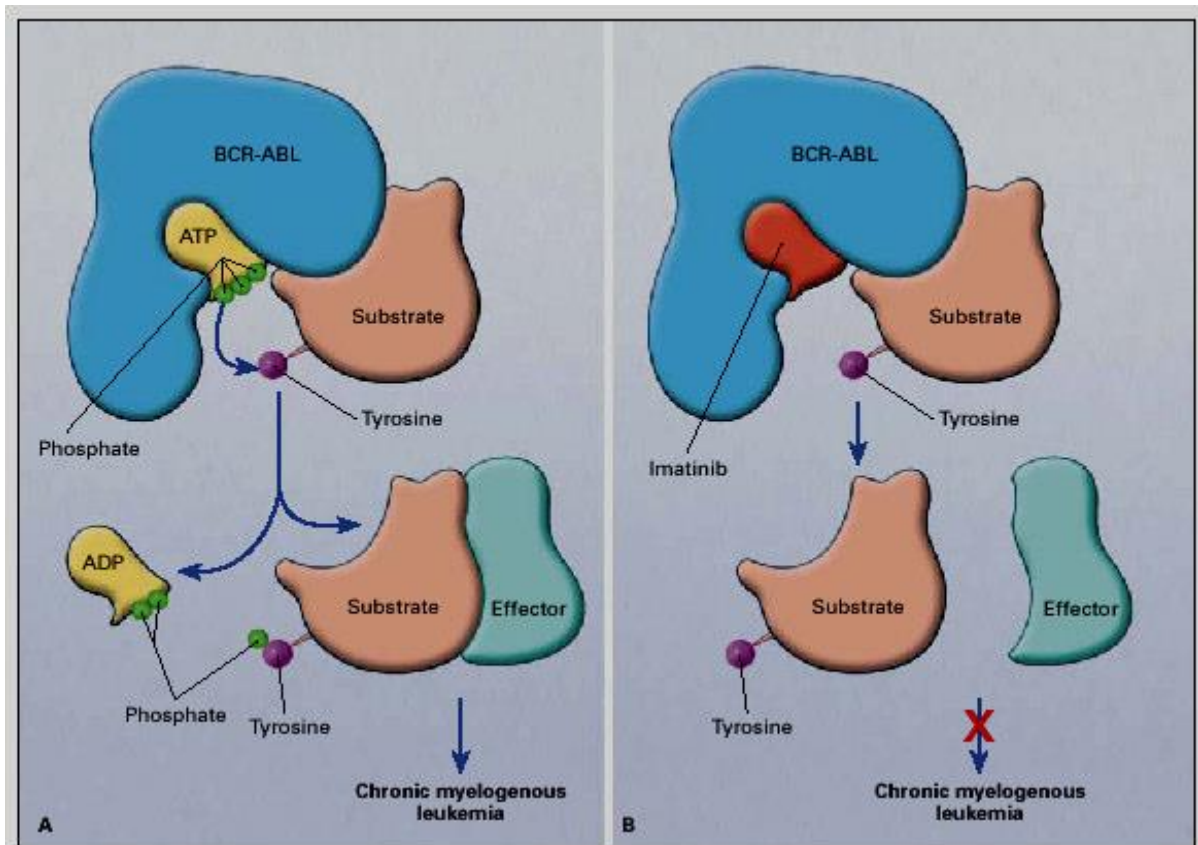


Figura 8: Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe. Fonte: SAVAGE; ANTMAN, 2002.

Nota: A figura A mostra a molécula de ATP ligada à proteína BCR-ABL1 e a conseqüente fosforilação dos resíduos de tirosina do substrato que, quando fosforilado, ativa outras moléculas efectoras. A figura B mostra o mesilato de imatinibe ocupando o mesmo sítio de ligação com bloqueio da ancoragem do ATP e impedimento da fosforilação do substrato. BCR-ABL: *Breakpoint Cluster Region – Abelson*, ATP: Adenosina Trifosfato, ADP: Adenosina Difosfato.

2.6.1.2 Farmacocinética

A absorção do MI ocorre rapidamente, alcançando um pico de concentração plasmática em 2 a 4 horas depois de ingerido. Possui meia-vida de aproximadamente 18 horas. Maior parte MI é eliminada nas fezes (68%) e somente

13% é excretado na urina. Apresenta alta ligação a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. Sua metabolização é hepática, sendo substrato do citocromo P450. A concentração plasmática pode ser alterada caso sejam administrados fármacos inibidores ou indutores da enzima P450 em conjunto com o MI. Pode ocorrer diminuição na metabolização quando administrado fármacos como cetoconazol, itraconazol, eritromicina e claritromicina que são inibidores da atividade P450. Já o aumento da metabolização ocorre quando administrado fármacos como dexametasona, fenitoína, carbamazepina, rifampicina e fenobarbital que são indutores do citocromo P450. O MI também pode aumentar as concentrações plasmáticas da sinvastatina e ciclosporina (substratos do P450) (LYSENG-WILLIAMSON & JARVIS, 2001). A dose oral recomendada para paciente com LMC na fase crônica é de 400 mg diário, já para os pacientes em fase acelerada ou crise blástica é recomendado utilizar 600 mg por dia (COX et al., 2003).

2.6.1.3 Perfil de toxicidade e Resistência ao Mesilato de Imatinibe

O MI tem boa tolerância pela maioria dos pacientes e, geralmente, os efeitos adversos são moderados com redução da dose ou suspensão do tratamento com recomeço gradativo posterior da dose. Um dos efeitos mais frequentes é a mielossupressão, sobretudo na fase crônica da doença. Deverá ocorrer a suspensão da medicação quando o desenvolvimento de toxicidade hematológica for de grau maior ou igual a 3 com neutrófilos < 1.000/hL, plaquetas < 50.000/hL ou hemoglobina < 8,0 g/dL. Após a recuperação para grau 2 com neutrófilos > 1500 /hL, plaquetas > 100.000/hL e hemoglobina > 10,0 g/dL, o tratamento deverá ser retomado com redução da dose para 300 mg, haja vista que menos de 5% dos pacientes apresentam esse quadro prolongado.

Dentre os demais efeitos adversos estão edema, diarreia, náusea, caibra muscular, dor muscular e óssea, erupções cutâneas, fadiga, dor de cabeça, prurido, toxicidade hepática, leucopenia, granulocitopenia, trombocitopenia e anemia (D'ANTONIO, 2005). Geralmente, não há frequência de complicações infecciosas

com a neutropenia grave ao se comparar os pacientes com mielossupressão induzida por quimioterapia, devido à ausência de dano à mucosa.

Mesmo com a segurança e eficácia da terapia com MI, pacientes da fase acelerada e da crise blástica podem sofrer recaída e resistência. Essa resistência pode ser explicada seja por amplificação do gene BCR-ABL ou mutações adquiridas oriundas da pressão seletiva da terapia com MI (BRANFORD, HUGHES, 2006). Hoje em dia, estão sendo utilizados também como terapia os inibidores da tirosina-quinase de segunda geração. Eles atuam de modo semelhante ao MI, mas com maior intensidade de inibição do BCR-ABL e demonstram eficácia na maioria dos pacientes resistentes ou intolerantes. Dentre eles, citam-se o dasatinibe, o nilotinibe e o bosutinibe.

O dasatinibe é 300 vezes mais potente *in vitro* contra a proteína BCR/ABL que o MI. É usado em casos resistentes ao MI devido ligar-se a conformações ativas e inativas do domínio ABL inibindo tanto quinases ABL quanto SRC, sendo sua resposta bastante satisfatória num grupo muito grande de pacientes com diferentes mutações, exceto T315I. Podem ocorrer efeitos adversos, tais como neutropenia, plaquetopenia, diarreia, vômitos, náusea, hemorragia gastrointestinal, *rashes* cutâneos e edema. Já o nilotinibe, é um fármaco muito ativo para pacientes resistentes ou intolerantes ao MI, possuindo potência e seletividade pelo ABL entre 20 e 50 vezes maior que o MI com atividade por via oral. Demais fármacos também estão em desenvolvimento para o tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes aos inibidores de primeira e segunda geração, como o bosutinibe (SOUZA, 2008; CHAUFFAILLE, 2009).

2.6.1.4 Resposta ao tratamento

A resposta hematológica é definida por uma normalização das contagens sanguíneas periféricas, com leucócitos $<10 \times 10^9$ células/L e plaquetas $<450 \times 10^9$ células/L, ausência de células imaturas como mielócitos, promielócitos ou blastos no

sangue periférico, ausência de sinais e sintomas da doença, com desaparecimento da esplenomegalia (BACCARANI, 2013; National Comprehensive Cancer Network, 2015.)

A resposta citogenética é definida por cariótipo convencional em medula óssea e se divide em completa, com 0% metafases com Ph+; parcial, com 1 a 35% de metafases com Ph+; *major*, com 0 a 35% de metafases Ph+, englobando a resposta completa e parcial; ou *minor*, com >35% de metafases Ph+. Ao chegar na resposta citogenética completa o número residual de células Ph+ só pode ser acedido por métodos moleculares quantitativos (BACCARANI, 2013; National Comprehensive Cancer Network, 2015.)

A resposta molecular é realizada por PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR), através da determinação do rácio dos transcritos *BCR-ABL* e dos transcritos de *ABL* ou *GUS* (gene controlo). A resposta molecular *major* (RMM) é um nível de transcritos *BCR-ABL* <0,1% na escala internacional (IS), que corresponde a uma redução de 3 log dos transcritos *BCR-ABL*. As respostas moleculares com uma redução >4 log da linha de base são consideradas respostas moleculares profundas e na escala internacional correspondem a uma resposta molecular 4 (RM4.0), quando *BCR-ABL*<0,01%, RM4.5 quando *BCR-ABL*<0,0032% e RM5.0 quando *BCR-ABL*<0,001% (BACCARANI, 2013; National Comprehensive Cancer Network, 2015.)

A inserção do IM mudou a perspectiva da terapia medicamentosa da LMC em nível mundial. Baseado em estudos de fase I,II e III, o IM tornou-se o tratamento de primeira linha para pacientes com LMC recém-diagnosticados por demonstrar resposta citogenética, resposta hematológica, excelente sobrevida livre de progressão alcançada e controle da enfermidade a longo prazo. Entretanto, alguns questionamentos permanecem a esta terapia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a função de neutrófilos em portadores de LMC Ph¹ positiva antes e após o início do tratamento com MI.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar o número de neutrófilos circulantes em portadores de LMC Ph¹ positiva, antes e após o início do tratamento com MI, através do hemograma;

- Avaliar se o uso do MI interfere na função fagocítica, *in vitro*, dos neutrófilos;

- Avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos pelo teste de redução do tetrazólio nitro azul.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Local de realização do estudo

Os participantes desse estudo foram selecionados no ambulatório de hematologia do Hospital Ophir Loyola (HOL), Belém-PA, no momento do diagnóstico. O diagnóstico da LMC Ph positiva foi realizado segundo os critérios da OMS (2008), ocorrendo por uma soma de fatores como história, aspectos clínicos, hemograma, leucograma, mielograma, biópsia de medula óssea (BMO), presença do cromossomo Ph e PCR-qualitativo para identificar o gene transcrito BCR-ABL. A escolha deste local foi determinada por se tratar de uma Unidade de Referência no tratamento de pacientes com doenças oncológicas na região Norte do país, que admite casos novos vindos do interior do estado, do município de Belém e região metropolitana. Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

4.2 Seleção da amostra

4.2.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

No total, 26 participantes foram orientados especificamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os benefícios, riscos e procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa. Quando em conformidade com os esclarecimentos prestados, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) passando a fazer parte do estudo. Os participantes foram alocados em dois grupos:

- *Grupo controle (Grupo A)*: composto de treze indivíduos adultos de ambos os sexos, saudáveis e que não possuíam o hábito de consumir bebidas alcoólicas ou fármacos. Apresentando parâmetros hematológicos dentro dos valores de referência sem ter alguma infecção e/ou inflamação. Sendo voluntários desse grupo funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPA que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE. A coleta de sangue destes voluntários foi realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da referida faculdade.

- Grupo diagnosticado com LMC Ph¹ positiva (**Grupo B**): composto de treze indivíduos adultos de ambos os sexos. Foram realizadas nesse grupo três coletas sanguíneas. A primeira coleta no momento do diagnóstico com o paciente sem tratamento (**Grupo B1, n=13**), a segunda coleta após um mês de tratamento com MI (**Grupo B2, n=13**) e a terceira coleta após quatro meses de tratamento (**Grupo B3, n=13**). Em todos os pacientes o tratamento foi realizado com 400mg de MI.

4.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados para o estudo pacientes, de ambos os sexos, com LMC Ph¹ positiva no momento do diagnóstico (casos novos) antes de iniciarem o tratamento quimioterápico, com idade igual ou superior a 18 anos, atendidos no Ambulatório de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Ophir Loyola.

4.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Excetuaram-se os indivíduos que não concordaram em participar do estudo ou não assinaram o TCLE e que declararam ter apresentado febre, infecções, inflamações e alergias no último mês, já em tratamento quimioterápico, e/ou estado

de imunossupressão (diagnóstico de doença imunossupressora), bem como pacientes com outros tipos de neoplasias, visto que essas condições podem alterar o perfil fagocítico.

4.3 Aspectos Éticos

Essa pesquisa foi submetida à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital Universitário João de Barros Barreto e aprovada com número de parecer 2.035.172 e CAAE: 64964917.6.0000.0017 por estar de acordo com a Resolução nº466/2012 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde/MS.

4.4 Coleta de Dados

4.4.1 INFORMAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Os dados hematológicos dos pacientes do Grupo B foram coletados pelo próprio pesquisador por meio de entrevista com cada paciente no dia das coletas sanguíneas e da busca nos prontuários médicos gerados no momento do diagnóstico, sendo as informações como dados pessoais, hemograma, uso de medicações repassadas para a Ficha Clínica de Pacientes (ANEXO B) e mantidas em sigilo de pesquisa.

4.5 Material

Neste estudo foram utilizados ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 2% (BIOLAB), Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®), tampão fosfato salina (PBS) 10x (16 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 4,336 g de Na₂HPO₄·x7H₂O e 0,4 g de KH₂PO₄ em 200 mL de água destilada), solução de hemólise (16,05 g de NH₄CL, 1,680 g de NaHCO₃, 0,74 g de EDTA em 2 litros de água destilada) RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), soro fetal bovino (SFB) 0,01% e penicilina estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), NBT (SIGMA-ALDRICH®), corante leishman (1,5 g de Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa em 1 litro de Metanol).

4.6 Métodos

4.6.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de sangue para realização do hemograma, dos testes de fagocitose e de redução do tetrazólio nitroazul foi praticada utilizando material descartável e esterilizado, seguindo os princípios de assepsia. Foram colhidos 5mL de sangue por punção venosa em tubo contendo EDTA como anticoagulante. Posteriormente, essas amostras foram acondicionadas com gelox a temperatura de aproximadamente 2°C e encaminhadas ao laboratório de hematologia da Faculdade de Farmácia da UFPa para realização dos experimentos e análises.

4.6.2 AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA

As amostras foram analisadas por meio de metodologia semi automatizada, utilizando o contador ABX micros 60, nos quais foram analisados os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM (Volume Corpuscular Média), CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Redcell

volume DistributionWidth), leucócitos totais, diferenciais, como presença ou não de neutrofilia, definida como número de neutrófilos absolutos $>6.500/\text{mm}^3$ ou $\geq 70\%$ do número de leucócitos totais e plaquetas, assim como a relação neutrófilo/linfócito (RNL). A RNL foi calculada para cada paciente e determinada se <5 ou ≥ 5 (WALSH et al., 2005). Para a avaliação da diferencial leucocitária e de possíveis alterações celulares, como poiquilocitose, o esfregaço sanguíneo foi realizado em todas as amostras, utilizando a coloração panótica e posteriormente submetido à microscopia óptica em objetiva de imersão.

4.6.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES

4.6.3.1 Obtenção e Preparo dos Neutrófilos Circulantes

Foi adicionado cerca de 5 mL de solução salina 0,9% à amostra de sangue e homogeneizado com cautela, o sangue-solução salina foi passado para um novo tubo contendo 3mL de Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®) (Figura 9-A) após esse procedimento o tubo foi centrifugado por 30 minutos à 1500 RPM, com separação dos leucócitos (Figura 9-B) o sobrenadante foi descartado e a camada dos neutrófilos foi transferida para um novo tubo Falcon®. Posteriormente foi acrescentado a solução de hemólise (Figura 9-C) e centrifugado por 10 minutos à 1400 RPM, repetido duas vezes, e após esse processo foi adicionado PBS 1x até completar o tubo para a lavagem, (Figura 9-D), e centrifugado por 10 minutos à 1400 RPM, posteriormente descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet de células (Figura 9-E) as células foram ressuspensas em 5 ml de RPMI completo (Figura 9- F).

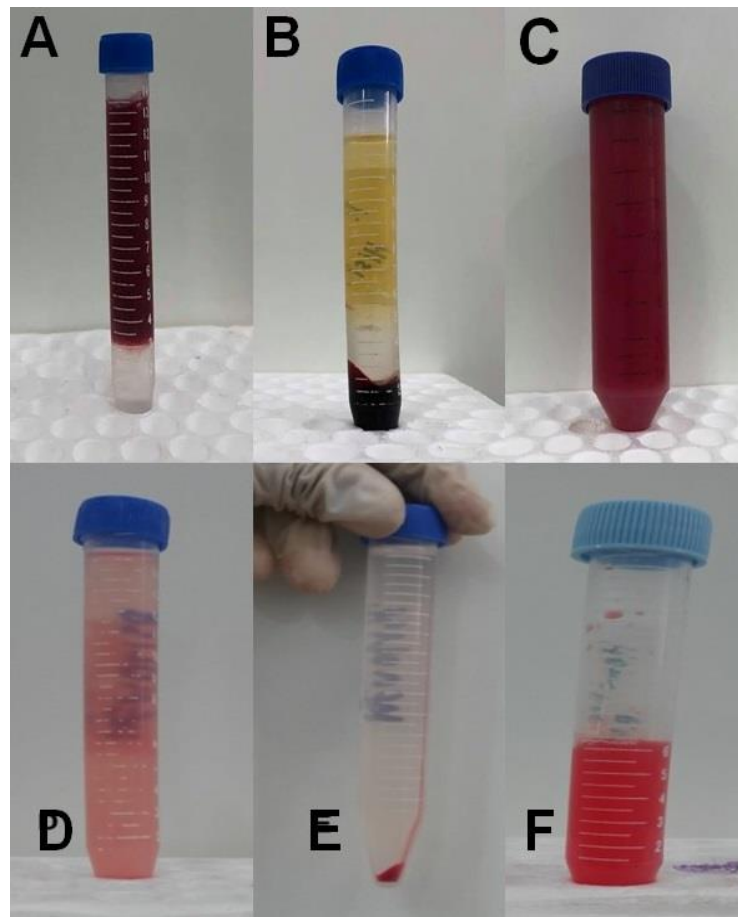


Figura 9: Obtenção de leucócitos do sangue periférico. (A) Tubo falcon contendo sangue:salina (1:1) com histopaque. (B) Após centrifugação. (C) Lavagem das células com solução de hemólise. (D) Lavagem das células com solução salina. (E) Após centrifugação pellet de células. (F) Pellet ressuspensionado em 5mL de RPMI completo. Fonte: Autor.

Foi realizada a contagem total de leucócitos adicionando-se 20 μ l da solução de células à solução de Turk (380 μ l), e se contou em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em lâmina preparada com 20 μ l da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 10 min, Cito-Spin), corada e observada em microscópio em objetiva de imersão (100x). Foram contadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares – mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

4.6.3.2 Avaliação da Capacidade Fagocítica

Para o ensaio de fagocitose os neutrófilos obtidos foram utilizados na concentração de $1,0 \times 10^6/\text{ml}$ e o zimosan sensibilizado (com plasma normal fresco) foi utilizado como partícula fagocítica. Foi pesado 0,014g de partículas de zimosan que foram diluídas em 50 mL de PBS1x. Desta suspensão foram pipetados 142 μl de plasma do próprio paciente em eppendorf e incubados durante 30 minutos em estufa de CO_2 a 5% a 37°C . A solução de células e partículas foi incubada em estufa de CO_2 a 5% a 37°C durante 60 minutos, posteriormente, as células foram citocentrifugadas e coradas (Figura 6). Foram contadas 100 neutrófilos em cada lâmina, com e sem fagocitose, como também o número de partículas fagocitadas. Os resultados foram expressos por meio do Índice Fagocítico (IF): $\text{IF} = \% \text{ neutrófilos em fagocitose} \times \text{número médio de partículas fagocitadas}$ (FERNANDES JUNIOR, 2006).

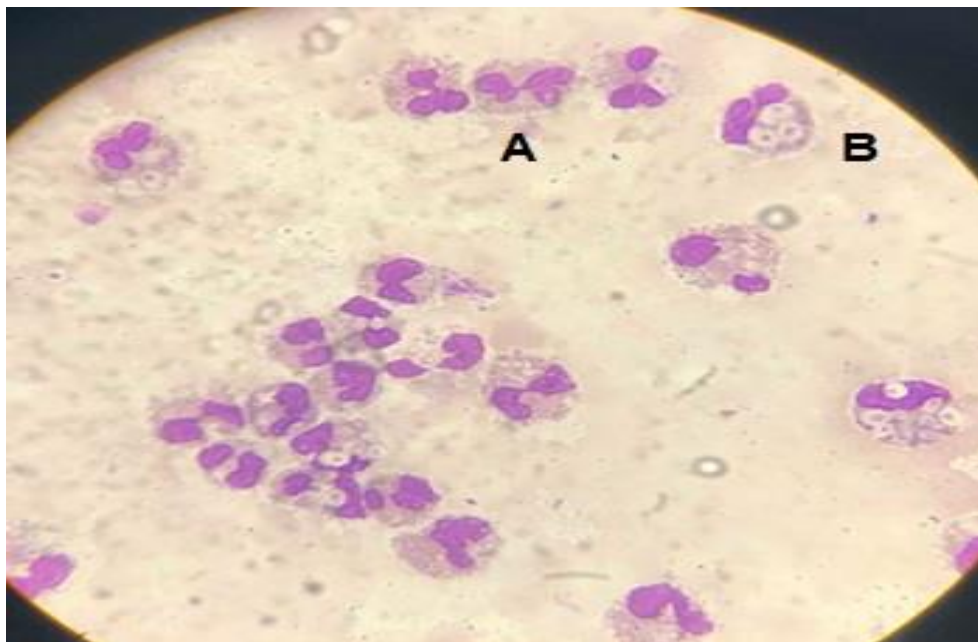


Figura 10: Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan (B). Coloração Leishman. Aumento 100x. Fonte: Autor.

4.6.4 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO

Para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos utilizou-se o teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) descrito por Hallett e Wilson (1973). O NBT é um composto solúvel de coloração amarela que, quando reduzido intracelularmente, é convertido em grânulos insolúveis de formazan de coloração preto-azulada. Em um recipiente de polipropileno adicionou-se 200 µl de sangue total e 200 µl de uma solução aquosa tamponada de NBT. Em seguida, colocou-se a tampa de polipropileno contendo a amostra ao centro de uma placa Petri com gaze umedecida ao redor (câmara úmida). Incubou-se a amostra em estufa de CO₂ a 5% a 37°C durante 25 minutos e posteriormente por 10 minutos na temperatura ambiente. Realizou-se a confecção do esfregaço sanguíneo em lâminas de microscopia utilizando o colorante de wright .

A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos, por meio da microscopia em objetiva de 100x com óleo de imersão. Será neutrófilo NBT positivo quando o mesmo apresentar qualquer grânulo intracitoplasmático de coloração azul a negro (formazan), independente de tamanho e número.

O fluxograma abaixo (figura 11) sintetiza o delineamento experimental desenvolvido nessa pesquisa.



Figura 11: Delineamento experimental.

4.7 Análise Estatística

Todos os dados obtidos nos grupos estudados foram comparados por meio de testes estatísticos através do programa GraphPad Prism 5.0 (USA), dependendo de sua distribuição. Os resultados foram expressos pela média±desvio padrão (DP). Utilizou-se o teste de Kolmogorov Smirnov para verificar a normalidade dos dados, e a comparação das médias entre os grupos foi feita pela análise da variância (ANOVA) seguida do pós-teste Tukey (para dados com distribuição normal). Para distribuição não gaussiana, foi utilizado o Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Em todas as análises efetuadas, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Nessa pesquisa foram utilizadas amostras de sangue de dois grupos experimentais:

- Um grupo controle (**Grupo A**) de indivíduos saudáveis (n=13) com média de idade (média±DP) 54,3±15,1 anos.

- Um grupo de pacientes (**Grupo B**) diagnosticados com LMC Ph¹ positiva (n=13) com média de idade (média±DP) 51,2±18,7 anos. Os grupos não apresentaram diferença estatística em relação à idade ($p=0,7527$), tabela 1.

Tabela 1 – Dados referentes a gênero, idade e etnia do grupo controle e dos pacientes em estudo

	Grupo A (n=13)	Grupo B (n=13)
Gênero		
Masculino	8	9
Feminino	5	4
Idade (anos)	54,3±15,1	51,2±18,7
Etnia		
Branco	3	3
Pardo	5	4
Negro	5	6

Grupo A, indivíduos saudáveis (controle); Grupo B, pacientes em estudo. Os valores de idade representam média e desvio-padrão.

5.2 Avaliação do Hemograma e Leucograma

Por meio do hemograma foram avaliados os parâmetros expostos na tabela 2. Não houve diferença estatística nos parâmetros de hemoglobina e hematócrito entre os grupos A e B. As plaquetas apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e B1 e entre os grupos B1 e B3, $p=0,0119$.

Os parâmetros de leucócitos, neutrófilos e linfócitos apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e B1, entre os grupos B1 e B2 e entre os grupos B1 e B3.

Tabela 2 – Dados hematológicos do grupo controle e dos pacientes em estudo na primeira, segunda e terceira coleta

	Grupo A (n=13)	Grupo B			<i>P</i> _{valor}
		Não Tratados	Tratados		
		Grupo B1 (No diagnóstico) (n=13)	Grupo B2 (Após 1 mês) (n=13)	Grupo B3 (Após 4 meses) (n=13)	
Hemoglobina (g/dL)	13±0,7	11,7±3	13,2±1,1	12,8±1,2	0,1454
Hematócrito (%)	40,3±1,8	38,2±17	40,4±2,8	40±3,4	0,9353
Plaquetas (mil/mm³)	243±51	438,2±225,2	298,6±228,4	197,9±68,7	*0,0119
Leucócitos (mil/mm³)	5,7±1,3	116±96,3	17,1±24,9	7,2±2,4	*0,0001
Neutrófilos (mil/mm³)	2,6±0,5	47,2±34,7	11,9±21	4,5±1,8	*0,0001
Linfócitos (mil/mm³)	2,2±0,5	11,5±9,8	2,6±1,2	2,1±0,9	*0,0001

Grupo A, indivíduos saudáveis (controle); Grupos B1, B2 e B3 pacientes em estudo na primeira, segunda e terceira coleta, respectivamente. Os valores apresentados representam média e desvio-padrão. $p < 0,05$ (Anova)

Mediante o leucograma foram avaliados parâmetros como a Relação neutrófilo/linfócito (RNL) e a presença ou não de neutrofilia nos pacientes em estudo (**Grupos B1, B2 e B3**). A análise da RNL mostrou que apenas 5/13 pacientes do **Grupo B1** apresentaram RNL ≥ 5 . Ao analisar a RNL nos pacientes que realizaram a segunda coleta (**Grupo B2**), observou-se que apenas 3/13 pacientes apresentaram RNL ≥ 5 . E todos os 13/13 pacientes do **Grupo B3** apresentaram RNL < 5 , conforme demonstra a figura 12.

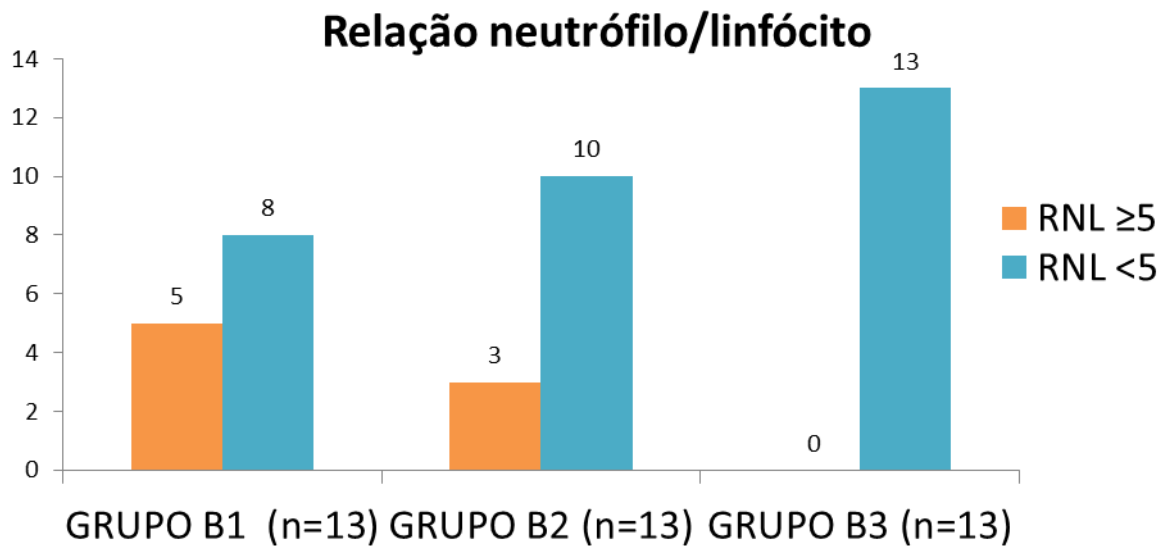


Figura 12: Relação neutrófilo-linfócito (RNL) em pacientes com LMC Ph¹ positiva na primeira coleta (Grupo B1), n=13; na segunda coleta (Grupo B2), n=13 e na terceira coleta (Grupo B3), n=13.

Admitindo-se neutrofilia como número absoluto de neutrófilos $\geq 6.500/\text{mm}^3$, de acordo com o protocolo utilizado pela clínica médica do hospital Ophir Loyola, 12/13 pacientes que realizaram a primeira coleta (**Grupo B1**) apresentavam neutrofilia. Dos pacientes que realizaram a segunda coleta (**Grupo B2**), apenas 5/13 apresentavam neutrofilia e dos pacientes que realizaram a terceira coleta (**Grupo B3**), 12/13 apresentavam valores de neutrófilos dentro dos parâmetros de referência (figura 14).

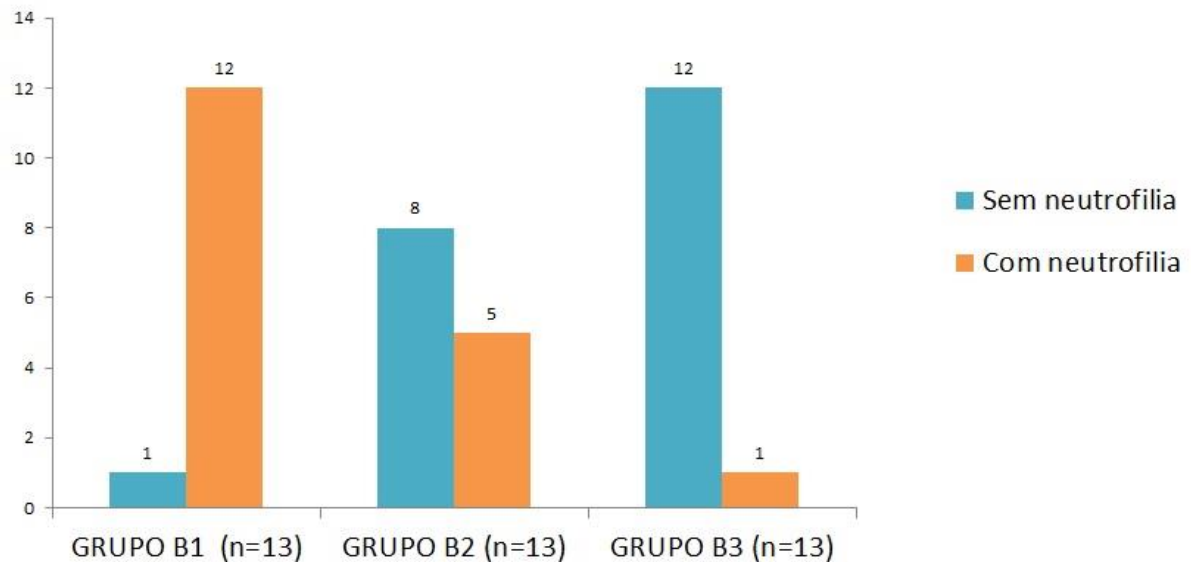


Figura 13: Presença ou não de neutrofilia em pacientes com LMC Ph¹ positiva na primeira coleta (Grupo B1), n=13; na segunda coleta (Grupo B2), n=13 e na terceira coleta (Grupo B3), n=13.

5.3 Avaliação da Função Fagocítica

A avaliação da função fagocítica demonstrou diferença estatística quando comparado o grupo controle (**Grupo A**) com os grupos de estudo na primeira, segunda e terceira coleta (**Grupo B1, B2 e B3**), $p=0,0001$.

Os grupos **B1, B2 e B3** apresentaram menores IFs com $2,07\pm 0,5$; $1,99\pm 0,4$ e $1,97\pm 0,6$ respectivamente, em relação ao **Grupo A** com $3,72\pm 0,8$.

Não foi observada diferença estatística entre os Grupos **B1, B2 e B3**, $p=0,9148$.

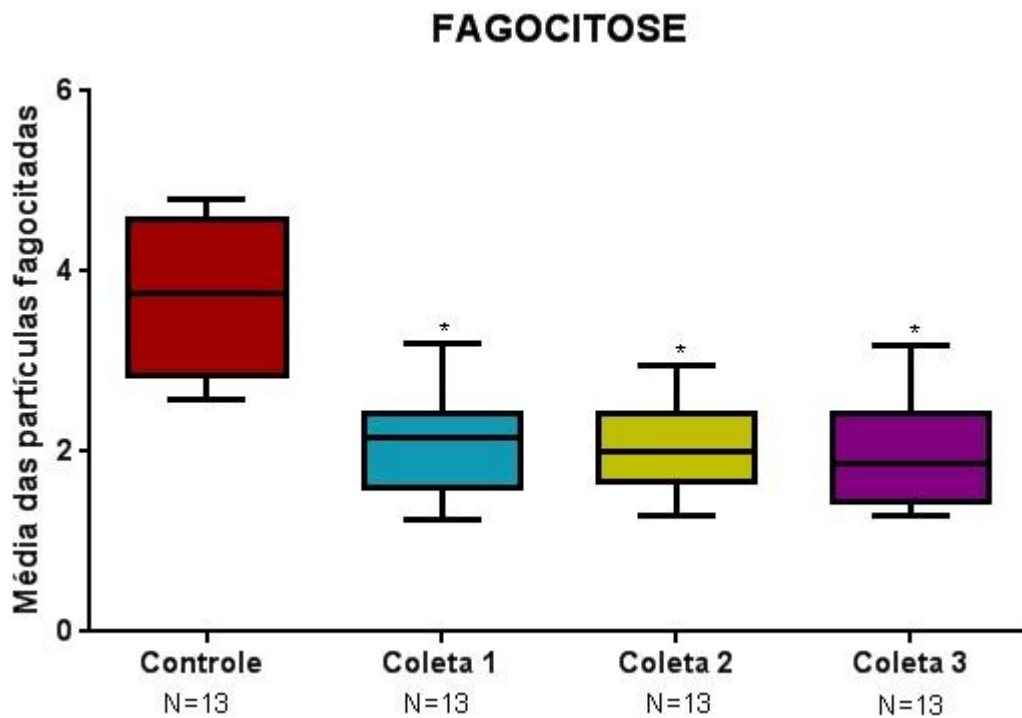


Figura 14: Capacidade fagocítica *in vitro* do grupo controle (Grupo A), n=13 e dos pacientes em estudo na primeira coleta (Grupo B1), n=13; na segunda coleta (Grupo B2), n=13 e na terceira coleta (Grupo B3), n=13. $p < 0,05$ (Anova)

5.4 Avaliação do metabolismo oxidativo

O neutrófilo foi considerado NBT-positivo quando apresentou qualquer grânulo intracitoplasmático de coloração azul a negro, independente do número e tamanho, desde que estes fossem claramente diferenciados das granulações tóxicas e corpúsculos de Döhle. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos. Conforme Pasternak et al. (1974), o valor de referência individual considerado normal é entre 2% a 17%. Não houve diferença estatística quanto à ativação do metabolismo oxidativo na prova de redução do NBT entre o grupo controle (**Grupo A**) com $6,38\% \pm 2,1$ e os grupos de estudo na primeira, segunda e terceira coleta (**Grupos B1, B2 e B3**) com $6,69\% \pm 2,7$; $5,07\% \pm 2,6$ e $5,2\% \pm 2,6$ respectivamente, $p=0,2997$.

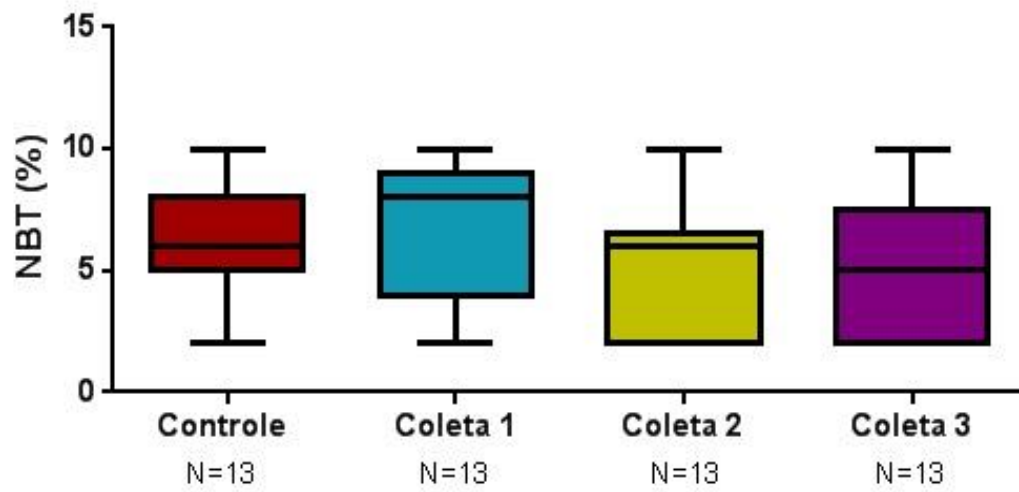


Figura 15: Percentual de neutrófilos NBT positivos do grupo controle (Grupo A), n=13 e dos pacientes em estudo na primeira coleta (Grupo B1), n=13; na segunda coleta (Grupo B2), n=13 e na terceira coleta (Grupo B3), n=13. $p < 0,05$ (Anova)

6 DISCUSSÃO

A LMC atinge todas as faixas etárias, até mesmo crianças. Todavia possui uma incidência entre 45 e 55 anos de idade e em até 15% dos casos em indivíduos a partir de 60 anos (WILLIAMS, 2006). Com relação às características da amostra do presente estudo, a média de idade dos pacientes foi de 51 anos e se revelou dentro da faixa de incidência quando comparada a bibliografia relacionada. Ademais, outras publicações indicam a existência de um predomínio no gênero masculino em relação ao feminino (ANGELIS et al., 2012; HOLMES JR et al., 2012; ZHANG & ZHU, 2012). Esse predomínio também foi observado na população de pacientes com LMC recém-diagnosticados.

O diagnóstico de LMC é realizado considerando aspectos clínicos, citogenéticos e hematológicos. Dentre os métodos essenciais para o diagnóstico estão o hemograma, leucograma, mielograma, além das análises citogenéticas e moleculares. O hemograma é uma ferramenta importante para triar casos novos, principalmente em pacientes assintomáticos. Aumento da contagem de neutrófilos com aumento de basófilos e presença de células imaturas são algumas alterações que podem ser observadas no exame destes pacientes (SOSSELA, ZOPPAS, WEBER, 2017).

Na avaliação do hemograma e leucograma, os pacientes sem tratamento apresentavam leucocitose entre $20.000/\text{mm}^3$ e $400.000/\text{mm}^3$ de leucócitos. Estes dados estão de acordo com as informações citadas por ANUNCIÇÃO et al. (2008), que afirmam que a leucocitose com desvio a esquerda no sangue periférico configura a característica laboratorial mais importante na fase crônica da LMC.

As plaquetas do hemograma referente ao diagnóstico também foram analisadas. As mesmas se apresentaram aumentadas em número (plaquetose) em 38,5% dos pacientes. A maior parte dos indivíduos (61,5%) apresentou uma contagem normal de plaquetas, entre $150.000/\text{mm}^3$ e $450.000/\text{mm}^3$ e, nenhum paciente apresentou trombocitopenia. Os resultados obtidos também estão em conformidade com os encontrados por PASQUINI et al. (2001) e GUIMARÃES et al. (2006), que afirmam que a contagem de plaquetas é normal ou aumentada em 30%

a 50% dos casos, enquanto a trombocitopenia está presente em menos de 10% dos casos.

Na avaliação do sucesso terapêutico com inibidores de TK, o tratamento da LMC visa obter uma resposta hematológica seguida por uma resposta citogenética, baseada na quimioterapia mielossupressora. A resposta hematológica é caracterizada por uma redução na contagem absoluta de leucócitos, eliminação de células mielóides imaturas do sangue periférico e erradicação de sinais e sintomas da doença (MARTINS et al., 2011). Logo, a resposta hematológica completa é definida pelos seguintes critérios: plaquetas \leq 450 mil, leucócitos \leq 10.000, com diferencial normal, basófilos menor que 5% e ausência de esplenomegalia (BOLLMANN, GIGLIO, 2011).

Nota-se que ao avaliar os pacientes com LMC após o início do tratamento com MI, o número de leucócitos, neutrófilos e plaquetas começou a reduzir, demonstrando o potencial efeito do MI na resposta hematológica à LMC, reduzindo assim, o processo proliferativo. Isso é esperado, visto que o MI induz à parada da proliferação, inibe c-kit (ou CD 117) que se trata de um receptor de células primordiais. Somado a isto, inibe também o receptor do fator de crescimento plaquetário (PDGF) (LYSENG-WILLIAMSON & JARVIS, 2001; GRANDO et al., 2008).

A análise do valor absoluto das células leucocitárias como os neutrófilos e linfócitos é voltada para avaliar o estado imunológico do paciente, assim como observar possível toxicidade hematológica devido ao tratamento (CRUVINEL et al., 2010). Esses valores são analisados para manter ou suspender a quimioterapia empregada de acordo com a resposta hematológica proporcionada (MÉLO, 2012). Diversos estudos têm demonstrado que o número absoluto de neutrófilos e linfócitos são importantes para o prognóstico e estadiamento da doença (GOLDSTEIN et al., 2015; VALPIONE et al., 2015; FARIA, 2016). Os neutrófilos circulantes contêm e segregam o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), um fator pró-angiogênico que favorece a sobrevivência de células tumorais, indicando maior possibilidade de recidiva (WALSH et al., 2005).

A relação neutrófilo/linfócito (RNL) é considerada um teste preditor de prognóstico validados em alguns tipos de câncer, pode prever a evolução de várias

neoplasias malignas e é recomendado como uma ferramenta auxiliar na definição quanto à escolha do tratamento adjuvante (McMILLAN, 2009). WALSH et al. (2005), estudando 230 pacientes com câncer, demonstraram menor sobrevida e menor tempo livre de doença (aumento de recidiva) nos enfermos com RNL maior ou igual a cinco. Em nossos estudos, após o início do tratamento com MI todos os pacientes apresentavam RNL menor que cinco, sugerindo um aumento na taxa de sobrevida.

A diferenciação celular é o processo altamente regulado pelo qual as células assumem funções e morfologias especializadas e geralmente envolve uma mudança de uma célula progenitora primitiva para uma célula madura capaz de funcionar efetivamente (SOARES, 2009). O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e seu receptor (G-CSFR) são de importância crucial para a diferenciação de precursores mielóides em granulócitos maduros (SCHUSTER et al., 2003). Foi demonstrado que o MI pode afetar a função de células normais e não malignas, resultando em mielossupressão nos pacientes tratados, além de poder afetar a mobilização, proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas (APPEL, BALABANOV, BROSSART, 2006).

Nesta perspectiva, com o intuito de avaliar se o MI altera não somente a quantidade, mas também a qualidade dos neutrófilos, neste estudo foram realizados os ensaios de fagocitose e o teste de NBT. Ao avaliar a atividade fagocítica dos neutrófilos, observou-se que os pacientes sem tratamento apresentaram menor IF em relação ao grupo controle. Da mesma forma, o estudo de AJDARY et al. (2002) mostrou que a função fagocítica dos neutrófilos estava prejudicada em 21 pacientes com LMC na fase crônica. Isso significa que mesmo o paciente possuindo inúmeras células do processo proliferativo, estas células estão com as suas funções diminuídas. Os pacientes tratados com MI também apresentaram menor IF em relação ao grupo controle. Logo, ainda que o número de leucócitos e neutrófilos tenha reduzido, sugere-se que o MI não melhorou a função fagocítica do neutrófilo, visto que a capacidade fagocítica desta célula manteve-se diminuída.

DEWAR et al. (2003) constataram *in vitro* a partir de progenitores normais da medula óssea que o MI inibe significativamente a maturação de monócitos / macrófagos, caracterizado pela produção reduzida de citocinas após estimulação com lipopolissacarídeo, bem como capacidade fagocítica reduzida após estimulação

com M-CSF e GM-CSF. Logo, o MI pode ter uma atividade inibitória para quinases que desempenham um papel na diferenciação destas células. Essa inibição do desenvolvimento normal dos fagócitos foi observada em concentrações de MI alcançáveis farmacologicamente. Estes autores também observaram que apesar de menos expressivo o MI reduziu a formação de colônias e o desenvolvimento de neutrófilos e eosinófilos, fato este que pode estar associado à diminuição da função fagocítica encontrada em nossos resultados pela inibição específica do MI da via de transdução de sinal do G-CSF.

Com o propósito de complementar os ensaios de fagocitose, realizou-se o teste do NBT. Por meio desse teste é possível verificar se o sistema NADPH oxidase inicia um processo chamado de explosão respiratória. Uma vez estimulados, os neutrófilos manifestam um aumento do consumo de oxigênio, fazendo com que esse mecanismo produza grandes quantidades de superóxido e peróxido de hidrogênio, demonstrando grande relevância para a função bactericida dos neutrófilos (ZINKL e KABBUR 1997; AFONSO et al., 2002). Semelhante aos achados de AHMED (2013), nossos resultados mostraram que não houve diferença estatística entre o grupo A e o grupo B. Isso significa que a produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase não apresenta alteração independente do tratamento com MI (AFONSO et al., 2002).

7 CONCLUSÃO

- Houve redução da quantidade de neutrófilos circulantes após o início do tratamento com MI.
- A função fagocítica dos neutrófilos manteve-se diminuída após o início do tratamento com MI;
- A produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase não apresenta alteração independente do tratamento com MI.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PODER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. c. 17, p. 354-368, 1995.
- ADVANI, A. S.; PENDERGAST, A. M. Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. **Leukemia Research** 2002; 26(8): 713-720.
- AFONSO, J.A.B.; CIARLINI, P.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; et al. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. **Pesq. Vet. Bras**, v. 22, n. 4, p.129-134, out/dez. 2002.
- AHMED, A. A. Neutrophils phagocytic function in chronic myelogenous leukemia after imatinib mesylate therapy. **Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics**, p. 65-71, 2013.
- AJDARY, S. et al. Function of neutrophils in different phases of chronic myelogenous leukemia. **Iranian Biochemical Journal**, v. 6, n.2, p. 83-88, 2002.
- ALMEIDA, A. et al. Recomendações para o diagnóstico, tratamento e monitorização da Leucemia Mielóide Crônica. **Acta Med Port**. Lisboa, v. 22, n. 5, p. 537-544, 2009.
- ALMEIDA, C. B. et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2879-2888, 2012.
- ANGELIS, C.D. et al. The Experience in Nicaragua: Childhood Leukemia in Low Income Countries—The Main Cause of Late Diagnosis May Be “Medical Delay”. **International Journal of Pediatrics**, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijped/2012/129707/>>. Acesso em: 13 maio 2018.
- ANUNCIAÇÃO, S. F. da. et al. Aspectos diagnósticos da leucemia mielóide crônica e detecção de doença residual mínima. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 11/12, p. 1069-1083, nov./dez. 2008.
- APPEL, S.; BALABANOV, S.; BROSSART, P. Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. **Stem Cells**, v. 23, p. 1082-1088, 2006.
- BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. **Blood**. v. 122, n. 6, p. 872-884, 2013.
- BANDEIRA, D. M. A.; MELO, M. C.; FREIRE, C. J.; CHEE, H. C. Análise do perfil epidemiológico dos pacientes com leucemia mielóide crônica do hospital

universitário Prof. Alberto Antunes no período de 1996 a 2005. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 28, n.2, 2006.

BAIN, B.J. **Células sanguíneas: Um guia prático.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 369-370, 2004.

_____. Diagnosis from the blood smear. **N Engl J Med.** v. 353, n. 5, p. 498-507, 2005.

_____. **Células Sanguíneas: Um Guia Prático.** 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 488, 2007.

BALL, C. J; KING, M. R. Role of c-Abl in L-selectin shedding from the neutrophil surface. **Blood cells, molecules & diseases.** v. 46, n. 3, p. 246-251, 2011.

BEN-NERIAH, Y. et al. The chronic myelogenous leukemia-specific p210 protein is the product of BCR-ABL hybrid gene. **Science,** Washington, v. 233, n. 4760, p. 212-214, 1986.

BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 27, n. 2, p. 120-125, 2005.

BOLLMANN, P. W.; del GIGLIO, A. Leucemia mielóide crônica: passado, presente, futuro. **Einstein.** v. 9, n. 2, p. 236-43, 2011.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 30, n. 1, p. 3-7, 2008.

BRANFORD, S.; HUGHES, T. Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate. **Methods Mol Med,** v. 125, p. 93-106, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Leucemia. Brasília: MS, 2018.

Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao++>. Acesso em: set, 2018.

CASTRO, M. A.; CASTRO, M. A.; PELEJA, S. B.; BARBOSA, A. P.; TAVARES, A.P.; ROBERTI, M. R. Ocorrência de Múltiplas Neoplasias em Paciente Portador de Leucemia Mielóide Crônica: Relato de Caso. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 58, n. 2, p. 251-55, 2012.

CAVALCANTE JUNIOR, G. B. **Expressão da molécula de adesão CD44 nas leucemias linfóides agudas.** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação swaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1995.

CORTES, J. E. et al. Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era. An evaluation of the World Health Organization proposal. **Cancer**. v. 106, n. 6, p. 1306-15, 2006.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. **Semin Hematol**. v. 40, n. 1, p. 79-86, 2003.

_____. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 18, n. 3, p. 569-84, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. In: Robbins-Pathologic Basis of Disease. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora WB **Saunders Company**. c. 14, p. 629-672, 1994.

CHAUFFAILLE, M. de. L. L. F. Leucemia mielóide crônica: tratamento baseado em evidências. **Diagn Tratamento**. v. 14, n. 2, p. 62-5, 2009.

CHOPRA, R.; PU, Q.Q.; ELEFANTY, A. G. Biology of BCR-AB. **Blood**. v.13, p.211-29, 1999.

CLARKSON, B. D.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEK, C.; CARPINO, N. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. **Leukemia**, v. 11, p.1404-1411, 1997.

CRUVINEL. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

D'ANTONIO, J. Chronic myelogenous leukemia. **Clin J Oncol Nurs**, v. 9, n. 5, p. 535-8, 2005.

DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." **Blood**. v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DEWAR, A.L. et al. Imatinib inhibits the in vitro development of the monocyte/macrophage lineage from normal human bone marrow progenitors. **Leukemia**, v.17, p. 1713-1721, 2003.

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lesson learned from the development of a tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 105, n.1, 2000.

EBSTEIN, W. Veber die acute leukämie and pseudoleukämie, Dtsch. Arch Klin Med; 1889; v.44, p.343. In: LITCHMAN, M. A. **Acute myelogenous leukemia**. New York: McGraw-Hill. Inc, 1995.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M. Mechanisms of disease: the biology of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.

FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; O'BRIEN, S. New treatment approaches for chronic myelogenous leucemia. **Seminars in Oncology**. v. 27, p. 578-86, 2000.

FARIA, S.S. **Relação neutrófilo/linfócito como ferramenta prognóstica em pacientes com câncer de mama**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**. v. 5, p. 1317–1327, 2003.

FERNANDES JÚNIOR, P. C. **Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasia pré-invasiva e invasiva de colo uterino**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2006.

GEARY, C. G. The story of chronic myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**. v. 110, p. 2-11, 2000.

GOLDMAN, J.M. Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leucemia. **Lancet**. v. 355, p. 1031-32, 2000.

GOLDMAN, J.M.; DRUKER, B. J. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. **Blood**. v. 98, p. 2039-2042, 2001.

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. **N. Engl. J. Med.** v. 349, n. 15, p. 1451-64, 2003.

GOUVEIA, M. E. **Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na Leucemia Mielóide Crônica** (Dissertação) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

GRANDO, A. C. et al. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por *Real-Time* PCR. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 6, p. 433-440, 2008.

GRATWOHL, A.; HERMANS, J. NIEDERWIESER, D. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. **Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplant**. v. 12, p. 509-516, 1993.

GREAVES, M. F. Biology of Leukemia: an overview. In: Henderson E, Lister T and Greaves M. **Leukemia**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, cap. 2, 2002.

HALLETT, W.J.; WILSON, J.W.; Nitroblue Tetrazolium Reduction by Neutrophils in Experimental Hemorrhagic Shock. **American Journal of Pathology**, v.73, n.1, p. 173-180, 1973.

HAHN, E. A.; GLENDENNING, G. A. Quality of life on imatinib. **Seminars in Hematology**. v. 40, p. 31-36, 2003.

HEHLMANN, R. et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. **Blood**. v. 82, p. 398-407, 1993.

HOLLAND, J. et al. **Cancer medicine**. Hamilton: BC Decker, p. 2400, 2003.

HOLMES, J. R. L. et al. Sex Variability in Pediatric Leukemia Survival: Large Cohort Evidence. **ISRN Oncology**. 2012. Disponível em: <<http://www.isrn.com/journals/oncology/2012/439070/>>. Acesso em: 13 maio 2018.

HUNTLY, B. J. P. et al. Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. **Blood**. v. 98, p. 1732-38, 2001.

HUNTLY, B.; GILLILAND, G. D. Pathobiology of acute myeloid leukemia. In: HOFFMAN, R. et al. Hematology: basic principles and practice. 4. ed. Philadelphia: **Elsevier** Churchill Livingstone, 2005. Cap. 59, p. 1057-1070.

JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MITELMAN, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. **Acta Haematol**. v. 107, n. 2, p. 76-94, 2002.

KANTARJIAN, H. M. et al. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 12, p. 31-80, 1999.

KEATING, M. J.; KANTARJIAN, H. Leucemias crônicas. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. (Org.). *Cecil: tratado de medicina interna*. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 1331-1336, 2005.

KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M.; DRUKER, B.J.; TALPAZ, M. Philadelphia

chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann. Intern. Med.**, v. 138, n. 10, p. 819-830, 2003.

LANGE, R.; MOLONEY, W.; YAMAWAKI, T. Leukemia in atomic bomb survivors: general observations. **Blood**, Duluth, v. 9, p. 574, 1954.

LINDAUER M.; FISCHER, T. H. Interferon-r combined with cytarabine in chronic myelogenous leukemia – clinical benefits. **Leukemia and Lymphoma**, Chur, v. 41, n, 5-6, p. 523-533, 2001.

LICHTMAN, M. A. & LIESVELD, J. L. Chronic myeloid leukemia and related disorders. In: Beutler, E; Lichtman, M.A.; Coller, B.S.; Kipps, T.J; Seligsohn, U. – **Hematology**. 6th. New York: McGraw-Hill, p. 1085, 2001.

LYSENG-WILLIAMSON, K.; JARVIS, B. Imatinib. **Adis New Drug Profile**. v. 61, p. 1765-74, 2001.

LORAND-METZE, I. et al. Fatores que influem na resposta citogenética com o uso do imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica. **Rev. bras. hematol. hemoter**. v. 27, n. 2, p. 365, 2005.

MARTINS, D. H. et al. Monitoring imatinib plasma concentrations in chronic myeloid leukemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 33, n. 4, p. 302-306, 2011.

MAURO, M. J. et al. STI-571: A paradigm of new agents for cancer therapeutics. **Journal of Clinical Oncology**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 325-334, 2002.

MELO, J.V.; BARNES, D.J. Chronic myeloid leukemia: biology of advanced phase. In: **Myeloproliferative Disorders**. Springer Berlin Heidelberg, New York, p. 37–59, 2007.

MÉLO, F. M. L. **Aspectos hematológicos e clínicos de crianças leucêmicas no período de indução de quimioterapia**. 2012. 96f. Dissertação (mestrado) – UFPA/FIOCRUZ, Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, 2012.

MOREIRA, R. B.; BOECHAT, L. Proposta de acompanhamento farmacoterapêutico em leucemia mielóide crônica: modelo de abordagem metodológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 4, p. 375-378, 2009.

McMILLIAN, D. C. Systemic inflammation, nutritional status e survival in patients with cancer. **Current Opinion in Clinical Nutritional e Metabolic Care**, v. 12, n.3, p.223-226, 2009.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Chronic Myelogenous Leukemia Version I. 2015.

NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science**, Washington, v. 132, p. 1947, 1960.

O'DAWYER, M. E. et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (ST571) in accelerated phase CM. **Blood**, v. 100, p. 1628-1633, 2002.

OLIVEIRA, C.R.A. **Avaliação prospectiva das atividades fagocitária e quimiotática de neutrófilos humanos quando submetidos ao plasma de pacientes sépticos**. 2012. 75f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) -- Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

OSAROGIAGBON, U. R.; McGLAVE, P. B. Chronic myelogenous leukemia. **Current Opinion in hematology**, v. 6, p. 241-246, 1999.

PASQUINI, R.; ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P. **Hematologia – Fundamentos e Práticas**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

PEDROSA, A. M. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiureia**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PESSOA, A. S. **Apocinina versus Diapocinina como inibidor da Produção de Peróxido de Hidrogênio e Ácido Hipocloroso por Neutrófilos Ativados**. 2009. 56 f. Monografia (Graduação em Departamento de Química). Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2009.

PONTES, A. S. **Efeito da L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* na função de neutrófilos**. 2016. 80f. Tese (Doutorado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.

REDAELLI, A. et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. **Expert Ver Anticancer Ther**, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2004.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, p. 290-293, 1973.

SANTOS, I.L.; FERREIRA, R.J. Aspectos biológicos, genéticos e moleculares do gene bcr-abl e sua relação com a leucemogênese. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 55-59, jan./abr., 2006.

SAVAGE, D. G.; ANTMAN, K. H. Imatinib-a new oral target therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 683-693, 2002.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v. 340, p. 1330-1338, 1999.

SAWYERS, C.L. Efficacy and safety of specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med**, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

SEUÁNEZ, H. N. et al. Métodos moleculares de diagnóstico. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, p.13-27, 2004.

SOARES, P. de. B. **Avaliação do potencial mielossupressor do mesilato de imatinibe sobre células progenitoras hematopoiéticas e células do estroma da medula óssea de camundongos**. 2009. 120 f Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

SOUZA, C. A. Leucemia mielóide crônica – novas drogas em desenvolvimento. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 30, n. 1, p. 32-36, 2008.

SOSSELA, F. R.; ZOPPAS, B. C. A.; WEBER, L. P. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. **RBAC**, v. 49, n. 2, p. 127-30, 2017.

SUREDA, A. et al. Imatinib mesylate as treatment of blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. **Haematologica**, v. 88, p. 1213-1220, 2003.

SUZANA, F. da. A. et al. Aspectos diagnósticos da leukemia mielóide crônica e detecção de doença residual mínima. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 11/12, p. 1069-1083, nov./dez. 2008.

SCHUSTER, et al. The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 655-663, 2003.

SPIERS, A. S. D.; BAIN, B. J.; TURNER, J. E. The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. **Scand. J. Haematol**, v. 18, p.25-38, 1997.

STOCK, W.; THIRMAN, M. J. Pathobiology of acute myelogenous leucemia. In: Hoffman R, Benz Jr, E, Shattil S. **Hematology: basic principles and practice**. 3. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, Cap.52, 2000.

STONE, R. M. Optimizing treatment of chronic myeloid leukemia: a rational approach. **The Oncologist**, v. 9, p. 259-270, 2004.

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC Press, 2008.

TALPAZ, M. et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, Duluth, v. 62, n. 3, p. 689-692, 1983.

THIELE, J.; KVASNICKA, H. M. A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders. **Leuk Lymphoma**, v. 47, n. 3, p. 381-96, 2006.

VERFAILLIE, C. M. Chronic myelogenous leukemia: from pathogenesis to therapy. **J. Hemotherapy**, v. 8, p. 3-21, 1999.

VITAL, D.M. **Efeito da hidroxureia na adesão *in vitro* de neutrófilos, sob condições inflamatórias**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

WALSH, S. R. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v. 91, n. 3, p.181-4, 2005.

WETZLER, M.; BYRD, J. C.; BLOOMFIELD, C. D. Acute and Chronic Myeloid Leukemia. In: Kasper DL; Fauci MS; Longo DL; Braunwald M; Hauser ; Jameson JL, editors. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 16 ed. United States of America: McGraw-Hill Companies, p. 631-41, 2005.

WILLIAMS et al. **Manual of Hematology**. 7ª ed. – São Paulo: McGraw-Hill Companies, 2006.

ZHANG, L.; ZHU, X. Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia in Children: the Experience in China. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4 n. 1, 2012.

ANEXO A



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Baseado na Resolução No 466/12 do Conselho Nacional de Saúde)

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa coordenada pela Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro, Professora e pesquisadora da Universidade Federal do Pará. Para poder participar é necessário que você leia este documento com atenção, pois ele pode conter palavras que você não entenda. Caso isso aconteça, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente. O Título do estudo é Avaliação da função dos Neutrófilos Circulantes em Pacientes com Neoplasias Hematológicas Malignas. Mais claramente falando tem por objetivo, avaliar a função das suas células de defesa, chamadas de neutrófilos, que são aquelas células responsáveis por matar as bactérias no seu organismo. Serão realizados testes para avaliar a função dessas células, como quimiotaxia, fagocitose e a quantificação das citocinas que os mesmos apresentam para saber se a patologia está interferindo nessas funções celulares, ou seja, são testes específicos para avaliar se a célula está em bom funcionamento.

Para isso, apenas seu sangue será coletado. O método inclui o uso de seringa descartável, para coleta de sangue por punção venosa, para a realização de exames, que servirá para avaliação dessas células no Laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Pará.

Riscos: Com relação aos riscos, é importante lembrar que os riscos serão mínimos em relação à coleta de sangue, e que serão inerentes a vida cotidiana, relacionado à possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente. Alguns riscos conhecidos, embora raros, estão associados à colocação de uma agulha na veia. Entre esses riscos estão: desconforto, a possibilidade de infecção

(que é mínima uma vez que são usadas agulhas estéreis e descartáveis), além de hematoma ou inchaço temporário. Caso tenha a presença de algum desses danos decorrente da pesquisa, o participante terá direito a indenização.

Benefícios: Conhecimento das suas funções celulares, como a fagocitose que é o ato da célula em matar a bactéria, metodologia esta, que não está inserida na rotina de exames para o diagnóstico da doença acima referida e todos os resultados estarão disponíveis para o participante. Importante destacar que todo material biológico coletado será usado apenas para esta pesquisa.

A identidade dos pacientes será preservada, sendo-lhes atribuído um número, e somente o aluno e o pesquisador principal terão conhecimento das mesmas.

Sua participação é voluntária, não havendo nenhuma forma de pagamento nem custos por sua participação. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento sem penalização ou prejuízo de seu tratamento.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento. Concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados apenas para o propósito acima descrito.

Belém, _____ de _____ de _____

ASSINATURA E IDADE DO PACIENTE

Carolina H. M. Azevedo (pesquisador responsável e coordenadora da pesquisa)-
Universidade Federal do Pará- Faculdade de Farmácia- fone: 32017201

Thiago Xavier Carneiro (vice-coordenador da pesquisa)- Médico Hematologista do Hospital
Ophir Loyola- fone: 992879292

David Wendell Isacksson Damasceno – Mestrando - Universidade Federal do Pará -
Faculdade de Farmácia - fone: 981236002

*Hospital Universitário João de Barros Barreto-HUJBB - rua dos Mundurucus, 4487, 1º Andar, Fone:
32016754*

ANEXO B**FICHA CLÍNICA DE PACIENTES****➤ PROTOCOLO LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

DATA DIAGNOSTICO: ___ / ___ / ___

Nº PRONTUÁRIO: _____

 1ª Coleta 2ª Coleta

1. Nome do paciente: _____

2. Data de Nascimento: ___/___/___

3. Idade: _____

4. Sexo:

 Masculino Feminino

5. Raça: _____

6. Ocupação: _____

7. Data de início da glivec: ___/___/___

8. Hemograma diagnostico/atual: Hb _____ Ht _____ Leuco: _____

Seg (Absoluto): _____ Seg(%): _____ Plaquetas: _____

Linf (Absoluto): _____ Linf (%): _____

9. Endereço: _____

10. Telefone: _____

11. Uso de outras medicações: _____

12. Outra doença: _____

13. Infecção recente: _____

14. Usou antibiótico? Qual? _____

15. Sente coceira/prurido: _____

16. Retorno: _____