



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

ÉRICA DOS SANTOS SARGES

**AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM  
PACIENTES COM NEOPLASIAS  
MIELOPROLIFERATIVAS *PHILADELPHIA* NEGATIVAS  
EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Belém – PA  
2018

ÉRICA DOS SANTOS SARGES

**AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM  
PACIENTES COM NEOPLASIAS  
MIELOPROLIFERATIVAS *PHILADELPHIA* NEGATIVAS  
EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro.

Belém – PA  
2018

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

---

- S245a Sarges, Érica dos Santos  
ÁVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM NEOPLASIAS  
MIELOPROLIFERATIVAS PHILADELPHIA NEGATIVAS EM TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO /  
Érica dos Santos Sarges. — 2018  
LXIV, 64 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF),  
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro
1. Neoplasias mieloproliferativas. 2. Policitemia Vera. 3. Trombocitemia Essencial. 4.  
Neutrófilos . 5. Hidroxiureia. I. Ribeiro, Carolina Heitmann Mares Azevedo , *orient.* II. Título
- 

CDD 616.99419

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Érica dos Santos Sarges

Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas *philadelphia* negativas em tratamento quimioterápico.

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

---

\_\_\_ Profa. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro (Orientadora)  
Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA

---

\_\_\_ Prof. Dra. 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  
2018

## DEDICATÓRIA

Ao meu Deus por toda a graça derramada em minha vida;  
Ao meu esposo Reinaldo pelo amor e apoio incondicional;  
À minha família por ter me proporcionado em todo tempo o suporte para chegar aonde cheguei, Cleide Melo e Ane Sarges obrigada;  
Aos meus avôs por toda oração e palavras de ânimo;  
Ao meu sogro e minha sogra por toda ajuda durante esse processo;  
À minha Orientadora pela oportunidade concedida, por todo o processo de amadurecimento científico e profissional e por mostrar que eu sou capaz;  
A todos os meus amigos que sempre estiveram na torcida;  
Aos meus amigos/irmãos do laboratório Gabriela, Renaira, Raquel, David, Cleideane, Larissa, Ariane e Angêlica, pois sem a ajuda de cada um deles não seria possível concluir esta etapa.

## EPÍGRAFE

“Melhor é o fim das coisas do que seu início”.

(Rei Salomão)

## RESUMO

E-SARGES. S. Avaliação de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasias mieloproliferativas *philadelphia* negativas em tratamento quimioterápico. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) *philadelphia* ( $Ph^1$ ) negativas são um grupo de doenças das células sanguíneas mielóides que surgem a partir de uma alteração na célula-tronco hematopoiética. As mais clássicas são Policitemia vera (PV) e Trombocitemia essencial. As NMPs  $Ph^1$  negativas apresentam um curso clínico prolongado e de comportamento relativamente benigno, mas que não tem cura. A quimioterapia citorrredutora atua não somente nos eritrócitos e megacariócitos, mas também tem sua ação nos leucócitos, especificamente nos neutrófilos. Uma das terapias empregadas é a Hidroxiureia (HU), que apresenta como um dos seus efeitos colaterais a neutropenia, estudos mostram que esse medicamento pode ter efeitos diretos nos neutrófilos. A identificação de possíveis alterações quantitativamente e qualitativamente de neutrófilos sob efeitos da quimioterapia citorrredutora em pacientes com NMPs  $Ph^1$  negativas representa um avanço na compreensão do tratamento nestas NMPs. Hemograma e leucograma fazem parte do protocolo de acompanhamento do tratamento. Para avaliar qualitativamente algumas funções os neutrófilos foram sensibilizados com zimosan, estimulando assim a fagocitose, em relação ao metabolismo, foi feito o teste citoquímico de redução espontânea do tetrazólio nitroazul (NBT), além de quantificação de mieloperoxidase (MPO) através da citometria de fluxo. Neste estudo foram realizadas todas as metodologias citadas anteriormente para avaliação quantitativamente e qualitativamente em amostras de sangue de 46 pacientes (PV=17; TE=29). Os pacientes portadores de PV apresentaram menor IF que os indivíduos do grupo controle, com  $p=0,0002$  ( $2.83\pm 1,28$ ;  $3.83\pm 1,38$  respectivamente). O mesmo foi observado nos pacientes com TE que apresentaram menor índice que os indivíduos controles com  $p=0,0002$  ( $2.85\pm 1,34$ ;  $3.83\pm 1,38$  respectivamente). Nossos resultados mostraram que não houve diferença quanto à ativação do metabolismo oxidativo na prova de redução do NBT, entre o grupo controle com o grupo PV em uso de HU, com  $p=0,9047$  ( $5\pm 2,7$ ;  $2,9\pm 3,5$  respectivamente) e grupo controle com grupo TE em uso de HU, apresentando  $p=0,2870$  ( $5\pm 2,7$ ;  $5\pm 6,9$  respectivamente). O teste de MPO foi realizado todos os pacientes com NMPs que estavam sob regime do tratamento com HU. Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre o grupo controle e os pacientes do grupo com PV, com  $p=0,8438$  ( $98,47\pm 1,15$ ;  $98,54\pm 1,46$  respectivamente), o mesmo foi observado com os controles e portadores de TE, com  $p=0,5842$  ( $98,47\pm 1,15$ ;  $97,93\pm 3,21$  respectivamente). Os pacientes portadores de PV e TE que faziam uso de HU apresentaram alterações qualitativas nos neutrófilos, no qual, o uso de HU diminui a atividade fagocítica dos neutrófilos nestes pacientes.

**Palavras-chave:** Neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, trombocitemia essencial, neutrófilos, hidroxiureia

## ABSTRACT

E-SARGES. S. Evaluation of circulating neutrophils in patients with philadelphia negative myeloproliferative neoplasms in chemotherapy treatment. Dissertation (Master degree), Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2018.

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of blood cell diseases that arise from a change in the hematopoietic stem cell. The most classic are Polycythemia vera (PV) and Essential thrombocythemia (ET). Negative Ph1 NMPs have a long and relatively benign clinical course but have no cure. Cytoreductive chemotherapy acts not only on erythrocytes and megakaryocytes, but also has its action on leukocytes, specifically neutrophils. One of the therapies employed is Hydroxyurea (HU), which has neutropenia as one of its side effects, studies show that this drug can have direct effects on neutrophils. The identification of possible quantitatively and qualitatively changes of neutrophils under the effects of cytoreductive chemotherapy in patients with negative Ph1 MPNs represents an advance in the understanding of the treatment in these MPNs. Hemogram and leukogram are part of the treatment follow-up protocol. In order to qualitatively evaluate some functions, the neutrophils were sensitized with zymosan, thus stimulating the phagocytosis, in relation to the metabolism, the cytochemical test of spontaneous reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), besides quantification of myeloperoxidase (MPO) through flow cytometry. In this study, all methodologies previously cited for quantitative and qualitative evaluation were performed on blood samples from 46 patients (PV = 17; ET = 29). The patients with PV had lower IF than the control group, with  $p = 0.0002$  ( $2.83 \pm 1.28$ ,  $3.83 \pm 1.38$ , respectively). The same was observed in the patients with ET who presented lower index than the control subjects with  $p = 0.0002$  ( $2.85 \pm 1.34$ ,  $3.83 \pm 1.38$  respectively). Our results showed that there was no difference in the activation of the oxidative metabolism in the NBT reduction test, between the control group and the PV group in HU use, with  $p = 0.9047$  ( $5 \pm 2.7$ ,  $2.9 \pm 3.5$  respectively) and control group with ET group in HU use, presenting  $p = 0.2870$  ( $5 \pm 2.7$ ,  $5 \pm 6.9$  respectively). The MPO test was performed on all patients with NMPs who were undergoing treatment with HU. Our results showed that there was no difference between the control group and the patients in the PV group, with  $p = 0.8438$  ( $98.47 \pm 1.15$ ,  $98.54 \pm 1.46$ , respectively). controls and patients with ET, with  $p = 0.5842$  ( $98.47 \pm 1.15$ ,  $97.93 \pm 3.21$  respectively). Patients with PV and ET who used HU presented qualitative changes in neutrophils, in which the use of HU decreased the phagocytic activity of neutrophils in these patients.

Key words: Myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, essential thrombocythemia, neutrophils, hydroxyurea.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1: Via JAK/STAT utilizadas por muitas citocinas nas células mielóides	18
Figura2: Cascata de recrutamento de neutrófilos.	26
Figura 3: Mecanismos de morte celular por neutrófilos.	27
Figura 4: Ilustração da obtenção de leucócitos do sangue periférico.	39
Figura 5: Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan (B).	40
Figura 6: Capacidade fagocítica de controles e pacientes com NMPs dos grupos TE e PV.	46
Figura 7: Capacidade fagocítica <i>in vitro</i> de controle e pacientes com TE em uso de HU e anagrelide.	47
Figura 8: Percentual de neutrófilos NBT positivos.	48
Figura 9: Citogramas representativos das células conservadas em RMPI	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios da OMS 2016 para Policitemia Vera	20
Tabela 2: Critérios da OMS 2016 para Trombocitemia Essencial.	22
Tabela 3: Caracterização dos indivíduos referente a sexo, idade, raça e medicação.	43
Tabela 4: Valores dos parâmetros hematológicos, leucócitos e plaquetas.	44
Tabela 5: Valores de neutrófilos e linfócitos absolutos	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ATP	Trisfosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BCR-ABL	Breakpoint cluster region - Abelson murineleukemia viral oncogene 1
BMO	Biópsia de medula óssea
CD62L	L-selectina
CD11a	Subunidade $\alpha$ da integrina LFA-1
CD11b	Subunidade $\alpha$ da integrina Mac-1
DMPC	Doenças mieloproliferativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CVO	Crises vasos oclusivas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPO	Eritropoietina
Epo-R	Receptores de eritropoietina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	<i>FoodandDrugAdministration</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
HCT	Hematócrito
HOCL	Ácido hipocloroso
HU	Hidroxiureia
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IF	Índice fagocítico
IL-1	Interleucina-1
IL-3	Interleucina-3
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina -8
JAK1	Janus Kinase 1
JAK2	Janus Kinase 2

JAK3	Janus Kinase 3
JH1	JAK homology 1
JH2	JAK homology 2
JH7	JAK homology7
KCl	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fostato de Potássio dihidrogenado
LFA-1	Antígeno 1 associado a função linfocitária
LMA	Leucemia mieloideaguda
LMC	Leucemia mieloidecrônica
LPO	Lactoperoxidase
MF	Mielofibrose
MFP	Mielofibrose primária
Mac-1	Antígeno de macrófago 1
MO	Medula óssea
MPL	Myeloproliferativeleukemia vírus oncogene
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fostato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NETs	Neutrophilextracellulartraps
NMPs	Neoplasias mieloproliferativas
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> •	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-salino
PEO	Peroxidase eosinofílica
PGHS	Pronstaglandina endoperóxido sintase
Ph <sup>1</sup>	<i>Philadelphia</i>
PMNs	Polimorfonucleadas
PSGL	Ligante de P-selectina
PTO	Peroxidase de tireóide
PV	Policitemia vera
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
SFB	Soro fetal bovino

SMD	Síndrome mielodisplásica
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TE	Trombocitemia essencial
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPO	Trombopoetina
Tpo-R	Receptor de trombopoetina
TYK2	Tirosina kinase2

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Neoplasias mieloproliferativas Ph <sup>1</sup> negativas .....	17
1.2 Patogênese das NMPs Ph <sup>1</sup> negativas.....	19
1.3 Policitemia vera.....	20
1.4 Trombocitemia Essencial .....	22
1.5 Manifestações clínicas .....	23
1.6 Neutrófilos: aspectos gerais .....	25
1.6.1 FAGOCITOSE .....	27
1.6.2 NADPH OXIDASE, BURST OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	29
1.6.3 MIELOPEROXIDASE .....	30
1.7 Neutrófilos e NMPs Ph <sup>1</sup> negativas .....	30
1.8 Estratégias terapêuticas.....	31
1.8.1 FLEBOTOMIA .....	32
1.8.2 ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO .....	32
1.8.3 HIDROXIUREIA.....	33
1.8.4 INTERFERON (IFN) .....	34
1.8.5 ANAGRELIDE .....	34
2 OBJETIVOS.....	36
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	37
3.1 Aspectos Éticos .....	37
3.2 Casuística .....	37
3.2.1 Pacientes.....	38
3.2.2 Controles .....	38
3.3 Amostras biológicas.....	39

3.3 Amostras biológicas.....	39
3.3.1 REAGENTES .....	39
3.3.2 DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA.....	38
3.3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES .....	39
3.4. Ensaio de redução Nitroblue Tetrazolium (NBT).....	42
3.5. Quantificação de MPO por citometria de fluxo .....	42
3.5 Análise estatística .....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Características gerais, clínicas e hematológicas dos pacientes com PV, TE e controles.....	44
4.2 Dados do hemograma, leucograma e plaquetas.....	45
4.3 Avaliação da Função Fagocítica .....	46
4.4 NBT .....	48
4.5 Citometria de fluxo .....	49
5 DISCUSSÃO .....	51
6 CONCLUSÃO .....	56
8 REFERÊNCIAS .....	57
ANEXO .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) referem-se a um grupo heterogêneo de doenças das células sanguíneas mielóides que surgem a partir de uma alteração na célula-tronco hematopoiética. Esta transformação ocorre devido a diferentes mutações somáticas adquiridas que têm sido descritas nos últimos 10 anos (TEFERRI e PARDANANI, 2015; PEDRAZZANI, 2016). As NMPs compartilham características como aumento na proliferação de células sanguíneas maduras diferenciadas de uma ou mais linhagens celulares na ausência de estímulos definidos, medula óssea (MO) hiperclonal, hematopoese extramedular da célula maligna, predisposição a trombose e potencial progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) ou fibrose medular (SPANOUKAKIS e TSATALAS, 2009; MOURA, 2012).

Em 2008 a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou em dois grupos as NMPs: Breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene 1 (BCR-ABL) positiva, que inclui a leucemia mieloide crônica (LMC) e as BCR-ABL negativas, as quais a policitemia vera (PV) e a trombocitemia essencial (TE) estão entre os maiores subtipos, chamadas NMPs *Philadelphia* (Ph<sup>1</sup>) negativas clássicas (CAMPO et al. 2011; PEDRAZZANI, 2016). Estudos epidemiológicos realizados em alguns países europeus mostraram uma incidência da PV que varia de 0,4 a 2,8 casos em 100.000 pessoas/ano, TE de 0,38 a 1,7 casos em 100.000 pessoas/ano e de mielofibrose (MF) de 0,1 a 1 caso em 100.000 pessoas/ano (PEDRAZZANI, 2016).

Somente no ano de 2005, o entendimento da patogênese nas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas teve um grande avanço com a descoberta da mutação da tirosina quinase JAK2, a JAK2 V617F (BAXTER et al. 2005; JAMES et al. 2005; KRALOVICS et al. 2005; LEVINE et al. 2005; DELHOMMEAU et al. 2006; PEDRAZZINI, 2016). Com o avanço do conhecimento profundo desta mutação iniciou-se a descoberta sobre os mecanismos moleculares da doença, permitindo observar o fato de uma simples mutação contribuir para três fenótipos distintos (LEVINE e GILLILAND, 2008).

As NMPs Ph<sup>1</sup> negativas apresentam um curso clínico prolongado e de comportamento relativamente benigno, mas que não tem cura. O manejo clássico

está centrado na prevenção das complicações trombóticas e/ou hemorrágicas. O tratamento de pacientes com NMPs Ph<sup>1</sup> negativas devem aderir ao padrão de estratificação de risco, em que a idade acima dos 60 anos ou histórico de trombooses e fatores de riscos cardiovasculares norteiam a terapêutica a ser utilizada (BITTENCOURT et al. 2010). O ácido acetilsalicílico (AAS) em baixas dosagens, flebotomia e a terapia citorrredutora com hidroxíureia (HU) anagrelide, e Interferon são terapias utilizadas nestas neoplasias.

O papel dos neutrófilos nas NMPs ainda não está elucidado, no entanto, essas células podem estar envolvidas com processos trombóticos. A quimioterapia citorrredutora atua não somente nos eritrócitos e megacariócitos, mas também tem sua ação nos leucócitos, especificamente nos neutrófilos. Uma dessas terapias empregadas é a HU, que apresenta como um dos seus efeitos colaterais a neutropenia, e alguns estudos mostram que esse medicamento pode ter efeitos diretos nos neutrófilos (BITTECOURT et al. 2010). Os neutrófilos são células que contribuem para a manutenção da resposta imunológica contra infecções bacterianas, e outros patógenos, sendo muito importante na defesa do organismo. Diante de tal importância dessa célula, faz se necessários estudos quantitativos e qualitativos de neutrófilos sob efeitos da quimioterapia citorrredutora em pacientes com NMPs Ph<sup>1</sup> negativas.

## 1.1 Neoplasias mieloproliferativas Ph<sup>1</sup> negativas

Em 1951, William Dameshek definiu algumas patologias hematológicas com características fenotípicas semelhantes de “doenças mieloproliferativas crônicas” (DMCP) que apresentavam maturação celular preservada e com hiperproliferação de um ou mais elementos sanguíneos devido a alguns estímulos desconhecidos. As patologias hematológicas como PV, TE, mielofibrose primária (MFP), LMC e a síndrome de Di Guglielmo (eritroleucemia) estavam nesse conceito (PEDRAZZANI, 2016).

Na década de sessenta através de um estudo citogenético realizado por Nowell e Hungerford, descobriu-se a presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph<sup>1</sup>) nos pacientes com LMC, sendo posteriormente atribuída à tirosina quinase BCR-ABL, resultado da translocação (9;22)(q34;q11). A relação do cromossomo Ph<sup>1</sup> com a LMC e o reconhecimento da eritroleucemia como uma variante LMA distinguiu as outras três desordens, PV, TE e MFP, como as doenças mieloproliferativas Ph<sup>1</sup> negativas “clássicas” (PEDRAZZANI, 2016).

As NMPs Ph<sup>1</sup> negativas clássicas possuem a mesma natureza, ou seja, derivam de uma transformação clonal da célula-tronco hematopoiética de linhagem mielóide, a qual é predominantemente expandida no sangue periférico (CAMPBELL e GREEN, 2006; JONES e CROSS, 2013). Estas desordens compartilham muitas características hematológicas, clínicas e evolutivas, incluindo hiperplasticidade da MO, propensão à trombose e hemorragia, e um risco de transformação leucêmica em longo prazo (JAFFE, 2001; CAMPBELL e GREEN, 2006). Em 2005 com a descoberta de uma mutação no gene JAK2 foi possível compreender o mecanismo patogênico das NPMs Ph<sup>1</sup> negativas clássicas. Quatro grupos de pesquisadores, usando diferentes abordagens, identificaram a primeira anormalidade recorrente nestes pacientes, a mutação V617F (BAXTER et al. 2005; JAMES et al. 2005; KRALOVICS et al. 2005; LEVINE et al. 2005).

Quanto à classificação da OMS, em 2001 a LMC, PV, TE e MFP foram incluídas na categoria de doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC) (JAFFE, 2001; VANNUCCHI et al. 2009), na revisão de 2008, a OMS alterou a nomenclatura de “doenças mieloproliferativas crônicas” para “neoplasias mieloproliferativas” (NMP) (CAMPO et al. 2008). Recentemente na revisão de 2016 as categorias não mudaram significativamente, no entanto, as

informações das novas mutações e do melhor entendimento das características morfológicas de algumas entidades das NMP Ph<sup>1</sup> negativas clássicas tem demonstrado real importância no diagnóstico e/ou prognóstico (ARBBER et al. 2016). Dentre estas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas clássicas a PV e TE serão abordadas neste estudo.

## 1.2 Patogênese das NMPs Ph<sup>1</sup> negativas

A etiologia, evolução e fisiopatologia de PV e TE ainda não estão bem elucidadas, no entanto, a descoberta da mutação adquirida JAK2 V617F permitiu a compreensão da patogênese nestas NMPs. A família das proteínas Janus Kinase (JAK) compreende quatro quinases (JAK1,2,3 e TYK2) que se ligam aos receptores de citocina no domínio citosólico (figura 1). Cada uma das quinases JAK possui 7 domínios de homologia JAK .

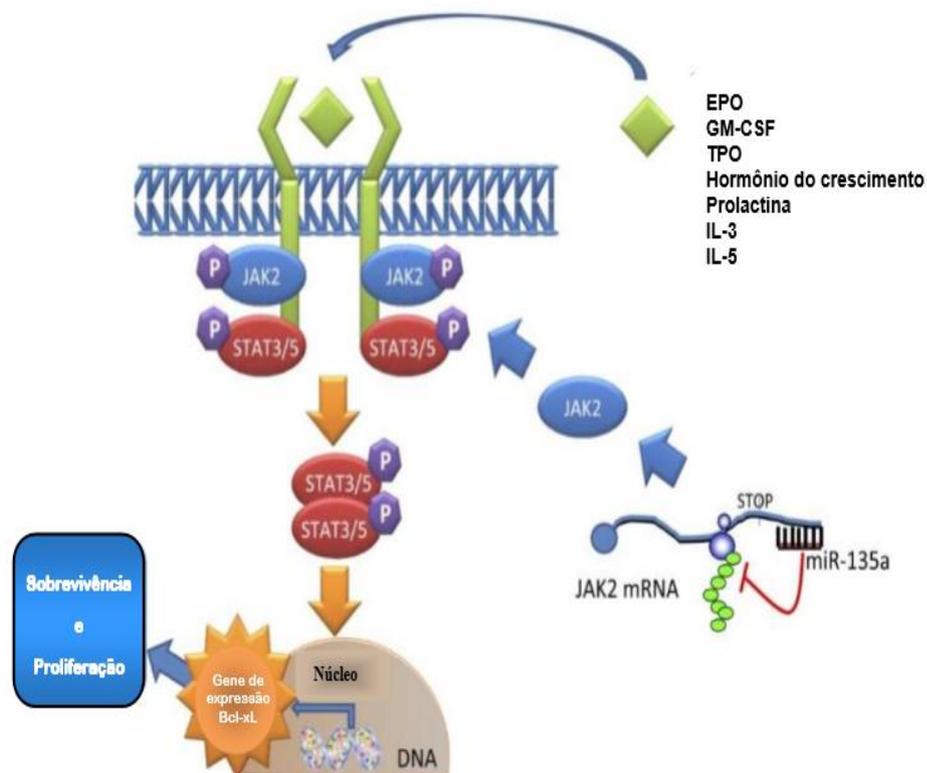


Figura 1: Via JAK/STAT utilizadas por muitas citocinas células mielóides adaptado de (NAVARRO et al. 2009; PEDRAZANNI, 2016).

O domínio JH1, no domínio da porção C-terminal, contém o domínio catalítico, enquanto o domínio N-terminal JH7 mostrou ser essencial para a associação com receptores de citocinas. JAK2 possui papel importante na via de sinalização para receptores de citocinas nas células mielóides, por meio da ligação a três receptores mielóides homodímeros (EPO-R, MPL ou TPO-R e GCSF-R) (VINCHENKER et al. 2011; MOURA, 2012). A estrutura da JAK2 de comprimento completo, ou o domínio JAK2 JH1 e JH2, não foi resolvido. No entanto, a descoberta da mutação JAK2V 617F permitiu compreender em partes o mecanismo preciso de ativação da quinase (LEVINE e GILLILAND, 2008). O aminoácido que é formado pela mutação JAK2 V617F, bloqueia a alça de ativação do domínio JH1, interferindo no efeito inibitório sobre o JH1, o que resulta na eterna dimerização do receptor transmembrana, não sendo necessário o contato com um fator de crescimento para ativar a JAK2, a qual se auto-fosforila promovendo a ativação constitutiva da via JAK-STAT (SMITH e FAN, 2008; SANTOS, 2010).

### **1.3 Policitemia vera**

A PV é uma doença neoplásica hematológica que se origina de uma célula tronco hematopoiética multipotente alterada. Caracterizando-se com o acúmulo de células eritróides maduras, frequentemente acompanhado por leucocitose e trombocitose moderada e seus precursores na ausência de estímulos definidos faz com que a PV seja considerada uma NMP (GASPAROTTO, 2009). Incide preferencialmente em pacientes na faixa etária acima dos 50 anos com uma incidência de 0,4 a 2,8 casos em 100.000 indivíduos na Europa e América do Norte (PEDRAZANNI, 2016).

O desequilíbrio central na PV é a produção de eritrócitos independente de eritropoetina (EPO), o hormônio que normalmente regula a eritropoese. Na PV, os níveis de EPO são baixos, os progenitores eritróides de MO formam colônias EPO-independentes em culturas e a expressão de receptores de EPO e a sua habilidade de ligar-se a EPO são normais (CORREA, ESKINAZZI e AXELRAD, 1994; GREEN, 1996; GASPAROTTO, 2009). As células eritróides, nesta patologia, mostram-se hipersensíveis a diversos fatores de crescimento incluindo interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CFS) e trombopoetina (TPO) o que sugere a

alteração da via de transdução de sinais nestas células (DAÍ, 1994; GASPARATTO, 2009).

O mecanismo que leva a hipersensibilidade a EPO e a produção *in vitro* de colônias eritróides na ausência de citocinas na PV permanece desconhecido. Contudo, a descoberta da mutação V617F no gene da tirosina-quinase Janus Kinase 2 (JAK2 V671F) em pacientes com NMPs foi considerada o avanço mais importante para o entendimento da base molecular da policitemia vera, cerca de 95% de pacientes com PV está associado com a mutação JAK2 V671F (CHEN e PRCHAL, 2006; GASPAROTTO, 2009);(VAINCHENKER e KRALOVICS, 2017).

Os critérios para diagnóstico das NMPs foram reavaliados e alterados pela OMS (ARBER et al. 2016). A OMS definiu novos critérios de diagnóstico para a PV, utilizando os níveis de hemoglobina definidos. Atualmente para o diagnóstico de PV, deve-se atender a todos os três critérios maiores ou os primeiros dois maiores e o menor, conforme a tabela 1 (PEDRAZINNI, 2016).

**Tabela 1. Critérios da OMS 2016 para Policitemia Vera**

<b>CRITÉRIOS MAIORES</b>		
1. Hemoglobina	>16,5g/dL para homens	>16,0g/dL para mulher
ou		
Hematócrito	>49% para homens	>48%para mulheres
ou		
Aumento da massa eritrocitária > 25% acima do valor normal preditivo*		
2. Biópsia de MO mostrando hiper celularidade para a idade com panmielose, proliferação eritróide, granulocítica e megacariocítica com pleomorfismo e megacariócitos maduros		
3. Ausência das mutações JAK2V617F ou JAK exon 12		
<b>CRITÉRIOS MENORES</b>		
Níveis baixos de eritropoietina sérica.		
O diagnóstico de PV requer atender a todos os 3 critérios principais, ou os dois primeiros critérios principais e o critério menor †		

\* Mais de 25% acima do valor previsto normal.

† O critério número 2 (biópsia MO) pode não ser necessário em casos com eritrocitose absoluta sustentada: níveis de hemoglobina .18,5 g / dL em homens (hematócrito, 55,5%) ou 0,16 g / dL em mulheres (hematócrito, 49,5%). Se o critério principal 3 e o critério menor estiverem presentes.No entanto, a mielofibrose inicial (presente em até 20% dos pacientes) só pode ser detectada através da realização de uma biópsia MO; essa descoberta pode prever uma progressão mais rápida para a mielofibrose aberta (pós-PV MF). Fonte: Arber et al. 2016.

## 1.4 Trombocitemia Essencial

No início a TE foi identificada como uma síndrome clínica distinta por Emil Epstein e Alfred Godel em 1934, no qual pacientes apresentavam trombocitose sem eritrocitose marcada. Em 1951, baseada na classificação delineada por William Dameshek, a TE foi classificada como uma das NMP clássicas (DAMESHEK, 1951; LEVINE e HEANEY, 2008; PEDRAZANNI, 2016).

A TE é uma NMP que se caracteriza pelo elevado número de plaquetas, cursando com uma persistente trombocitose ( $>450 \times 10^9/L$  plaquetas no sangue periférico), aumento do número e do tamanho dos megacariócitos maduros da medula óssea, clinicamente apresenta episódios de trombose e/ou hemorragia e incide preferencialmente em pacientes que estão na quinta à sétima década de vida (CAMPO et al. 2008; PEDRAZANNI, 2016). Nos países da Europa e da América do Norte apresentam uma incidência de 0,38 a 1,7 casos em 100.000 pessoas/ano (PEDRAZANNI, 2013). A sobrevivência mediana dos pacientes com TE é de 20 anos, refletindo a natureza mais indolente da proliferação (TEFFERI e BARBUI, 2013).

O principal fator de crescimento que regula fisiologicamente a trombopoiese é a TPO que atua através da ligação ao seu receptor na superfície celular, o MPL (Myeloproliferative leukemia vírus oncogene). O receptor de TPO está envolvido na via de sinalização JAK-STAT, desempenhando um papel importante na renovação hematopoiética das células progenitoras CD34+, diferenciação megacariocítica e formação de plaquetas (ROYER et al. 2005; PECQUET et al. 2010; DEFOUR et al. 2013). Até 2005, pouco se sabia sobre a patogênese molecular da TE, sua etiologia estava atrelada basicamente a defeitos no gene do receptor da TPO (BITTENCOURT et al. 2010). Na TE, as mutações somáticas envolvendo o receptor da TPO, a MPLW515L e a MPLW515K, resultam na ativação da via de sinalização (DEFOUR et al. 2013). A mutação da JAK2 V617F resultou um ganho de função envolvendo o receptor MPL, que se tornou independente de fator de crescimento, além de desenvolver uma hipersensibilidade a TPO estimulando a proliferação e diferenciação de megacariócitos, cerca de 50%-60% de pacientes com TE estão relacionados com a mutação JAK2 V617F

(TEFFERI et al. 2014; PEDRAZANNI, 2016);(VAINCHENKER e KRALOVICS, 2017).

O diagnóstico da TE definido pela OMS requer ausência de BCR-ABL1, ausência de diseritropoese (para excluir a possibilidade de síndromes mielodisplásicas ou de sobreposição associadas à trombocitose) e, a ausência de alterações morfológicas na MO que são mais evidentes na mielofibrose precoce / pré-fibrótica (TEFFERI e BARBUI, 2013). O diagnóstico deve atender a todos os quatro critérios maiores ou os três primeiros maiores e o menor, definidos pela OMS, conforme Tabela 2 (ARBER et al. 2016). Por não haver um marcador específico genético ou biológico, outras causas de trombocitose devem ser descartadas (CAMPO et al. 2008; PEDRAZANNI, 2016).

**Tabela 2. Critérios da OMS 2016 para Trombocitemia Essencial**

#### **CRITÉRIOS MAIORES**

1. Plaquetas > 450 x 10<sup>9</sup>/L.
2. Biópsia de MO mostrando proliferação principalmente da linhagem megacariócítica com aumento do número e do tamanho, megacariócitos com hiperlobularidade nuclear. Sem aumento significativo ou desvio à esquerda na granulopoieseneutrofílica ou eritropoiese e um muito raro pequeno aumento na fibra reticulínica (grau 1).
3. Ausência dos critérios da OMS para LMC BCR-ABL<sup>+</sup>, PV, MFP, SMD ou outras neoplasias mielóides.
4. Presença das mutações JAK2, CALR ou MPL.

#### **CRITÉRIOS MENORES**

Presença de um marcador clonal ou ausência de evidencia para trombocitose reativa.

O diagnóstico de ET exige reunir os 4 principais critérios ou os 3 primeiros critérios principais e o critério menor

---

Fonte: Arber et al. 2016.

### **1.5 Manifestações clínicas**

O curso clínico da PV apresenta uma elevada incidência de complicações, no qual, a idade avançada, leucocitose e trombose são alguns dos fatores de riscos, além do possível desenvolvimento de síndrome mielodisplásica (SMD), mielofibrose (MF) pós-PV e leucemia aguda que são causas de morbidade e mortalidade (TEFFERI e PARDANINI, 2015). Apesar de novos conhecimentos sobre essa neoplasia mieloacumulativa, no momento

não há qualquer característica fisiopatológica completamente definida, nenhum critério de estadiamento e nem marcadores de prognósticos específicos da PV (NUNES, 2011).

Os sintomas da TE de maior repercussão se dá pelos eventos trombóticos em órgão alvos como coração, pulmão e sistema nervoso central (SNC). Em que, angina, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e embolia pulmonar podem representar a primeira manifestação de trombocitose. As manifestações hemorrágicas são menos frequentes e mais associadas ao número de plaquetas superior a  $1.000 \times 10^9/L$ , variando de epistaxe e gengivorragia até hemorragias digestivas ou sangramentos em sistema SNC, algo mais raro. Em um estudo com mais de 1000 pacientes com TE, identificou-se como fatores de riscos para a progressão fibrótica a idade mais avançada, a anemia, a ausência de JAK2V617F, história de trombose e extrema trombocitose como fatores de risco para transformação leucêmica (BARBUI et al. 2011)

As complicações mais comuns em PV e TE se dá justamente pelos eventos trombóticos e hemorrágicos, que contribui para os principais motivos de morbimortalidade entre esses pacientes. A diátese trombótica pode prejudicar tanto a circulação arterial e/ou venosa e contribuir para 45% dos óbitos nessa população (BARBUI et al. 2011). Os três principais fatores que podem influenciar a patogênese da trombose são: anormalidades da parede do vaso, componentes sanguíneos e a dinâmica do fluxo (BAGOT e ARYA, 2008; REIKVAM e TIU, 2012). Astromboses arteriais e venosas são consideradas entidades patofisiológicas separadas, com trombos arteriais compreendendo predominantemente plaquetas (coágulo branco) e trombos venosos de fibrina e glóbulos vermelhos (coágulo vermelho). Porém, sabe-se agora que há semelhanças entre esses dois processos trombóticos, em que plaquetas e fibrina são encontrados em ambos os trombos arteriais e venosos. Além disso, a associação entre trombose arterial e venosa também é suportada por observações do paciente (GREEN, 2009; REIKVAM e TIU, 2012).

Os pacientes com PV e TE estão em risco de trombose venosa e arterial, e os processos de fisiopatologia por trás desses eventos provavelmente são compartilhados. Os mecanismos fisiopatológicos provavelmente envolvem todos os componentes do sangue, plasma, interação

com células endoteliais e alterações hemodinâmicas. A ocorrência de eventos trombóticos em órgãos alvos sugere que a elevação de uma ou mais linhagens celulares possuem um papel de real importância no desenvolvimento das manifestações clínicas da doença, podendo estar relacionados tanto na iniciação como na propagação das crises vasos oclusivas (CVO), bem como na gravidade das mesmas (PEDROSA, 2013).

Diretrizes para o manejo do TE preconizam normalização da contagem de plaquetas (PLT), porém, uma contagem elevada de leucócitos no momento do diagnóstico foi considerada, além da presença de uma mutação JAK2-V617F, como um dos mais fortes fatores de risco para trombose (BUXHOFER-AUSCH et al. 2018).

### **1.6 Neutrófilos: aspectos gerais**

Os neutrófilos são células sanguíneas produzidas e armazenadas na medula óssea e quando estas células se tornam maduras, são liberadas na corrente sanguínea (PEDROSA, 2013). 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, chegando a estender a vida dessas células há alguns dias (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).

Quando os neutrófilos são ativados pela presença de produtos microbianos, citocinas ou quimiocinas, tais como: fator de TNF- $\alpha$ , GM-CFS, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e interferon  $\gamma$  ou outras substâncias liberadas

pelas células do tecido lesado, os neutrófilos migram para o local inflamado (PHILLIPSON e KUBES, 2011). 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, que são os primeiros passos da cascata de recrutamento de leucócitos (PHILLIPSON e KUBES, 2011). Uma vez ativados, ocorre o aumento da expressão de selectinas, são elas 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 (PHILLIPSON, 2006; PHILLIPSON e KUBES, 2011). 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; PHILLIPSON e KUBES, 2011; 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 (PHILLIPSON e KUBES, 2011)

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 2) (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). 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 (PHILLIPSON e KUBES, 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; VITAL, 2015).

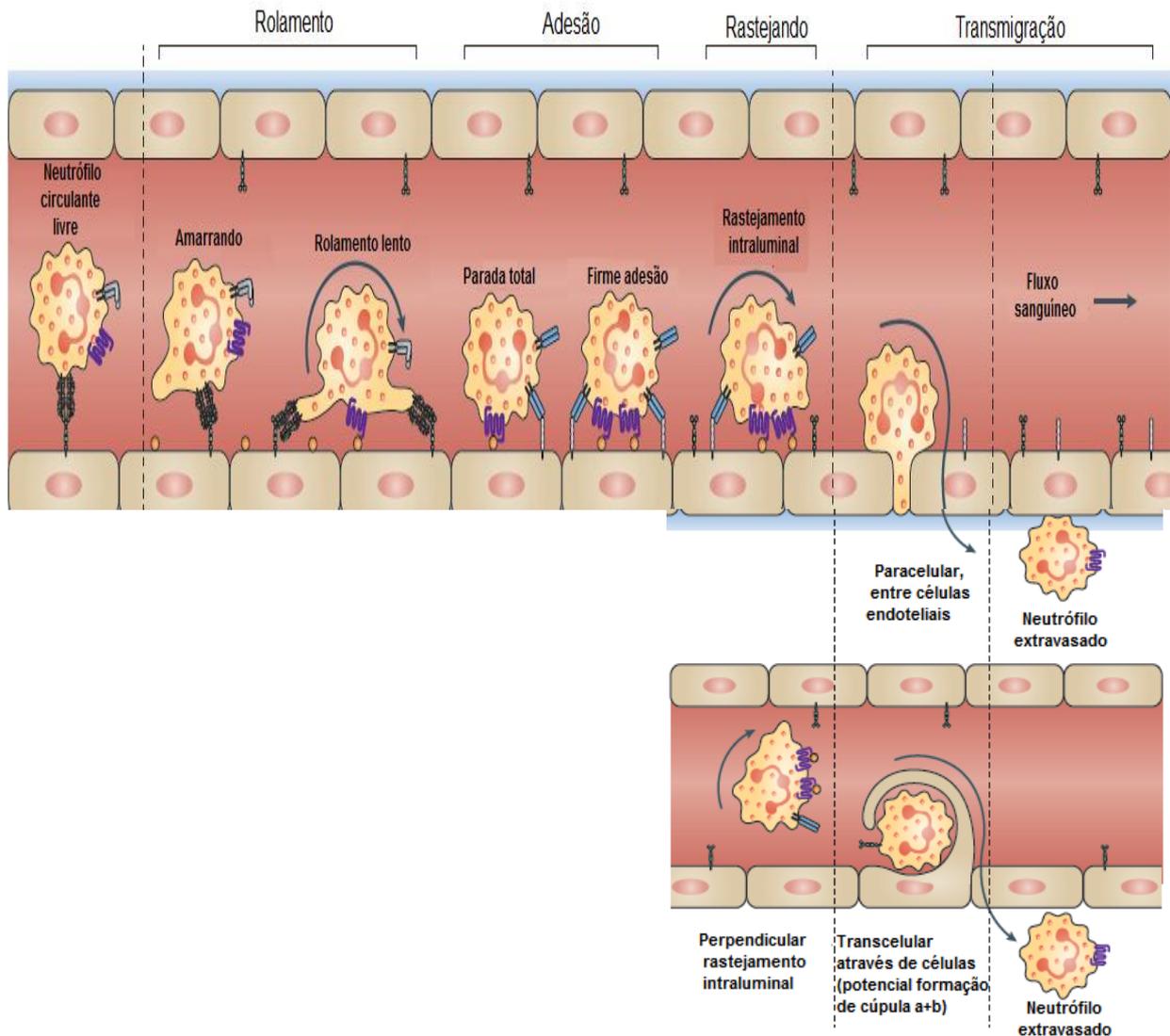


Figura 2: Cascata de recrutamento de neutrófilos. Representação das etapas de rolamento, adesão, diapedese e de quimiotaxia que medeiam à migração dos neutrófilos desde a corrente sanguínea até ao local da lesão. Adaptado de Kolaczowska e Kubes, 2013.

### 1.6.1 FAGOCITOSE

Os neutrófilos podem eliminar patógenos por vários meios, tanto intra e extracelularmente, esse processo é denominado de fagocitose. A fagocitose é um mecanismo de defesa essencial da resposta imune inata. O processo se inicia a partir do contato da célula fagocitária com o agente invasor e é 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 (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OLIVEIRA, 2012).

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 (ADEREM, 2003; PEDROZA, 2013);(KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013) (Figura 3).

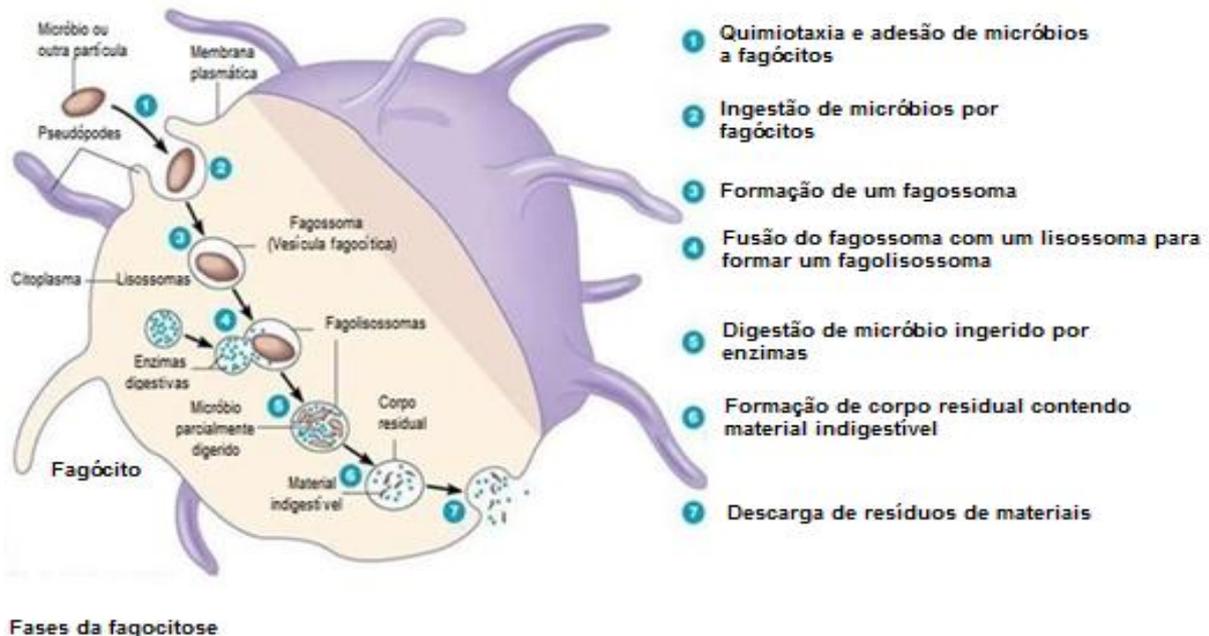


Figura 3: Mecanismos de morte celular por neutrófilos. Representação da eliminação de patógenos realizados pelos neutrófilos: fagocitose e desgranulação. Adaptado de Benjamin Cummings (2004).

### 1.6.2 NADPH OXIDASE, BURST OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A NADPH oxidase (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) 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 de 47 KD, 67 KD, denominadas respectivamente p47-phox e p67-phox, uma proteína G citossólica, denominada p21 rac, e um citocromo b558 ligado à membrana, sendo este constituído por uma subunidade protéica de 22 KD, p22phox, e uma subunidade de glicoproteína de 91 KD, gp91phox, ambas contendo o grupo heme (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 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 espécies reativas de oxigênio (EROs), ou como é também denominado “*burst*” oxidativo ou explosão respiratória.

A explosão respiratória 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).

### 1.6.3 MIELOPEROXIDASE

A MPO faz parte da família das peroxidases humanas que inclui a peroxidase eosinofílica (PEO), lactoperoxidase (LPO), peroxidase salivar 20 (PSO), peroxidase da tireóide (PTO) e a prostaglandina endoperoxídeo sintase (PGHS) (VELLOOSA, BARBOSA, OLIVEIRA, 2007; PESSOA, 2009). As peroxidases são uma classe de enzimas capazes de catalisar reações químicas utilizando peróxido de hidrogênio como co-substrato. A MPO é uma hemoproteína microbicida, considerada como sendo o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, presente nos grânulos citoplasmáticos de granulócitos maduros, sua síntese é iniciada no estágio do promielócito, do desenvolvimento dos neutrófilos. A MPO contida nos grânulos azurófilos são distribuídos às células jovens, para se misturar com as peroxidases negativas nos grânulos específicos (KLEBANOFF, 2005; PESSOA, 2009).

A MPO compõe o sistema peróxido de hidrogênio-MPO-haleta sistema importante e eficiente de ação antimicrobiana. A MPO converte o peróxido de hidrogênio em presença de uma hialida com o cloreto (Cl<sup>-</sup>) em HOCl<sup>-</sup>, sendo um poderosíssimo oxidante. O HOCl<sup>-</sup> mata a bactéria oxidando sua membrana plasmática e criando ligações moleculares prejudiciais. Sendo muito importante na defesa imune inata do organismo (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998; PESSOA, 2009).

## 1.7 Neutrófilos e NMPs Ph<sup>1</sup> negativas

As NMPs Ph<sup>1</sup> negativas, PV e TE surgem de uma alteração na célula tronco adquirida levando a uma produção anormal de glóbulos vermelhos, plaquetas e leucócitos. A trombose arterial e venosa é a principal causa de mortalidade de pacientes com as NMPs Ph<sup>1</sup> negativas. A maior parte das pesquisas se concentrou em glóbulos vermelhos e plaquetas, porém o papel dos neutrófilos não recebeu devida atenção, apesar do fato de que esses pacientes apresentam números elevados desta célula. Os Neutrófilos derivados

das ERO podem induzir lesão endotelial celular e modificar as funções que eles têm na tromboregulação (HURTADO-NEDELEC et al. 2013).

O papel dos neutrófilos no processo de oclusão vascular e comprometimento funcional dos órgãos adjacentes se devem ao principal fato de serem células relativamente grandes (12-15 $\mu$ m) e rígidas. O seu recrutamento para a microcirculação reduz o fluxo sanguíneo dos vasos, devido a adesão às paredes do endotélio ativado e pelas interações adesivas com hemácias, plaquetas ou outros leucócitos circulantes, retendo e formando agregados celulares que obstruem ainda mais o lúmen vascular. A estimulação do endotélio vascular aumenta sua expressão de ligantes para moléculas de adesão nas células sanguíneas, induzindo dano tecidual, infarto de órgãos adjacentes e reação inflamatória que predispõem e prolongam as CVO (CHARACHE et al.1996; OKPALA, 2004; SOUZA, 2007; MIGUEL, 2010;PEDROZA, 2013).

Outro fator que pode estar envolvido é a produção de EROs. Sabe-se que em resposta a uma variedade de agentes, os neutrófilos produzem EROs que induzem lesão tecidual endotelial e modificam funções que possuem na tromboregulação (HURTADO-NEDELEC et al. 2013). Os neutrófilos ao produzirem EROs liberam grandes quantidades de anion superóxido ( $O_2^-$ ) e outras espécies reativas de oxigênio, denominado como processo respiratório. A produção de anion superóxido é dependente da NADPH oxidase. A ativação da NADPH oxidase potencializa a produção de EROs por deixar os neutrófilos expostos às citocinas pró-inflamatórias. Nas NMPs a hiperativação de neutrófilos tem sido implicada na trombofilia (HURTADO-NEDELEC et al. 2013).

## **1.8 Estratégias terapêuticas**

As possibilidades terapêuticas até o presente momento para a PV e TE, não são curativas, apenas prolongam a sobrevida e diminui a morbidade da doença (BEER e GREEN, 2009). Os tratamentos para estas entidades nosológicas baseiam-se nos fatores de risco dos pacientes de acordo com a classificação da OMS. A profilaxia para evitar eventos trombóticos em

pacientes com PV e TE se dá através do uso AAS, da flebotomia e do uso de medicações citorreductoras como hidroxiureia, anagrelide e interferon (IFN)

### 1.8.1 FLEBOTOMIA

A flebotomia em pacientes com PV justifica-se pelo fato do aumento da viscosidade do sangue, a hiperprodução de células eritróides é um dos principais contribuintes para a tendência trombótica nesses pacientes. Resultados que apóiam o papel da flebotomia na redução da incidência de trombose venosa é limitada, o que é ainda suportado pela falta de correlação entre níveis de hematócrito e episódios trombóticos. Apesar das informações serem limitadas, uma recente diretriz estabelece que todos os pacientes com PV devem ser tratados com aspirina em doses baixas e flebotomia, com uma meta de hematócrito (HCT) abaixo de 45%. Não se deve oferecer flebotomia a pacientes com TE ( REIKVAM e TIU, 2012).

### 1.8.2 ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO

O tratamento com AAS reduz o risco de infárto do miocárdio, acidente vascular cerebral não fatal, trombose venosa ou morte por causas cardiovasculares. A aspirina na concentração de 75-100mg é agora recomendado para uso em todos os pacientes com PV que não apresentam nem uma contraindicações para esta terapia. Para pacientes com TE de baixo risco que não carregam a mutação JAK2 V617F e não têm fatores de risco cardiovasculares associados, a aspirina não diminuiu a incidência de eventos trombóticos. Diante destas informações, diretrizes recentes recomendam aspirina para todos pacientes com PV, e aspirina para pacientes com TE que apresentam alterações microvasculares (REIKVAM e TIU, 2012).

### 1.8.3 HIDROXIUREIA

A hidroxiureia tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos. A droga é utilizada em várias doenças mieloproliferativas e neoplásicas. A HU é um agente quimioterápico sintetizado pela primeira vez, em 1869, na Alemanha, por Dresler e Stein (DRESLER e STEN, 1869; PEDROSA, 2013). Somente no século seguinte, no ano de 1967, este medicamento foi aprovado pelo FDA para o tratamento de doenças neoplásicas, e, nos anos posteriores, para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase, doenças reumáticas e PV, dentre outras (PEDROSA, 2013).

Há quatro décadas tem sido o agente de escolha de primeira linha nas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas devido a sua fácil administração, a baixa toxicidade, bem como o baixo custo e os múltiplos benefícios de ordem clínica, garantem à hidroxiureia lugar de destaque em vários esquemas terapêuticos (MCGANN e WARE, 2011; VITAL, 2015). A HU é absorvida pelo trato gastrointestinal, e após 1h 30 minutos da ingestão atinge picos sanguíneos tendo disponibilidade de quase 100% possui solubilidade em água e entra na célula por meio de difusão passiva, possui uma meia vida de 3 á 4 horas no organismo sendo excretado via sistema renal (RODRIGUEZ et al. 1998; GWILT e TRACEWELL, 1998; SEGUIN, 2017).

A utilização deste fármaco antineoplásico em pacientes com PV e TE é justificada por induzir a citorredução, no qual, inibe a síntese de DNA, através de bloqueio da enzima ribonucleoside redutase, que converte os ribonucleotídeos para desoxiribonucleotídeos que são necessários para a síntese de DNA (NAOUM, 2000; SILVA e SHIMAUTI, 2006; KHAYAT et al. 2004; VITAL, 2015). Além da citorredução, a utilização da HU tem como resultado favorável à diminuição da expressão de moléculas de adesão da superfície eritrocitária e plaquetária, e a redução das proteínas receptoras localizadas em células endoteliais, contribuindo desse modo para a diminuição das crises vaso-oclusivas (COVAS et al. 2004). Diversos estudos demonstraram que a HU diminui a expressão de moléculas de adesão na fibronectina e ao ICAM-1 é significativamente diminuída quando comparada a pacientes sem uso da HU.

Em estudos com camundongos com anemia falciforme observou-se que uma única administração de HU foi capaz de reduzir a adesão de leucócitos ao

endotélio microvascular (ALMEIDA et al. 2012). Este efeito da HU é intermediado pela diminuição da atividade da integrina Mac-1 na superfície dos neutrófilos e por um via dependente de NO. A atividade da integrina Mac-1 pode ser modulada por mudanças na expressão superficial da integrina, assim como por alterações em sua afinidade (FAGERHOLM et al. 2006; LUO e LOISON, 2008; VITAL, 2015).

#### 1.8.4 INTERFERON (IFN)

IFN possui um leque de propriedades biológicas, incluindo atividades imunomoduladoras, pró apoptóticas e antiangiogênicas. Suprime a proliferação de células hematopoiéticas progenitores, tornando o medicamento atraente no tratamento de neoplasias hematológicas. O IFN-a conduz cerca de 80% nas respostas hematológicas em PV e TE e também reduz a incidência de eventos trombóticos. O principal problema da terapêutica com IFN-a é a incidência de efeitos colaterais. Febre e sintomas semelhantes à gripe são sentidos pela maioria dos pacientes e geralmente requerem tratamento com paracetamol. Sintomas mais graves, como como fraqueza, mialgia e humor deprimido, muitas vezes levam à descontinuação do tratamento. O uso de doses menores de IFN e o uso de formas peguilladas de IFN-a melhoraram o perfil de toxicidade e melhoraram a adesão (REIKVAM e TIU, 2012).

#### 1.8.5 ANAGRELIDE

Anagrelide (cloridrato de anagrelida) é um composto imidazo-quinazolina que atua no organismo para reduzir a contagem de plaquetas. O mecanismo pelo qual este medicamento age ainda não é totalmente compreendido. O que se sabe é que a anagrelide age sob o megacariócito na fase pós-mitótica do seu desenvolvimento, inibindo sua maturação. Não tendo ação no DNA, não sendo, portanto, mutagênico (BITTENCOURT et al. 2010).

A dose inicial preconizada é 0,5 mg a 1mg/dia (um ou dois comprimidos) na primeira semana, com ajustes semanais de 0,5 mg até atingir resposta hematológica satisfatória. Essas doses foram consideradas efetivas para a redução de trombocitemia, reduzindo indiretamente as complicações trombo-hemorrágica. No entanto, em doses terapêuticas, anagrelide não produz

alterações significativas na contagem de células brancas ou parâmetros de coagulação, e pode ter um efeito pequeno, mas clinicamente insignificante sobre os parâmetros das células vermelhas (FDA, 2010).

O anagrelide possui um efeito inotrópico positivo, aumentando a frequência cardíaca e a pressão arterial, podendo desencadear palpitações, crise hipertensiva, ou retenção hídrica. As reações adversas mais frequentes estão relacionadas ao trato gastrointestinal como intolerância gástrica, náuseas, vômitos, diarreia. Importante cefaléia, anemia leve, vertigens e tonturas são associadas ao medicamento (MONTE-MÓR et al, 2008).

Conforme já exposto, as manifestações clínicas nos pacientes acometidos por PV e TE se dá pelos constantes riscos de eventos trombóticos, fazendo com que os pacientes se encontrem permanentemente em desenvolver complicações em órgãos vitais, como coração, rins e pulmões.

Ressaltando a carência de dados na literatura referentes as funções dos neutrófilos em tratamento quimioterápico nas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas, este presente estudo pretende investigar as alterações quantitativas e qualitativas dos neutrófilos sob o prisma do tratamento citorrredutor. As funções neutrofílicas são essenciais para uma resposta em um processo inflamatório, sendo a fagocitose e a ativação do metabolismo oxidativo importantes na defesa do hospedeiro. Dentre as terapias empregadas a mais utilizada é a HU. Esse medicamento tem como efeito colateral a mielossupressão e a neutropenia, fazendo-se útil e de extrema pertinência o estudo do comportamento das funções dessas células como, fagocitose e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, para averiguar se o principal medicamento utilizado que é a HU exerce algum efeito sobre suas funções.

Ressaltamos que a maioria dos estudos a cerca das NMPs Ph<sup>1</sup> negativas tem como objeto de interesse as hemácias e as plaquetas. Diante desse cenário, a avaliação do efeito da quimioterapia na redução da capacidade fagocítica e oxidativa é relevante e pertinente para essas doenças que cursam com um alto valor de neutrófilos, contribuindo dessa forma, para ampliar os conhecimentos sobre a doença em nossa população e para uma maior compreensão da sua fisiopatologia.

### 3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar as alterações quantitativas e qualitativas nos neutrófilos de pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas Ph<sup>1</sup> negativa em tratamento quimioterápico.

Objetivos específicos:

- Avaliar o número de neutrófilos circulantes em pacientes com NMPs Ph<sup>1</sup> negativas no período do tratamento através do leucograma;

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

- Avaliar a ativação do sistema NADPH-oxidase dos neutrófilos durante o tratamento quimioterápico;

- Quantificar a enzima mieloperoxidase nos neutrófilos dos pacientes com NMPsPh<sup>1</sup> negativas.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas (CEP) do Hospital Universitário João de Barros Barreto, sob o número do parecer 2.035.172 e CAAE: 64964917.6.0000.0017. Os participantes foram alocados em diferentes grupos e subgrupos.

Os pacientes com PV e TE e os controles incluídos no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Os que foram favoráveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário com as seguintes informações (quando aplicável): data de nascimento, data do diagnóstico, gênero e uso de medicação (hidroxicarbamida, anagrelide), presença de diabetes e/ou hipertensão ou de alguma doença inflamatória.

### **4.2 Casuística**

#### **4.2.1 Pacientes**

Baseado na fórmula do cálculo amostral ( $n=N.n_0/N+.n_0$ ) foram incluídos neste estudo 46 pacientes com NMPs que foram divididos em grupos de acordo com a doença e a medicação quimioterápica de uso. Desses pacientes, 17 tinham diagnóstico de PV e faziam uso de HU e 29 pacientes estavam com TE, no qual, 21 deles faziam uso de HU e 8 faziam uso de anagrelide. Os casos foram selecionados baseados no diagnóstico de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2016 (ARBER et al. 2016), por meio da biópsia de medula óssea e mielograma, para os pacientes com PV ou TE. Os pacientes, de ambos os gêneros, com idades compreendidas entre 24 e 86 anos, foram atendidos no Ambulatório de Hematologia e Hemoterapia do Hospital Ophir Loyola, sob a supervisão médica.

### **4.2.2 Controles**

Foram incluídos 24 indivíduos controles, que foram pareados com os pacientes com PV e TE. Três dos controles foram excluídos, devido a alterações nos hemogramas. O pareamento dos controles foi realizado de acordo com o gênero e a idade dos pacientes.

Os indivíduos desse grupo são funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPA que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE. Os funcionários foram esclarecidos que a participação é voluntária e que a recusa em participar não acarretaria em nenhuma consequência em relação aos seus superiores ou a equipe desse projeto.

Além dos exames previstos nesse projeto, foi analisado o hemograma de cada indivíduo para confirmar seu bom estado hematológico. Foram excluídos indivíduos que declararam ter apresentado febre, infecções, inflamações e alergias no último mês, condições essas que podem alterar o perfil fagocítico e de MPO, e indivíduos que faziam uso de medicação, exceto para o tratamento de hipertensão arterial e/ou diabetes.

### **4.3 Amostras biológicas**

Foram coletados 10mL de sangue periférico em tubos a vácuo contendo EDTA (sistema Vacutainer®). Utilizou-se 5 mL para obtenção de neutrófilos e 200 microlitros para o teste de NBT. Posteriormente, essas amostras foram acondicionadas em isopor contendo gelox, em temperatura adequada, e encaminhadas ao laboratório de hematologia da Faculdade de Farmácia da UFPA.

#### **4.3.1 REAGENTES**

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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O e 0,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 200 mL de água destilada), solução de hemólise (16,05 g de

NH<sub>4</sub>CL, 1,680 g de NaHCO<sub>3</sub>, 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), corante leishman ( 1,5 g de Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa em 1 litro de Metanol). tetrazólio nitroazul (Sigma-Aldrich), anti-CD45 (PerCP), anti-CD16 (PE) (BD Pharmingen TM California, USA, Exbio), anti-Mieloperoxidase conjugado ao fluorocromo FITC (BD Pharmingen TM California, USA, Exbio), reagente A do kit "Fixand Perm" (Nordic MUBio) e reagente B do kit "Fixand Perm" (Nordic MUBio).

#### 4.3.2 DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA

As amostras foram analisadas no laboratório de hematologia da faculdade de farmácia por meio de metodologia semi automatizada utilizando o contador ABX micros 60, sendo obtidos os seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM (Volume Corpuscular Média), CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média), RDW (Redcell volume DistributionWidth), leucócitos totais e plaquetas. A distensão de esfregaço foi realizado em todas as amostras, utilizando coloração panótica e posteriormente submetido à microscopia óptica como método para a visualização dos elementos celulares.

##### 4.3.2.1 Critérios de avaliação do leucograma

Em todos os pacientes foi realizado o leucograma como parte da rotina de avaliação do tratamento. Mediante este exame, foram analisados o valor absoluto de neutrófilos e linfócitos com o objetivo de avaliar o número destas células sob efeito do tratamento. Para avaliar presença ou não de neutropenia e linfopenia, foi definido como neutropenia número de neutrófilos absolutos <1.000-1500 e de linfopenia número de linfócitos absolutos <1.000 de acordo como critério da avaliação médica do hospital ophir loyola.

### 4.3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES

#### 4.3.3.1 Obtenção e Preparo dos Neutrófilos Circulantes

O volume de 5 ml de sangue foi adicionado com 5 mL de solução salina 0,9% e homogeneizado suavemente, o sangue-solução salina foi passado para um novo tubo contendo 3mL de Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®) (Figura 4-A), e após esse procedimento o tubo foi centrifugado por 30 minutos à 1500 RPM, após a centrifugação os componentes do sangue ficaram separados (Figura 4-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 4-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 4-D), e centrifugado por 10 minutos à 1400 RPM, posteriormente descartou-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet de células (Figura 4-E) que foi ressuspensão em 5 ml de RPMI completo (Figura 4- F).

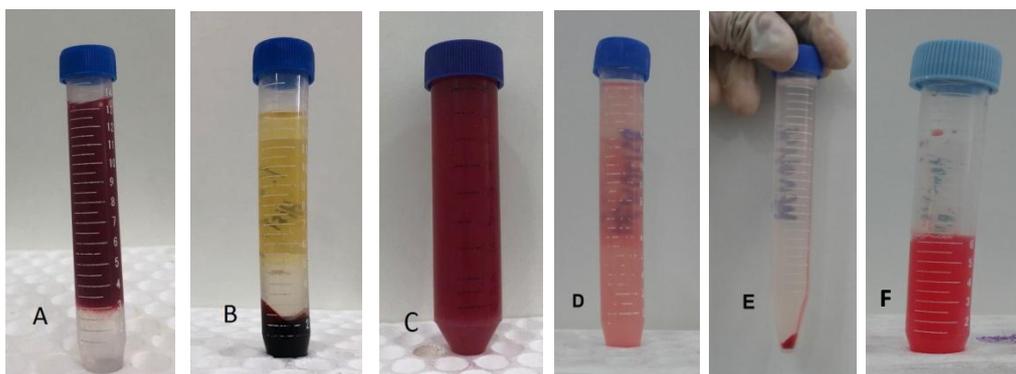


Figura 4: Ilustração da obtenção de leucócitos do sangue periférico. (A) Tubo falcon contendo sangue:salina (1:1) com histopaque. (B) Após centrifugação. (C) Lavagem das células com solução de hemólise. (D) Lavagem das células com solução salina. (E) Após centrifugação pellet de células. (F) Pellet ressuspensionado em 5 mL de RPMI completo.

Para a contagem total e diferencial das células obtidas 20  $\mu$ l da solução de células foram adicionados à solução de Turk (380  $\mu$ l), e as células foram contadas em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em

lâmina preparada com 20  $\mu\text{l}$  da solução de células em citocentrífuga (150 x g, 10 min, Cito-Spin). A lâmina foi corada (corante de Leishman) e observada em microscópio de luz com objetiva em óleo de imersão (100x). Foram contadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares – mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

#### 4.3.3.2 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. A solução de células e partículas foram incubadas em uma placa de cultura de 96 poços durante 60 minutos ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), posteriormente, as células foram citocentrifugadas e coradas (Figura 5). Foram contados 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):  $\text{IF} = \text{número médio de partículas fagocitadas/soma das células}$  (FERNANDES JUNIOR, 2006).

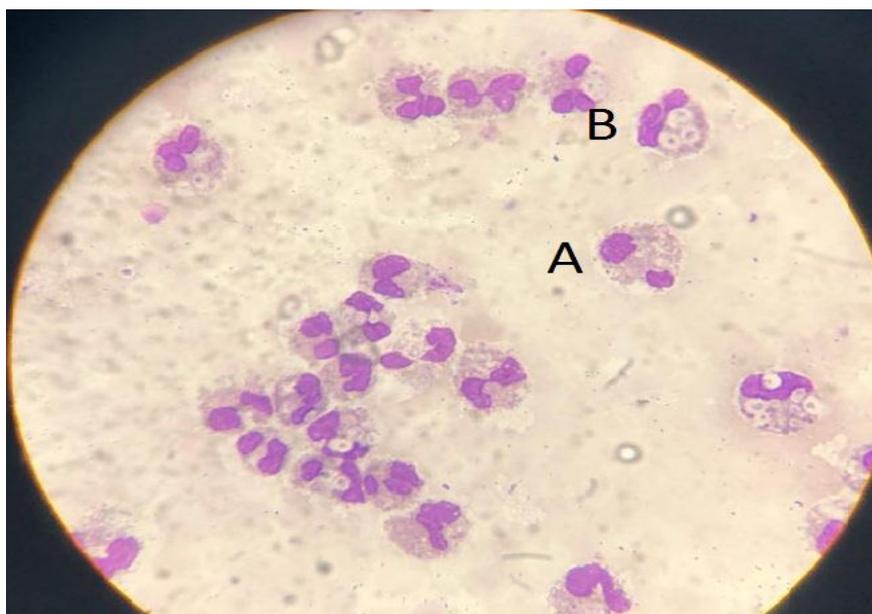


Figura 5: Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan (B).

#### 4.3.4 ENSAIO DE REDUÇÃO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT)

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi determinado estimando-se a produção de superóxido pelo teste citoquímico de redução espontânea do tetrazólio nitroazul (NBT), conforme descrito por Hallett e Wilson (1973). O NBT é um composto solúvel de coloração amarela que, quando reduzido dentro da célula, é convertido em grânulos insolúveis de formazan de coloração preto-azulada. Para o procedimento foi utilizada uma placa de petri onde foi colocada uma tampa de polipropileno bem no centro da placa e ao redor colocava-se gaze umidificada, após a organização do material adicionava-se 200 µl de sangue total e 200 µl de solução de trabalho de NBT na tampinha de polipropileno, posteriormente eram levadas para a estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C durante 25 minutos e após 10 minutos em temperatura ambiente era realizado o esfregaço sanguíneo, no qual, eram corado com o corante wright. O esfregaço sanguíneo foi examinado por microscópio de luz (40 x e 100 x imersão em óleo). A contagem de 100 neutrófilos por meio de microscopia óptica foi realizada a fim de determinar o número percentual de neutrófilos reativos ao NBT.

#### 4.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE MPO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A quantificação de MPO dos neutrófilos foi detectada através do método de citometria de fluxo. Para realização do teste foi utilizado 100 µl de amostra (leucócitos purificados em RPMI) que foram incubados com 7 µl de anticorpo monoclonal, de superfície anti-CD45 (PerCP) e anti-CD16 (PE) (BD Pharmingen TM California, USA, Exbio). Após 10 minutos de incubação (protegido da luz) foram adicionados 100 µL de reagente A do kit "Fixand Perm" (Nordic MUbio) ficando por 15 minutos protegido da luz. Em seguida foi adicionado 2mL de PBS em cada tubo com posterior centrifugação das células (3000 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi removido após a centrifugação, e foi adicionado 1mL de PBS, 100 µL de reagente B do kit "Fixand Perm" (Nordic MUbio) e o anticorpo monoclonal intracitoplasmático anti-Mieloperoxidase conjugado ao fluorocromo FITC (BD Pharmingen TM California, USA, Exbio). As células foram então analisadas no aparelho BD FACSCalibur pelo programa CellQuest Pro.

#### **4.4 Análise estatística**

Todos os dados obtidos nos grupos estudados foram comparados através de testes estatísticos apropriados, dependendo de sua distribuição. No caso de distribuição gaussiana foi utilizado o teste “t de Student” e ANOVA seguida do teste de Tukey. Para não gaussiana foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Em todas as análises efetuadas os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características gerais, clínicas e hematológicas dos pacientes com PV, TE e controles

A tabela 3 demonstra os dados dos indivíduos controles e pacientes do Hospital Ophir Loyola com PV e TE. Do período de Abril de 2017 à Abril de 2018 foram colhidas informações como: sexo, idade, raça e medicação quimioterápica a qual faziam uso até o momento da coleta. Nos pacientes houve uma prevalência do sexo feminino em ambas as doenças, a média de idade do diagnóstico da doença mostrou-se na quinta década de vida, 72% dos pacientes eram pardos e 82% deles faziam uso de HU como tratamento.

Tabela 3: Caracterização dos indivíduos controles e pacientes do hospital Ophir Loyola no período de Abril de 2017 à Abril de 2018 como sexo, idade, raça e medicação.

	<b>Controle</b> <b>N=21</b>	<b>PV</b> <b>N=17</b>	<b>TE</b> <b>N=29</b>
<b>Sexo</b>			
<b>Feminino</b>	14	10	21
<b>Masculino</b>	7	7	8
<b>Idade</b>			
	53±13*	54±17*	59±17*
<b>Raça</b>			
<b>Branco</b>	6	5	2
<b>Pardo</b>	12	7	26
<b>Negro</b>	3	5	1
<b>Medicação</b>			
<b>HU</b>	—	17	21
<b>Anagrelide</b>	—	—	8

PV- Policitemia vera, TE- Trombocitemia essencial, (—) sem uso, HU-Hidroxiureia. \*Média e desvio padrão.

## 5.2 Dados do hemograma, leucograma e plaquetas

Os pacientes que faziam uso de HU apresentaram valores de hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas dentro do estabelecido pela OMS para o controle citorrredutor das células. Da mesma forma o uso do Anagrelide apresentou o controle do número global das células hematológicas. Um ou outro parâmetro apresentou-se fora do preconizado.

Tabela 4: Valores dos parâmetros hematológicos, leucócitos e plaquetas dos pacientes com as NMPs de acordo com a medicação quimioterápica utilizada.

	<b>PV</b> <b>N=17</b>	<b>TE</b> <b>N=29</b>	
	<b>HU</b> <b>N=17</b>	<b>HU</b> <b>N=21</b>	<b>ANAGRELIDE</b> <b>N=8</b>
<b>PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS</b>			
Hemoglobina (g/dL)	13,0±2,3	12,9±2,5	13,0±1,9
Hematócrito (%)	39,4±6,3	39,7±5,5	39,1±5,6
Leucócitos (mil/mm <sup>3</sup> )	7,367±3,8	5,827±2,0	8,894±3,2
Plaquetas (mil/mm <sup>3</sup> )	285±94	529,5±165,9	564,2±247,5

Dados expressos em média ± desvio padrão Abreviaturas: TE- Trombocitemia essencial; PV- Policitemia vera.

A análise do valor absoluto dos neutrófilos e linfócitos serve para nortear se a medicação está sendo citotóxica para estas células. De acordo com o protocolo utilizado pela clínica médica do hospital, os neutrófilos devem estar acima de 1.000-1.500 e linfócitos devem estar acima de 1.000. Esses valores norteam a continuação do tratamento ou uma possível troca de medicação. Em relação à análise do número absoluto de neutrófilos e linfócitos dos pacientes com PV, foi observado que 94% e 71% deles não apresentaram neutropenia e linfopenia respectivamente.

Nos subgrupos portadores de TE, os que faziam uso de HU não apresentaram neutropenia e apenas 10% estavam com linfopenia. O subgrupo que fazia uso de anagrelide não apresentou nem neutropenia e nem linfopenia. Comparando os valores absolutos de neutrófilos entre os grupos observou-se diferença significativa apenas entre os grupos com PV e os subgrupos com TE entre os subgrupos portadores de TE não houve diferença. Da mesma forma foram comparados os valores absolutos de linfócitos apresentando diferença apenas entre os grupos com PV e TE em uso de HU.

Tabela 5: Valores de neutrófilos e linfócitos absolutos de acordo com a medicação dos pacientes com PV e TE.

	<b>PV N=17</b>		<b>TE N=29</b>	<b>p-Valor</b>
	HU (N=17)	HU (N=21)	Anagrelide (n=8)	
<b>Nº absoluto de neutrófilos</b>	4.744±1.260	3,638±1.780	5.782± 3.404	0,0001
<b>Nº absoluto de linfócitos</b>	1.354±448	1.752±1.006	2.233±885	0,0001

Dados expressos em média ± desvio padrão Abreviaturas: TE- Trombocitemia essencial; PV- Policitemia vera; Nº= número.

### 5.3 Avaliação da Função Fagocítica

Para avaliar a função fagocítica foram comparados o índice fagocítico nos indivíduos controle e pacientes com PV e TE que faziam uso da HU. Os pacientes portadores de PV apresentaram menor IF que os indivíduos do grupo controle, com  $p=0,0002$  ( $2.83\pm 1,28$ ;  $3.83\pm 1,38$  respectivamente). O mesmo foi observado nos pacientes com TE que apresentaram menor índice que os indivíduos controles com  $p=0,0002$  ( $2.85\pm 1,34$ ;  $3.83\pm 1,38$  respectivamente) (Figura 6).

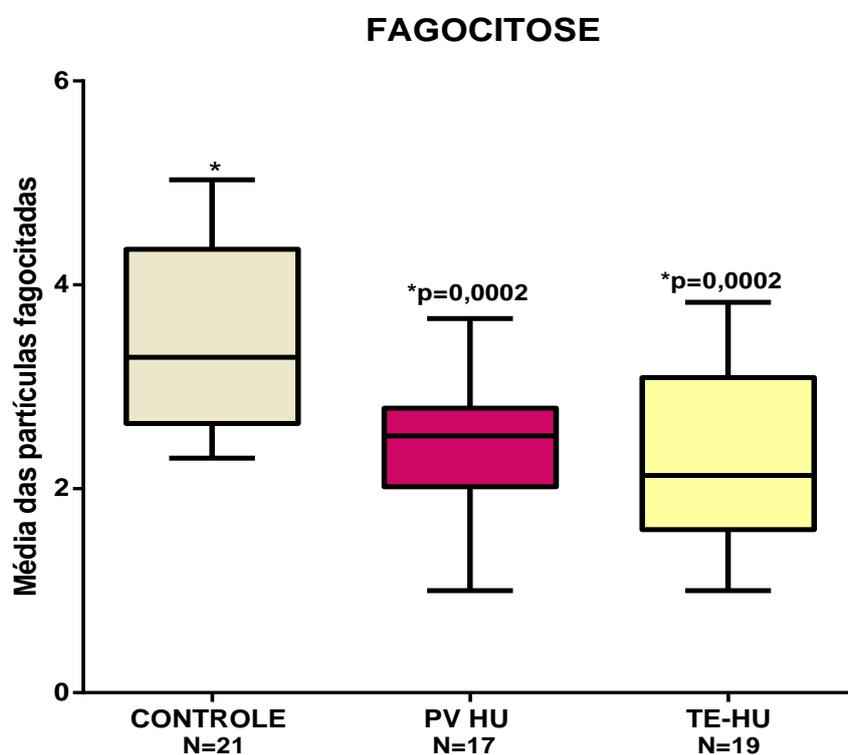


Figura 6: Capacidade fagocítica de controle e pacientes com neoplasia mieloproliferativa crônica do grupo PV e TE. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais os valores mínimos e máximos. \* $p<0,05$  (t-student).

Os pacientes com TE foram subdivididos em dois subgrupos de acordo com a medicação que faziam uso, HU ou anagrelide. Nossos resultados mostraram que o subgrupo que fazia uso de anagrelide não apresentou diferença do índice fagocítico quando comparado ao grupo controle, com  $p=0,7960$  ( $4,2\pm 1,5$ ,  $3,83\pm 1,38$  respectivamente). Além da comparação com o controle, os subgrupos portadores de TE foram comparados entre si com o intuito de saber se houve diferença na função fagocítica dos neutrófilos sob efeito de HU e anagrelide nossos resultados mostraram que não houve diferença no IF com  $p= 0,9333$  ( $2,85\pm 1,34$ ;  $2,87\pm 0,87$ ).

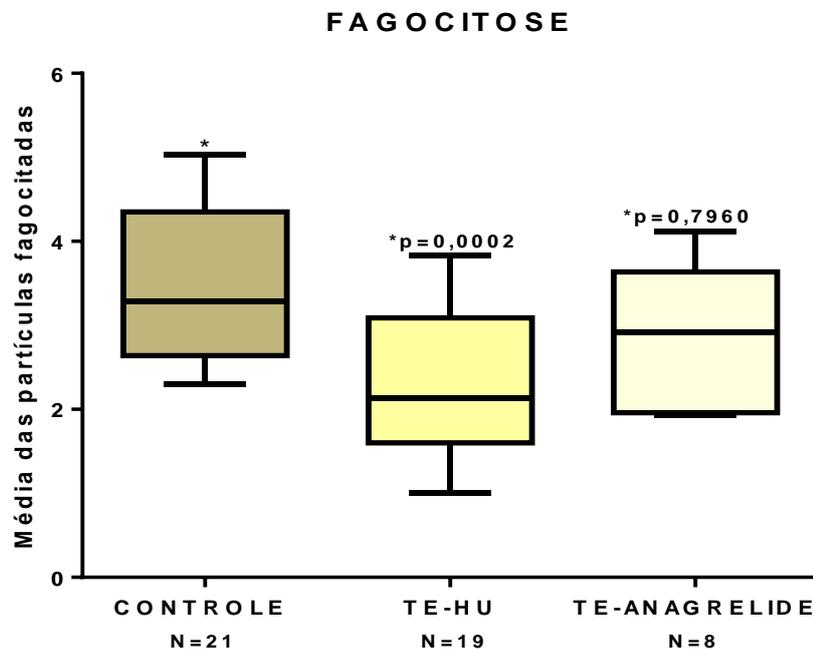


Figura 7: Capacidade fagocítica *in vitro* de controles e pacientes com trombocitemia essencial em tratamento com HU e anagrelide. As barras representam as medianas (linha horizontal) e os percentis 25% e 75%, e as linhas verticais o valor mínimo e máximo.  $*p<0,05$  (Anova).

#### 4.4 NBT

Considerou-se neutrófilo NBT-positivo quando este 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.

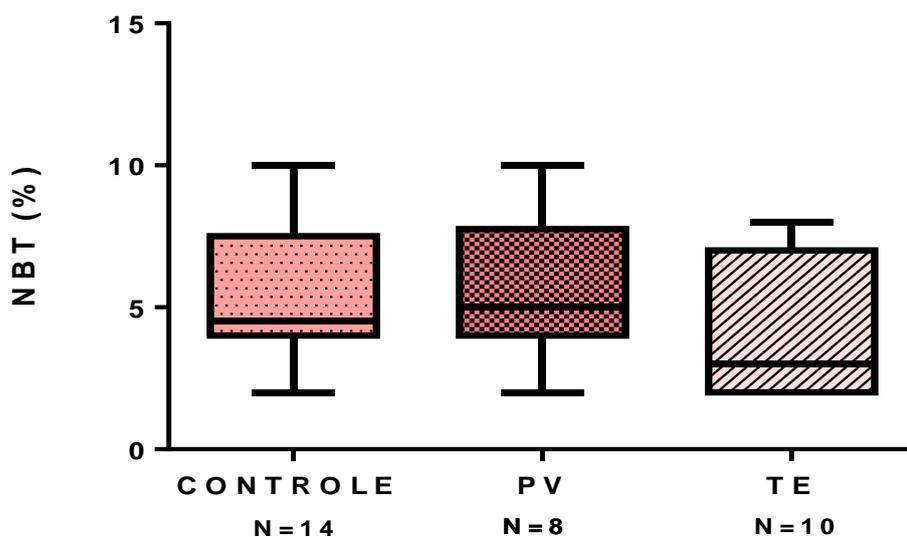
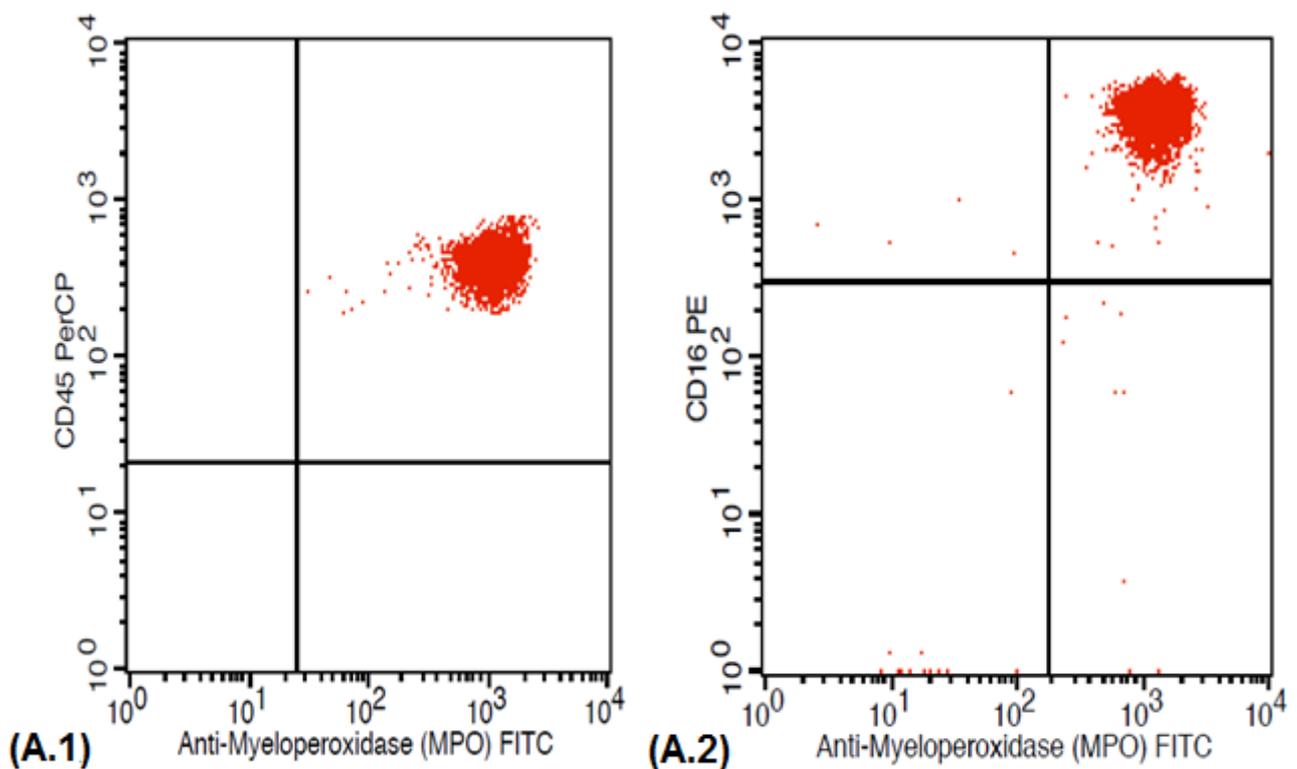


Figura 8: Percentual de neutrófilos NBT positivos em controles e pacientes com PV e TE.  $p < 0,05$  (Mann-Whitney).

#### 4.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A análise das células no citômetro de fluxo mostrou a predominância de células polimorfonucleares (Figura 9) tanto em indivíduos controle quanto nos pacientes com PV e TE, o predomínio da população de neutrófilos permitiu observar por meio de representação gráfica a percentagem de MPO dos neutrófilos nas amostras.

O teste de MPO foi realizado em 8 indivíduos controles, 8 pacientes com PV e 12 pacientes com TE, sendo que todos os pacientes com NMPs estavam sob regime do tratamento com HU. Nossos resultados mostraram que não houve diferença entre o grupo controle e os pacientes do grupo com PV, com  $p=0,8438$  ( $98,47\pm 1,15$ ;  $98,54\pm 1,46$  respectivamente), o mesmo foi observado com os controles e portadores de TE, com  $p=0,5842$  ( $98,47\pm 1,15$ ;  $97,93\pm 3,21$  respectivamente).



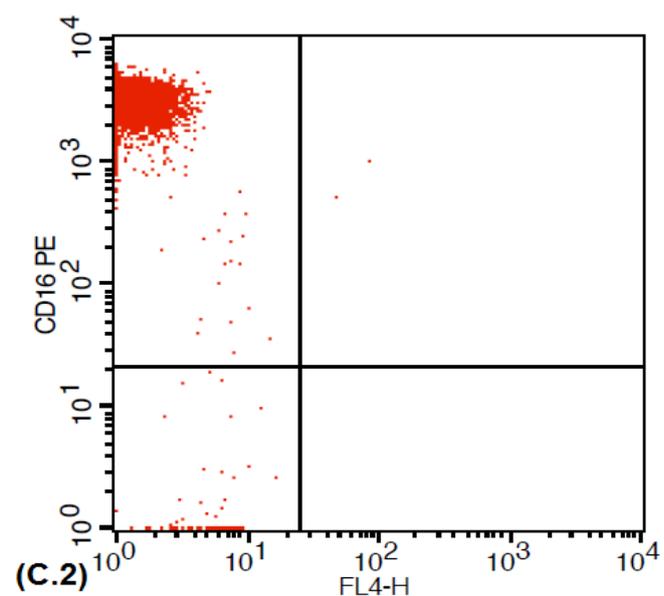
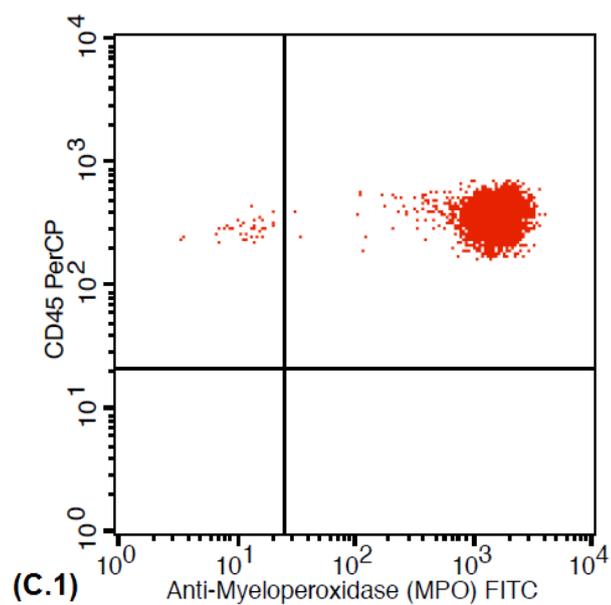
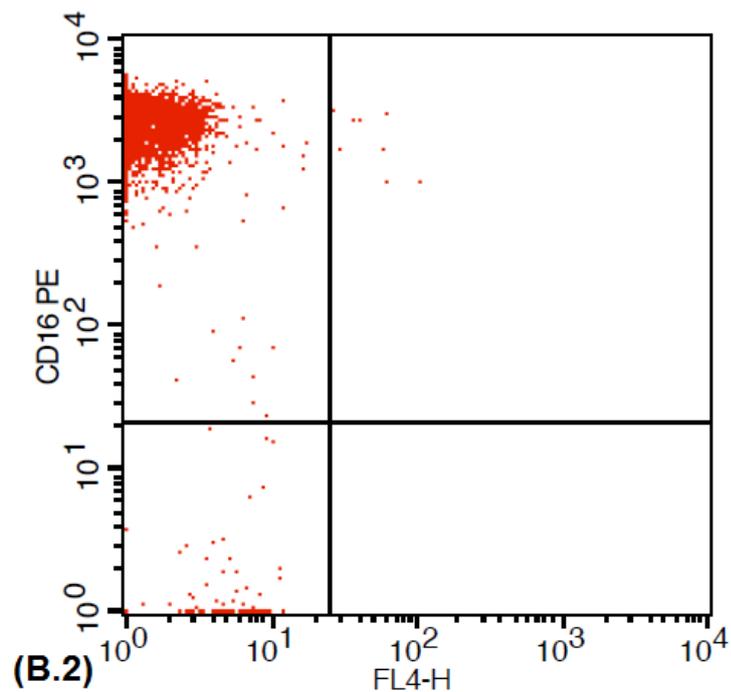
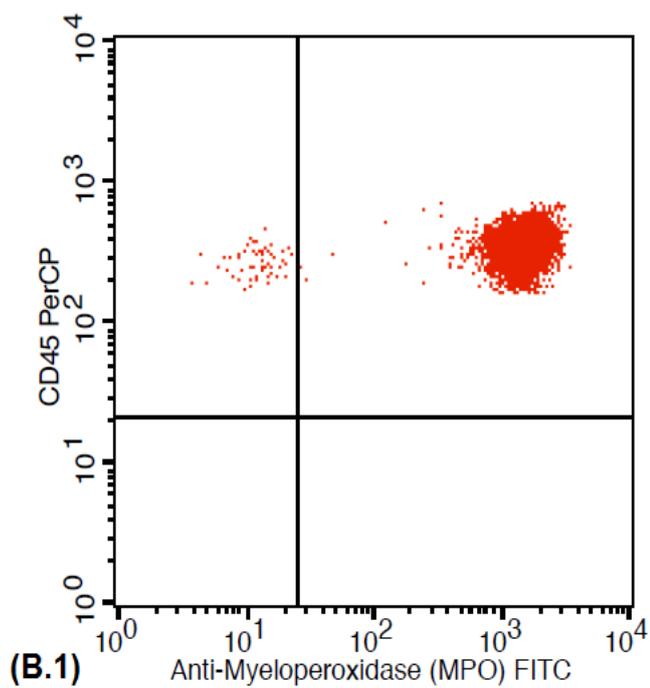


Figura 9: Citogramas representativos das células conservadas em RMPI, obtidas do sangue periférico de paciente controle (A.1 e A.2), paciente com TE (B.1 e B.2) e paciente com PV (C.1 e C.2). Anticorpo anti CD45-PerCP, CD16-PE e MPO-FITC.

## 5 Discussão

A PV e a TE fazem parte das NMPs Ph<sup>1</sup> negativas clássicas que envolvem linhagem eritrocítica e megacariocítica, respectivamente. São neoplasias que são tratadas com medicações quimioterápicas citorrredutoras, e caracterizam-se pela proliferação exacerbada de células sanguíneas da linhagem mieloide. Apresenta hipersensibilidade ou independência das células a regulação das citocinas (CAMPBELL et al. 2005; MOURA, 2012). No Brasil, as estimativas para o surgimento de doenças onco-hematológicas como, por exemplo, LMC e LMA apresentam informações de incidência, contudo, ainda não há um registro epidemiológico individualizado para as NMPs Ph<sup>1</sup> negativas. Os pacientes com NMPs Ph<sup>1</sup> negativas ficam em regime de tratamento de forma crônica. Dentre as medicações de uso, a quimioterapia mais utilizada é a HU. Alguns estudos mostram que a HU altera a expressão de receptores dos neutrófilos. Diante das informações, esse estudo objetivou avaliar de forma quantitativa e qualitativa os neutrófilos de pacientes com PV e TE sob o uso das medicações quimioterápicas.

Em nossos resultados a média de idade dos pacientes com PV e TE mostrou-se semelhante ao encontrado na literatura. Estudos como o de Hurtado-Nedelec et al. (2013) mostrou uma média de idade de 74 anos em PV e 68 em TE. As NMPs Ph<sup>1</sup> negativas são patologias essencialmente do adulto (50-70 anos), no entanto, há uma incidência de aproximadamente 15% abaixo dos 40 anos para pacientes com TE e para PV pode também surgir em idades abaixo dessa faixa etária, na TE há discreta prevalência no sexo feminino 2F:1M. Os dados da literatura mostram que a PV incide mais em homens do que em mulheres, porém, nossos resultados mostraram uma prevalência do sexo feminino em ambas as doenças (CHAUFFAILLE, 2010; BITTENCOURT et al. 2010).

As manifestações clínicas de PV e TE são semelhantes, pois ambas são primariamente caracterizadas por um alto risco de trombose, hemorragia, evolução para MF, LMA e, menos comumente, MDS. Por tais fatores, as terapias atuais empregadas para o tratamento têm como objetivo prevenir algumas manifestações clínicas, como eventos trombóticos, tromboembólicos e hemorrágicos (VANNUCCHI e HARRISON, 2017). Diretrizes para o manejo de PV e TE sugerem controle do hematócrito e normalização da contagem de plaquetas respectivamente, além do controle da contagem de leucócitos, pois é um fator de risco para surgimento de trombose.

Os cuidados com o controle desses parâmetros são extramamente importantes, pois a expectativa de vida é reduzida em pacientes de alto risco, e com cuidados cotidianos, a sobrevida média é de 10,9 anos para pacientes com PV, porém, para TE com baixo risco, alguns pesquisadores relatam uma razão de mortalidade padronizada (VANNUCCHI e HARRISON, 2017).

Neste estudo, os resultados quantitativos do hemograma, leucograma e plaquetas demonstraram-se concordantes com o preconizado pela OMS (2016) para o controle da não ocorrência de eventos trombóticos, os pacientes tanto do grupo portador de PV e TE apresentaram uma média do hematócrito menor que 45%, as plaquetas de ambos os grupos apresentaram-se dentro do estabelecido e a contagem de leucócitos estava próximo dos valores normais, o que justifica que 86% (40) dos pacientes apresentavam-se assintomáticos, 14% (6) apresentaram uma alteração de um ou outro parâmetro. A redução de apenas um parâmetro é considerado sub-ótimo quando o outro parâmetro ainda é elevado (BUXHOFER-AUSCH, 2018);(VANNUCCHI e HARRISON, 2017).

Em relação ao número absoluto de neutrófilos e linfócitos e de outras células, vários estudos mostram que a avaliação da expressão de neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas no sangue acrescentam informações prognósticas aos critérios tradicionalmente empregados, como o estadiamento e as características morfológicas do tumor. Diversos estudos demonstram que o número absoluto de neutrófilos e linfócitos são importantes para o prognóstico e estadiamento da doença. A relação neutrófilo/linfócito (RNL) é considerada um teste preditor de prognóstico validados em alguns tipos de câncer, é recomendado como uma ferramenta auxiliar na definição quanto à escolha do tratamento adjuvante (GOLDSTEIN et al. 2015; VALPIONE et al. 2015; FARIA, 2016).

Referente às NMPs Ph<sup>-1</sup> negativas clássicas a análise do valor absoluto destas células, está voltada para avaliar o estado imunológico do paciente, e observar possível toxicidade hematológica devido ao tratamento, no qual, são analisados para manter ou suspender a quimioterapia empregada. Nossos resultados mostraram que os grupos de pacientes com PV e TE não apresentaram neutropenia, apenas 29% do grupo com PV e 8% do grupo com TE que fazia uso de HU apresentaram linfopenia, indicando um controle do úmero global dessas células sem causar efeito mielossupressor.

O neutrófilo é uma das células mais importantes do sistema imunológico, frente a uma infecção ou lesão tecidual permite a sobrevivência do indivíduo a diversos agentes lesivos e mantém a homeostase dos tecidos sob uma variedade de condições nocivas (SRIKRISHNA e FREEZE, 2009; VITAL, 2015).

PV e TE são tratados com aspirina, venecção (PV) e uso selecionado de HU, interferão ou anagrelide. Dentre os medicamentos citorredutores, a HU é indicada como terapia de primeira linha. Alguns estudos randomizados apresentaram efeitos eficazes na revascularização da trombose em pacientes de TE de alto risco. Em caso de falha na citorredução, substitui-se então a HU por anagrelide ou interferon, no entanto, em um estudo comparativo entre HU e anagrelide associado a uma dose baixa de aspirina em ambos os braços, anagrelide foi inferior a HU em termos de resposta, em relação, a incidência de trombose arterial, sangramento e diminuição da transformação mielofibrótica (VITAL, 2015);( REIKVAM e TIU, 2012).

PV e TE são tratados com aspirina, venecção (PV) e uso selecionado de HU, interferão ou anagrelide. Dentre os medicamentos citorredutores, a HU é indicada como terapia de primeira linha. Alguns estudos randomizados apresentaram efeitos eficazesna revascularização da trombose em pacientes de TE de alto risco. Em caso de falha na citorredução, substitui-se então a HU por anagrelide ou interferon, no entanto, em um estudo comparativo entre HU e anagrelide associado a uma dose baixa de aspirina em ambos os braços, anagrelide foi inferior a HU em termos de resposta, em relação, a incidência de trombose arterial, sangramento e diminuição da transformação mielofibrótica (VITAL, 2015);( REIKVAM e TIU, 2012).

O IFN-a apesar de induzir cerca de 80% de respostas hematológicas em PV e TE apresentam como principal problema a incidência de efeitos colaterais. Febre e sintomas semelhantes à gripe são sentidos pela maioria dos pacientes e geralmente requerem tratamento com paracetamol. Sintomas mais graves, como fraqueza, mialgia e humor deprimido, muitas vezes levam à descontinuação do tratamento. Por diversos efeitos benéficos comprovados como a diminuição de plaquetas e leucócitos a HU é o medicamento mais utilizado nos pacientes do nosso estudo, cerca de 83%(38) utilizavam a HU como quimioterapia citorredutora, e apenas 17% (8) usavam anagrelide. Vannucchi e Harrison (2017) em sua revisão sobre a emergência

no tratamento das NMPs afirmaram que a terapia de primeira linha permanece abaixo do ideal, apesar de tantos benefícios clínicos, existe um risco contínuo de trombose, hemorragia, comprometimento da qualidade de vida e risco de transformação.

Há poucos estudos sobre o papel dos neutrófilos nas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas, que é uma célula que exerce importante indução e perpetuação na inflamação. Vital (2015) ao estudar o efeito da HU na adesão celular *in vitro* de neutrófilos sob condições inflamatórias obteve como resultado que o tratamento crônico com a HU diminui as propriedades adesivas dos neutrófilos.

Além da diminuição do número global de neutrófilos, a HU pode ter algum efeito direto sobre funções essenciais desta célula, visto que o neutrófilo é um dos alvos principais do medicamento. Após experimento realizados com partículas de zimosan, avaliamos a função de fagocitose dos neutrófilos de acordo com a medicação utilizada. Nossos resultados mostraram que ao comparar o IF do grupo controle com os grupos portadores de PV e TE que faziam uso da HU, foi significativamente menor em ambos os grupos, demonstrando que frente a uma partícula estranha a capacidade desta célula de fagocitar apresentou-se diminuída. Nestas neoplasias uma das características é a maturação celular preservada, podendo apresentar alterações nas suas funções. Diante do exposto, sugere-se que a utilização dessa quimioterapia citorreutora pode estar alterando a fagocitose de neutrófilos que pode ser prejudicial ao paciente, visto que, essa é uma das funções de grande importância na defesa do organismo frente a agentes estranhos.

Além do uso da HU, uma parte do grupo portador de TE fazia uso do anagrelide, esse medicamento funciona inibindo a maturação dos megacariócitos. O mecanismo de ação ainda não é claro, porém, algumas evidências sugerem que seja um inibidor da fosfodiesterase. O anagrelide tem uma potente atividade redutora de plaquetas desprovida de potencial leucemogênico. É uma terapia que não age na síntese do DNA, além de não ter efeitos diretos sobre os neutrófilos, o que pode ser uma das explicações para o IF de neutrófilos desses pacientes tratados com anagrelide não apresentarem diferença com o grupo controle. É um medicamento que é escolhido quando o paciente não corresponde ao tratamento com a HU, porém, tem seus efeitos benéficos quanto a prevenção de trombose venosa (REIKVAM e TIU, 2012).

Com o intuito de saber se além da fagocitose outras funções dessa célula poderiam estar comprometidas, foi realizado neste trabalho o teste de NBT. Através desse teste é possível saber se o sistema NADPH oxidase inicia um processo denominado explosão respiratória. Os neutrófilos quando estimulados, manifestam um aumento do consumo de oxigênio esse mecanismo produz grandes quantidades de supéroxido e peróxido de hidrogênio, apresentam extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos(ZINKL e KABBUR 1997; AFONSO et al. 2002). Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos dos pacientes com PV e TE. Isso significa que a produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase não se apresenta alterada independente da medicação quimioterápica utilizada (AFONSO et al. 2002).

No estudo de Hurtado-Nedelec et al. (2013), pacientes com PV e TE associados à mutação JAK2 V617F apresentaram um aumento na produção de EROs. A mutação JAK2 V617F resulta em um ganho de função e induz a tirosina a ter uma constante atividade de quinase e de induzir uma hiperativação de neutrófilos, o que pode justificar que independente da menor capacidade de fagocitose dos neutrófilos encontrada neste estudo, a formação de EROs não estar alterada pode ser justificada por essa hiperativação de neutrófilos.

Além da importância da ativação do sistema NADPH oxidase, uma das espécies reativas de oxigênio fundamental no contexto biológico é o HOCl, pois é a espécie que gera a morte de organismos patogênicos que entram em contato com a corrente sanguínea. A sua origem se dá através da ação catalítica da MPO, que é a única enzima capaz de catalisar a oxidação de cloreto a ácido hipocloroso. Neste trabalho foi possível quantificar a enzima MPO através da citometria de fluxo, ao ser analisado entre o grupo controle e os pacientes com as NMPs em tratamento com a HU, foi demonstrado que não houve diferença de MPO, expressando que independente da quimioterapia citorrredutora os neutrófilos liberam esta enzima em concentração adequada para exercer sua função (DYPBUKT et al. 2005,PESSOA, 2009).

## 6 CONCLUSÃO

- Os pacientes que faziam uso do tratamento citorrredutor com HU e anagrelide apresentaram o número de neutrófilos dentro do estabelecido para o controle da doença;
- Os pacientes portadores de PV e TE que faziam uso de HU apresentaram alterações qualitativas nos neutrófilos, onde o uso de HU diminuiu a atividade fagocítica dos neutrófilos nestes pacientes;
- O mesmo não ocorreu com o grupo de pacientes com TE que fazia uso de anagrelide. A atividade fagocítica dos neutrófilos não evidenciou alteração;
- Nos grupos portadores de PV e TE em tratamento com HU, não apresentaram alteração no metabolismo oxidativo dos neutrófilos e na quantificação da enzima de MPO.

Estudos adicionais serão necessários para melhor elucidar de que forma o tratamento com HU pode estar alterando algumas funções neutrofílicas nas NMPs Ph<sup>1</sup> negativas.

## 8 REFERÊNCIAS

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.

ALMEIDA, C.B.; Scheiermann, C.; Jung-Eun, J.; 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.

ARBER, D.A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

BARBUI, T.; THIELE, J.; PASSAMONTI, F.; et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 23, p. 3179-84, Ago. 2011.

BEER, P.A.; GREEN, A.R. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 621-628, 2009.

BENJAMIN CUMMINGS. **Parotid Tumors**. 2004. Disponível em: <[www.downstatesurgery.org/files/cases/parotid\\_tumors.pdf](http://www.downstatesurgery.org/files/cases/parotid_tumors.pdf)>.

BITTENCOURT, R. I.; PONCELET, K.; ALMEIDA, A.C.C.; FASSINA, K.; ONSTEN, T.G. Trombocitose essencial: o que é essencial saber. **Rev Bras Hematol. Hemoter**. Porto Alegre. v. 32, n. 2, p. 162-70, 2010.

BUXHOFER-AUSCH, V.; STEURER, M.; SORMANN, S. Impact of white blood cells on thrombotic risk in patients with optimised platelet count in essential thrombocythemia. **Eur J Haematol**, Mar. 2018.

CAMPBELL, Peter J. et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. **The Lancet**, v. 366, n. 9501, p. 1945-1953, 2005.

CAMPBELL, P. J.; GREEN, A. R. The myeloproliferative disorders. **N Engl J Med**, v. 355, n. 23, p. 2452-66, Dez. 2006.

CANALLI, A.A. **Função e expressão das integrinas nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme**. 2004. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CAMPO, E.; SWERDLOW, S. H.; HARRIS, N. L.; PILERI, S.; et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5019-5032, Mai. 2011.

COVAS, D.T.; ANGULO, I.L.; PALMA, P.V.B.; ZAGO, M.A.; et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.

DEFOUR, J.P.; ITAYA, M.; GRYSKOVA, V.; et al. Tryptophan at the transmembrane–cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. **PNAS**, v. 110, n. 7, p. 2540-2545, Fev. 2013.

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.

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.

FDA. **AGRYLIN**. 063 0117 019. 08 de out. de 2010. Disponível em: <<http://https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda.../020333s017lbl.pdf>>.

GAMBERO, S.; CANALLI, A.A.; TRAINA, F.; et al. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **European journal of haematology**, v. 78, n. 2, p. 144-15, 2007.

GASPAROTTO, E.P.L. **Expressão de genes e proteínas anti-e-pró-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera**. 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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.

HURTADO-NEDELEC, M.; CSILLAG-GRANGE, M-J.; BOUSSETTA, T.; et al. Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. **Haematologica**, v. 98, n. 10, p. 1517-1524, 2013.

JONES, A. V.; CROSS, N. C. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. **Ther Adv Hematol**, v. 4, n. 4, p. 237-53, Ago. 2013.

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.

LEVINE, R.L.; WADLEIGH, M.; BENJAMIN, J.C. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Cancer Cell**, v. 7, p. 387-397, Abr. 2005.

LEVINE, R.L.; GILLILAND, D.G. Myeloproliferative disorders. **Blood**, v. 112, n. 6, p.2190-2198, Set. 2008.

MONTE-MÓR, B.C.R.; COSTA, F.F. A mutação *JAK2* V617F e as síndromes mieloproliferativas. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 30, n.3, p. 241-248, 2008.

MOURA, L. G. **Expressão de Galectinas-1 e 3 em Neoplasias Mieloproliferativas**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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.

PEDRAZZANI, F.S. **Impacto da análise molecular da mutação *JAK2V617F* no diagnóstico de neoplasiasmieloproliferativas crônicas de acordo com os critérios da OMS 2016**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

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.

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

REIKVAM, H.; TIU, RV. Venous thromboembolism in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. **Leukemia**, v. 26, p. 563–571, 2012.

SANTOS, L.C. **Estudo citogenético e pesquisa de mutações nos genes JAK2 e MPL em Policitemia vera, Mielofibrose primária e Trombocitemia essencial.** 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

SEGUIN, C.S. **Influência da hidroxiuréia nas propriedades adesivas de neutrófilos e plaquetas.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

TEFFERI, A.; BARBUI, T. Personalized management of essential thrombocythemia—application of recent evidence to clinical practice. **Leukemia**, v. 27, n. 8, p. 1617-1620, 2013.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms A Contemporary Review. **JAMA Oncology**. v.1, n. 1, p. 97-105, Abr. 2015.

VITAL, D.M. **Efeito da hidroxiureiana 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.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R.; Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667-679, Fev. 2018.

VANNUCCHI, A.M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. **CA CANCER J CLIN**. v. 59, p. 171-191, Mai/Jun. 2009

VANNUCCHI, A.M.; HARRISON, C.N. Myeloproliferative neoplasms: Emerging Treatments for Classical Myeloproliferative Neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, Fev. p. 693-703, 2017.

**ANEXO**

Fórmula do Cálculo Amostral

Fórmula =  $n = N \times N_0 / N + N_0$

n= número de amostra necessário para a pesquisa

N= População global

N<sub>0</sub>= Fator de erro

Dados necessários:

Fator de erro= 44

N= 105

$n = 105.44 / 105 + 44 = 31$