



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPRESSOR DO MESILATO  
DE IMATINIBE SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOIÉTICAS E CÉLULAS DO ESTROMA DA MEDULA  
ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

PÂMELA DE BRUM SOARES

Florianópolis-SC  
2009

PÂMELA DE BRUM SOARES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPRESSOR DO MESILATO  
DE IMATINIBE SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOIÉTICAS E CÉLULAS DO ESTROMA DA MEDULA  
ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Farmácia na área de concentração em  
Análises Clínicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina – UFSC.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri

Florianópolis-SC  
2009

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S676a Soares, Pâmela de Brum  
Avaliação do potencial mielossupressor do mesilato  
de imatinibe sobre células progenitoras hematopoiéticas  
e células do estroma da medula óssea de camundongos  
[dissertação] / Pâmela de Brum Soares ; orientadora,  
Cidônia de Lourdes Vituri. - Florianópolis, SC, 2009.  
120 f.: il., grafs., + ; anexos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de  
Pós-graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Medula óssea. 3. Estroma. 4. Mesilato de  
Imatinibe. 5. Mielossupressão. I. Vituri, Cidônia de  
Lourdes. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

*Dedico este trabalho às pessoas que mais  
amo e mais me apoiaram durante este  
processo de aprendizagem, meus pais  
Carmen Cássia e José Mario,  
e minha irmã Tahiane.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Cidônia que há 3 anos me acompanha nas descobertas do maravilhoso mundo das culturas de células. Agradeço por acreditar no meu potencial, por depositar seu voto de confiança no meu trabalho, por me incentivar nas horas mais difíceis, pelo bom-humor diante das dificuldades, pela aceitação “forçada” das minhas viagens semanais para o RS, enfim, este trabalho não existiria sem sua orientação.

Ao Lucas Maróstica, que foi um “anjo que caiu do céu” no momento exato em que minha vida tomou rumos inesperados. Meu braço forte do laboratório, meu companheiro de camundongadas, a pessoa que certamente tornou possível a conciliação entre aluna de mestrado e farmacêutica da UFSM/CESNORS. Além disso, um amigo pelo qual torço muito.

À Larissa Christofolletti, por ter me introduzido aos grandes desafios de trabalhar com cultura primária, quem me auxiliou desde o dia que cheguei ao laboratório de Citologia Clínica.

A todos que estiveram presentes no laboratório, Elaine, André, Carol e prof<sup>a</sup> Patrícia, por auxiliarem de alguma forma ou de outra e, principalmente, por “aguentarem” os nossos maravilhosos camundonguinhos em dias de experimento.

Aos meus grandes amigos em Floripa (porém gaúchos), Junior da Rosa, Fernando Sagebin, Patrícia Pozzatti e Sílvia Helena Miollo. As divagações de pós-graduandos, as bobagens jogadas ao vento em mesas de bar, as pizzas em excesso e tudo mais ... os momentos mais divertidos certamente foram ao lado de vocês!

Agradecimento especial ao Fernando Sagebin, o Ferdi. Meu companheiro de longas conversas ao telefone escorados no balcão da farmácia naqueles domingos à noite ou 31 de dezembro, meu consultor de estatística que muitas vezes me mostrou a luz no fim do túnel, meu amigo de coração, também tem um pedacinho seu neste trabalho.

À Marley Licínio, pelo enorme apoio e paciência, por estar sempre disponível a ajudar e explicar o que fosse preciso, uma pessoa de muito bom coração. Você também está nas entrelinhas deste trabalho.

À Talita Jeremias e Álvaro Celmer, por permitirem que eu atrapalhasse a rotina de laboratório de vocês para fazer umas “coisinhas” minhas e ainda por ajudarem bastante nessas tarefas.

Aos meus colegas de trabalho da UFSM/CESNORS, principalmente, Mabel Molinari e Joviana Ceolin. Além de grandes amigas que posso contar sempre, foram minhas incentivadoras, foram as pessoas que me ajudaram a liberar a tensão entre um artigo e outro, que conseguiam muitas vezes me desconcentrar com assuntos nada peculiares. Obrigada por segurarem as pontas na minha ausência!

Agradeço a todas as pessoas que passaram na minha vida durante essa jornada. Algumas nem fazem mais parte dela, mas contribuíram muito para eu ter chegado aqui. Pessoas que nem sabiam, mas estavam me ajudando de alguma forma, nem que fosse para

desestressar. Obrigada aos meus colegas, amigos, pessoas que conheci através deste trabalho e pessoas que conheço já há bastante tempo.

Agradeço aos meus avós Emídio e Dirce Brum, que mesmo estando longe, sempre estiveram presentes através de telefonemas, lembranças, preocupações.

Não existem palavras para agradecer à minha família. Minha mãe, meu pai e minha irmã, que são as pessoas que mais amo no mundo e aconteça o que acontecer, sei que sempre estarão ao meu lado. A vocês que sempre me mostraram o caminho e me deram o livre arbítrio de escolher tudo o que fiz até hoje, obrigada, pois acho que segui sempre pelos melhores caminhos.

E para encerrar, a entidade mais importante, que sempre sabe o melhor para mim, DEUS. Se hoje cheguei aqui, não tenho a menor dúvida que Ele me guiou e proporcionou que tudo ocorresse na hora que tinha que ser. Nem tudo deu certo, claro, mas o que deu errado aconteceu na hora mais certa que podia ter sido, e os caminhos se abriram e se abrem continuamente, inexplicavelmente.

## **AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES**

Agradecemos a colaboração dos seguintes laboratórios:

Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), CCB - UFSC, sob orientação do professor Márcio Alvarez da Silva.

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias – LOEH, Departamento de Análises Clínicas, CCS – UFSC, sob orientação da professora Maria Cláudia Santos da Silva.

Laboratório de Imunologia Aplicada - LIA, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), CCB – UFSC, sob orientação do professor Carlos Roberto Zanetti.

Aos orientadores, nosso agradecimento e reconhecimento por permitirem a realização de experimentos junto aos seus laboratórios, pela orientação e disposição dos seus alunos em auxiliar nas etapas deste processo.

*"Nada acontece por acaso".*

## RESUMO

Os agentes antineoplásicos atingem células que estão em processo de divisão celular, assim, a rápida taxa de renovação celular e diferenciação da medula óssea (MO) tornam o sistema hematopoiético um alvo suscetível à toxicidade por esses agentes. A MO é formada por um estroma composto de muitos tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e adipócitos) e uma matriz extracelular que juntos formam um microambiente ideal favorecendo a modulação da quiescência, auto-renovação e comprometimento de células-tronco mesenquimais (CTMs), bem como, proliferação, maturação e apoptose de células hematopoiéticas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do Mesilato de Imatinibe (MI), um fármaco inibidor de proteínas e receptores tirosinoquinases como c-Kit, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de célula-tronco (SCF), c-Abl, BCR-ABL envolvidos em diferentes vias de sinalização celular; sobre células progenitoras hematopoiéticas (CFU-GM) e células do estroma da MO de camundongos saudáveis. Por meio de ensaios clonogênicos em meio semi-sólido e cultura de células aderentes do estroma da MO, avaliamos o potencial mielossupressor do MI através de ensaio de viabilidade celular MTT e Laranja de Acridina/ Brometo de Etídio (LA/BE), citoquímica para identificação de adipócitos, ciclo celular, proliferação celular por incorporação do BrdU e expressão de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Quanto às células hematopoiéticas, os resultados demonstraram que o MI reduziu gradativamente o crescimento de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM), a  $IC_{50}$  obtida foi 26,5 $\mu$ M e a inibição total ocorreu em 60 $\mu$ M. Quanto às células do estroma, no 4º e 8º dias de cultura, não houve diferença significativa no percentual de proliferação avaliado pela incorporação de BrdU, sendo que em 10 $\mu$ M houve uma tendência em aumentar a proliferação. No 14º dia a proliferação diminuiu gradativamente e com 7,5 $\mu$ M a proliferação foi reduzida a aproximadamente 5%. O percentual de células viáveis por MTT foi semelhante no 7º e 14º dias, aumentando até 10 $\mu$ M e então reduzindo até atingir 0% em 25 $\mu$ M. A morfologia da maioria das células não tratadas e células tratadas com baixas concentrações de MI (2,5 $\mu$ M) era tipicamente fibroblástica, e conforme se aumentou a concentração de MI (principalmente a partir de 10 $\mu$ M), predominaram as células de morfologia arredondada, do tipo macrófago, as quais apresentaram inibição apenas em altas concentrações (20-25 $\mu$ M). A fluorescência com LA/BE mostrou os mesmos resultados vistos no MTT e revelou a presença de corpos apoptóticos, principalmente em 20 $\mu$ M, confirmando o efeito do fármaco na viabilidade celular. O ciclo celular das células do estroma da MO no 14º dia de cultivo mostrou a ocorrência de bloqueio das células nas fases  $G_0/G_1$  (66,3% no controle para 91,5% em 15 $\mu$ M) e diminuição do percentual de células nas fases S e  $G_2/M$ . Em 2,5 $\mu$ M, a expressão de  $\alpha$ -SMA reduziu para 45,74% e foi quase totalmente inibida a partir de 10 $\mu$ M. A presença de adipócitos corados por Oil Red só foi observada no grupo controle. Estes resultados em conjunto sugerem um efeito mielossupressor do MI sobre células da MO saudável, o que é indesejado já que a maioria dos pacientes estará exposta por muito tempo a esse fármaco.

Palavras-chave: Medula Óssea. Estroma. Mesilato de Imatinibe. Mielossupressão.

## ABSTRACT

The antineoplastic agents affect cells that are in the process of cell division, thus rapid rate of cell renewal and differentiation of bone marrow (BM) makes the hematopoietic system a susceptible target toxicity by these agents. The BM is formed by a stroma composed of many cell types (fibroblasts, macrophages, endothelial cells and adipocytes) and an extracellular matrix that together form an ideal microenvironment favoring the modulation of quiescence, self-renewal and commitment of mesenchymal stem cells (MSCs), as well as proliferation, maturation and apoptosis of hematopoietic cells. In this context, the objective this work was to evaluate the effects of Imatinib Mesylate (IM), a drug inhibitor of tyrosine kinase proteins and receptors as c-Kit, platelet derived growth factor (PDGF), stem cell factor (SCF), c-Abl, BCR-ABL, involved in different signaling pathways of hematopoietic progenitor cells (CFU-GM) and stromal cells from BM of healthy mice. By clonogenic assays in semisolid medium and culture of adherent stromal cells from the BM, we evaluated the potential myelosuppressive of IM through the test cell viability MTT and Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB), cytochemistry to identify of adipocytes, cell cycle, cell proliferation by incorporation of BrdU and expression of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). As for hematopoietic cells, the results showed that the IM gradually reduced the growth of colonies of granulocytes/macrophages (CFU-GM), the  $IC_{50}$  obtained was  $26.5\mu\text{M}$  and total inhibition occurred at  $60\mu\text{M}$ . The stromal cells in 4 and 8 days of culture, no significant difference in the percentage of proliferation measured by BrdU incorporation, and in  $10\mu\text{M}$  there was a tendency to increase proliferation. In 14 days the proliferation decreased gradually and at  $7.5\mu\text{M}$  proliferation was reduced to about 5%. The percentage of viable cells by MTT was similar at 7 and 14 days, rising to  $10\mu\text{M}$  and then reducing to reach 0% at  $25\mu\text{M}$ . The morphology of most cells untreated and cells treated with low concentrations of IM ( $2.5\mu\text{M}$ ) was typically fibroblastic, and in more elevated concentrations of IM (mainly from  $10\mu\text{M}$ ), the predominant cells were rounded morphology of type macrophages, which were inhibited only at high concentrations ( $20$ - $25\mu\text{M}$ ). Fluorescence with AO/EB showed the same results seen in the MTT and revealed the presence of apoptotic bodies, especially in  $20\mu\text{M}$ , confirming the drug effect on cell viability. The cell cycle of stromal cells from the BM on day 14 of culture indicates the occurrence of blockage of cells in  $G_0/G_1$  phase (66.3% in control to 91.5% in  $15\mu\text{M}$ ) and decreased the percentage of cells in S phase and  $G_2/M$ . At  $2.5\mu\text{M}$ , the expression of  $\alpha$ -SMA decreased to 45.74% and was almost completely inhibited from  $10\mu\text{M}$ . The presence of adipocytes stained with Oil Red was observed only in the control group. These results together suggest a myelosuppressive effect of IM on healthy cells of the BM, which is undesirable since the majority of patients will be exposed for a long time with this drug.

Keywords: Bone Marrow. Stroma. Imatinib mesylate. Myelosuppression.

## LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
<b>Esquema 1.</b> Célula-tronco totipotente.....	21
<b>Esquema 2.</b> Divisão assimétrica das células-tronco.....	22
<b>Esquema 3.</b> Proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas.....	24
<b>Esquema 4.</b> Diferenciação de células-tronco mesenquimais.....	27
<b>Esquema 5.</b> Células-tronco mesenquimais expandidas em cultura.....	28
<b>Esquema 6.</b> Microambiente hematopoiético.....	30
<b>Esquema 7.</b> Esquema proposto para a origem do miofibroblasto.....	32
<b>Esquema 8.</b> Diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e estromais.....	35
<b>Esquema 9.</b> Ensaio clonogênico de CFU-GM em estudos toxicológicos.....	37
<b>Esquema 10.</b> Ciclo celular.....	40
<b>Esquema 11.</b> Translocação t(9;22) (q34;q11).....	42
<b>Esquema 12.</b> Sítio de atuação do Mesilato de Imatinibe.....	46

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre o crescimento de colônias CFU-GM obtidos da medula óssea de camundongos.....	63
<b>Figura 2.</b> Morfologia das colônias CFU-GM encontradas após 7 dias de cultivo em meio semi-sólido.....	64
<b>Figura 3.</b> Morfologia das colônias CFU-GM em culturas tratadas com M. de Imatinibe.....	64
<b>Figura 4a.</b> Morfologia das células do estroma da medula óssea de camundongos após 14 dias de cultivo com Mesilato de Imatinibe.....	65
<b>Figura 4b.</b> Morfologia das células do estroma da medula óssea de camundongos após 14 dias de cultivo com Mesilato de Imatinibe .....	66
<b>Figura 5.</b> Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre células do estroma da medula óssea de camundongos após 7 e 14 dias de cultivo.....	67
<b>Figura 6.</b> Efeito comparado do Mesilato de Imatinibe sobre células do estroma da medula óssea de camundongos após 7 e 14 dias de cultivo.....	68
<b>Figura 7.</b> Alterações citomorfológicas de células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe incubadas durante 7 dias.....	70
<b>Figura 8.</b> Alterações citomorfológicas de células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe incubadas durante 14 dias.....	71
<b>Figura 9.</b> Identificação de adipócitos pela coloração com Oil Red O.....	73
<b>Figura 10.</b> Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre as fases do ciclo celular de células do estroma da medula óssea de camundongos.....	74
<b>Figura 11.</b> Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU em células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe.....	76
<b>Figura 12.</b> Análise da incorporação do BrdU em células cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe por 4 e 8 dias.....	78
<b>Figura 13.</b> Análise da incorporação do BrdU em células cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe por 14 dias.....	79
<b>Figura 14.</b> Quantificação dos núcleos de células do estroma da medula óssea de camundongos cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe corados com DAPI.....	81
<b>Figura 15.</b> Quantificação de núcleos de células cultivadas por 14 dias com Mesilato de Imatinibe corados com DAPI classificados conforme o tamanho.....	82



<b>Figura 16.</b> Quantificação de células $\alpha$ -SMA positivas.....	83
<b>Figura 17.</b> Imagens representativas da imunofluorescência para $\alpha$ -SMA.....	84
<b>Figura 18.</b> Quantificação de células RAW 264.7 tratadas com Mesilato de Imatinibe.....	85
<b>Figura 19.</b> Morfologia da cultura de células RAW 264.7 tratadas com M. de Imatinibe.....	86
<b>Figura 20.</b> Distribuição dos pacientes com Tumor Estromal Gastrointestinal (GIST) conforme alterações encontradas em hemogramas.....	87
<b>Figura 21.</b> Valores de hemoglobina encontrados em pacientes com GIST do sexo masculino tratados com Mesilato de Imatinibe.....	88
<b>Figura 22.</b> Valores de hemoglobina encontrados em pacientes com GIST do sexo feminino tratadas com Mesilato de Imatinibe.....	89
<b>Figura 23.</b> Valores de leucócitos totais e neutrófilos encontrados em pacientes com GIST tratados com Mesilato de Imatinibe.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGP	Ácido alfa-1-glicoproteína
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BCR-ABL	Gene fusionado Abelson (ABL) - <i>Breackpoint Cluster Region</i> (BCR)
BE	Brometo de Etídio
BFU-E	Unidade formadora de <i>burst</i> de eritrócitos
BMSC	do inglês <i>Bone marrow stromal cell</i> – células do estroma da medula óssea
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridinina
c-Abl	Proteína com função tirosinoquinase
CAM	Moléculas de adesão celular
CD	do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CD117	Receptor do fator de crescimento da célula-tronco, c-Kit
CD34	Molécula de adesão expressa em células-tronco hematopoiéticas e endoteliais
CDK	Quinase ciclina-dependente
CEM	Célula do estroma multipotente
CFC	Célula formadora de colônia
CFU	Unidade formadora de colônia
CFU-E	Unidade formadora de colônia de eritrócitos
CFU-F	Unidade formadora de colônia fibroblástica
CFU-G	Unidade formadora de colônia de granulócitos
CFU-GM	Unidade formadora de colônia de granulócitos/macrófagos
CFU-M	Unidade formadora de colônia de macrófagos
c-Kit	Receptor do fator de crescimento da célula-tronco, CD117
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSF	do inglês <i>Colony-stimulating factor</i> , fator estimulador de colônia
CSF-1	Fator estimulador de colônia de macrófagos, M-CSF
CT	Célula-tronco

CTA	Célula-tronco adulta
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTP	Célula-tronco pluripotente
CUL4A	Gene Cullin 4A
CXCL8	do inglês <i>CXC chemokine ligands</i> – 8, quimiocina produzida por macrófagos, mesmo que IL-8
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DLI	Infusões de leucócitos dos doadores
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
E.P.M.	Erro padrão da média
E2F	Grupo de genes que codificam uma família de fatores de transcrição
EGF-R	Receptor do fator de crescimento epidermal
EPO	Eritropoietina
EPO-R	Receptor para eritropoietina
FA	Fase acelerada da LMC
FasL	Proteína transmembrana envolvida com a apoptose
FC	Fase crônica da LMC
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flt-3	do inglês <i>FMS-Like Tyrosine Kinase 3</i> , um receptor tirosinoquinase
G <sub>0</sub>	Estado de quiescência (ciclo celular)
G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub>	Fases <i>gap</i> do ciclo celular
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico

IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IL	Interleucina
IMDM	do inglês <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de acridina
LLA	Leucemia linfóide aguda
LIF	Fator inibidor da leucemia
LMC	Leucemia mielóide crônica
LTCIC	do inglês <i>Long-term culture-initiating cells</i>
Lyn	Membro da família Src de proteínas tirosinoquinases
M	Mitose (fase do ciclo celular)
MAPK	Proteína quinase de ativação mitogênica
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MEC	Matriz extracelular
MI	Mesilato de Imatinibe
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MO	Medula óssea
MS-5	Linhagem de células estromais
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Gene supressor de tumor
PAS/AGM	Região para-aorta-esplancnopleura/aorta-gônada-mesonefro
PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> , tampão fosfato salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-R	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
Pgp	Glicoproteína P
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
PI	Iodeto de propídeo
PS	Penicilina/Estreptomicina
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RAW 264.7	Linhagem de células macrofágicas
RET	do inglês <i>Rearranged during transfection</i> , receptor do tipo

	tirosinoquinase
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase - transcriptase reversa
S	Síntese (fase do ciclo celular)
SBF	Soro bovino fetal
SCF	Fator de célula-tronco
Src	Família de proteínas tirosinoquinases
SSEA	do inglês <i>Stage-specific embryonic antigen</i>
Stro-1	Proteína de superfície presente em células estromais da medula óssea
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento
TMO	Transplante de medula óssea
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TxRd	Vermelho do Texas
v/v	Proporção volume/volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VR	Valor de referência
$\alpha$ -SMA	Alfa- actina de músculo liso

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1 CÉLULAS-TRONCO</b> .....	20
1.1.2 Células-tronco hematopoiéticas – CTH.....	22
1.1.3 Células-tronco mesenquimais – CTM.....	24
1.1.4 Células do estroma.....	27
<b>1.2 MATRIZ EXTRACELULAR – MEC</b> .....	29
<b>1.3 FIBROBLASTOS E MIOFIBROBLASTOS</b> .....	31
<b>1.4 MACRÓFAGOS</b> .....	32
<b>1.5 ESTROMA MEDULAR E HEMATOPOIESE</b> .....	34
1.5.1 Métodos de avaliação da hematopoiese.....	35
1.5.1.1 Ensaio Clonogênico.....	36
1.5.1.2 Cultura de Estroma – Células Aderentes.....	37
<b>1.6 CICLO CELULAR</b> .....	38
<b>1.7 MESILATO DE IMATINIBE</b> .....	40
1.7.1 Leucemia Mielóide Crônica – LMC.....	41
1.7.1.1 Tratamentos para LMC.....	43
1.7.1.2 A era do Mesilato de Imatinibe.....	44
1.7.1.2.1 Resistência ao Mesilato de Imatinibe.....	45
1.7.1.2.2 Novas opções terapêuticas.....	46
1.7.2 Tumor Estromal Gastrointestinal – GIST.....	47
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1 Reagentes.....	51
3.2 Metodologia.....	51
3.2.1 Modelo Experimental.....	51
3.2.2 Obtenção da medula óssea dos camundongos.....	52
3.2.3 Quantificação das células mononucleares viáveis.....	52

3.2.4 Obtenção do Mesilato de Imatinibe.....	52
3.2.5 Preparo do Mesilato de Imatinibe.....	53
3.2.6 Meios de cultura.....	53
3.2.6.1 Meio de cultura IMDM.....	53
3.2.6.2 Meio de cultura IMDM 2x concentrado.....	53
3.2.7 Ensaio clonogênico com células progenitoras hematopoiéticas.....	53
3.2.7.1 Camada Base.....	54
3.2.7.2 Camada de Células.....	54
3.2.7.3 Incubação e contagem de colônias.....	54
3.2.8 Cultura de células do estroma da medula óssea.....	54
3.2.8.1 Viabilidade celular - Método do MTT.....	55
3.2.8.2 Viabilidade celular - Fluorescência de LA/BE.....	55
3.2.8.3 Citoquímica para identificação de adipócitos.....	56
3.2.8.3.1 Modo de preparo das soluções.....	56
3.2.8.4 Ciclo celular.....	57
3.2.8.5 Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU.....	58
3.2.8.6 Análise Imunocitoquímica – BrdU e $\alpha$ -SMA.....	58
3.2.9 Cultivo da RAW 264.7.....	58
3.2.10 Análise de prontuários.....	59
3.2.10.1 Amostragem.....	59
3.2.10.2 Dados.....	60
3.2.10.3 Critérios de inclusão.....	60
3.2.10.4 Critérios de exclusão.....	60
3.2.10.5 Recrutamento dos pacientes.....	60
3.2.10.6 Valores de Referência.....	61
3.2.11 Análise estatística dos resultados.....	61

#### **4. RESULTADOS**

4.1 Efeito mielossupressor do Mesilato de Imatinibe sobre células progenitoras hematopoiéticas CFU-GM .....	62
4.1.1 Efeito no crescimento das colônias CFU-GM.....	62
4.1.2 Morfologia das colônias CFU-GM.....	63
4.1.3 Alteração do número e morfologia das colônias na presença de MI.....	64
4.2 Morfologia das células do estroma da medula óssea.....	65

4.3 Viabilidade celular - Método do MTT.....	66
4.4 Viabilidade Celular - Fluorescência de LA/BE.....	68
4.5 Citoquímica para identificação de adipócitos.....	72
4.6 Ciclo celular.....	74
4.7 Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU.....	75
4.8 Quantificação de núcleos corados com DAPI.....	79
4.9 Avaliação da expressão de $\alpha$ -SMA.....	82
4.10 Cultivo da RAW 264.7.....	85
4.11 Análise de prontuários.....	87
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>8. ANEXOS</b>	
Anexo A- Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	117
Anexo B- Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH).....	118
Anexo C- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CEPON.....	119



## **1. INTRODUÇÃO**

Quase todos os agentes antineoplásicos são tóxicos à medula óssea (MO) em graus variáveis. A mielossupressão ou mielotoxicidade constituiu-se no efeito colateral mais importante e comum relacionado com o tratamento quimioterápico. Ela é um fator limitante e responsável pelo aprazamento obrigatório entre as aplicações programadas nos diversos protocolos de tratamento (BONASSA, 2000).

Os agentes antineoplásicos intervêm, ao nível patogenético, nas aberrações da reprodução celular, freando-a, limitando-a e, algumas vezes, corrigindo-a, apesar de continuarem ignoradas as causas das doenças (DELUCIA et al., 2004). A maioria dos agentes neoplásicos não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente as células tumorais. Em geral, são tóxicos aos tecidos de rápida proliferação caracterizados por uma alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos (BONASSA, 2000).

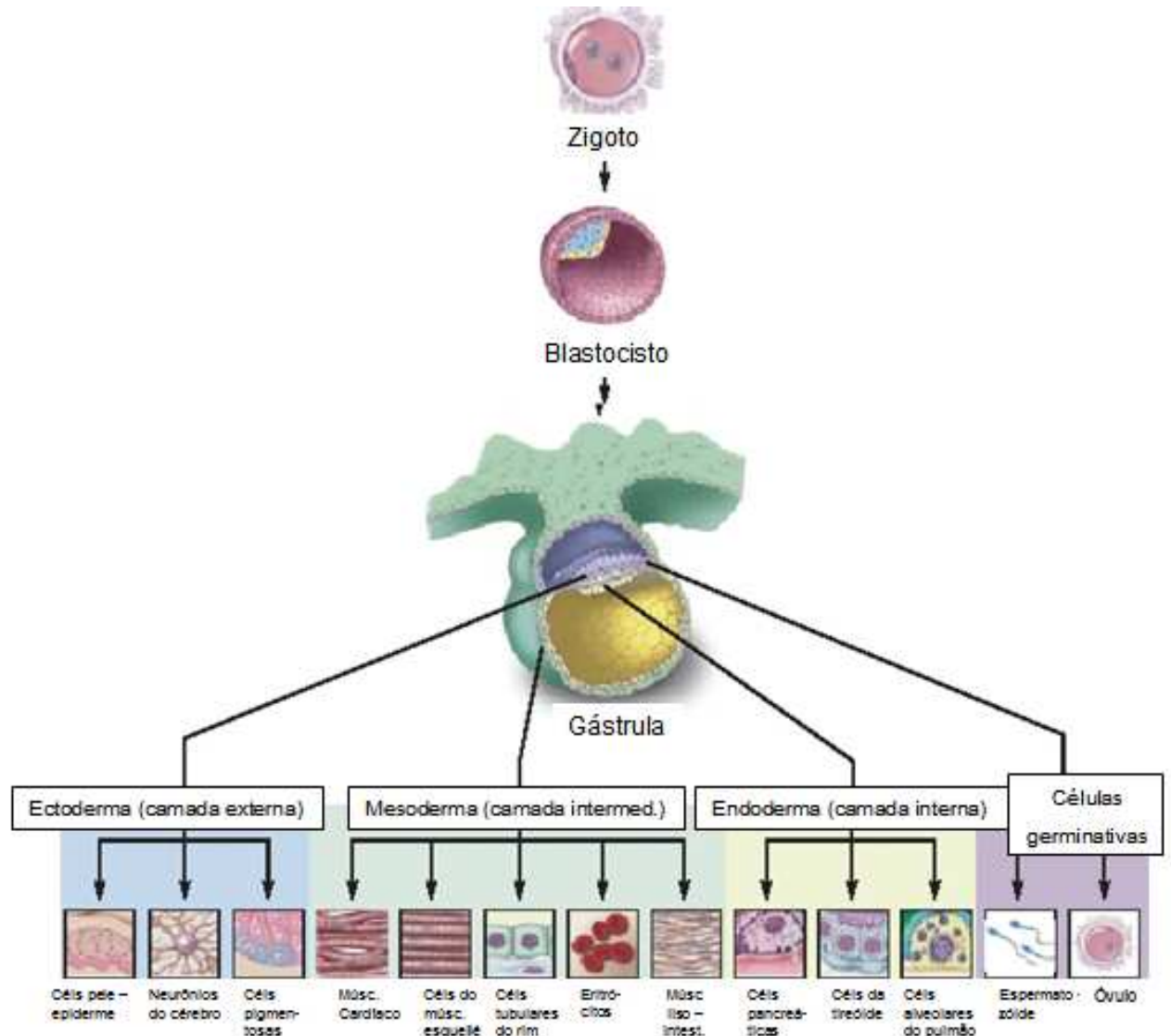
Devido à grande capacidade proliferativa do tecido hematopoiético, as células da MO são alvos frequentes da ação tóxica de xenobióticos. Desta forma, a avaliação da integridade da hematopoiese é um parâmetro importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na alteração da produção de células sanguíneas e como estas mudanças coletivamente irão impactar o sistema imunológico (VALADARES, 2004).

### **1.1 CÉLULAS-TRONCO (CT)**

Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos, todas derivam de uma única célula-ovo após a fecundação. Inicialmente, essa célula totipotente (Esquema 1) divide-se formando células idênticas, mas que vão adquirindo características especializadas e tendo sua capacidade de auto-renovação restringida (ZAGO; COVAS, 2006).

Em relação ao seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas como (a) totipotentes, células capazes de originar todos os tecidos embrionários (um organismo inteiro, inclusive placenta e anexos embrionários); (b) pluripotentes, células capazes de originar todos os tipos celulares do embrião, ou seja, dar origem aos mais de 250 tipos diferentes de tecidos o adulto; (c) multipotentes, produzem apenas algumas linhagens e (d) unipotentes, que originam apenas um tipo celular maduro (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Estas células são obtidas, respectivamente: a partir do embrião em sua fase precoce, da

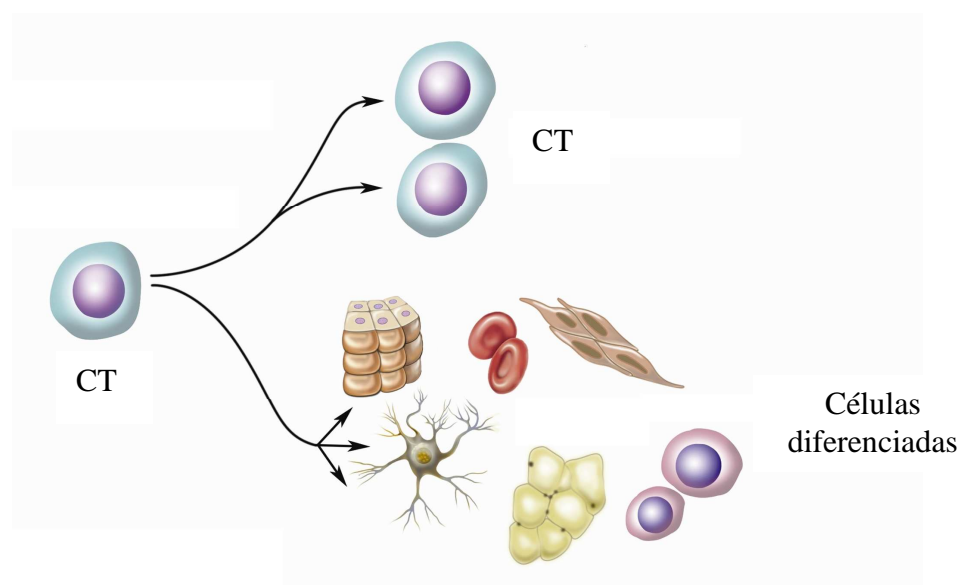
massa interna do blastocisto até 3 ou 4 dias de vida e cultivadas *in vitro*; depois do 5º dia de vida; de tecidos adultos ainda não completamente comprometidos; e de tecidos adultos, porém já programadas para se diferenciar em uma única linhagem (LODISH et al., 2002).



**Esquema 1. Célula-tronco totipotente** após fecundação vai originar células de tecidos de origem endodérmica, mesodérmica e ectodérmica; e células germinativas. Fonte: adaptação de <http://www.allthingsstemcell.com/2009/03/mesenchymal-stem-cells/>

Na maioria dos tecidos adultos, existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo esta própria reserva de células indiferenciadas (Esquema 2). Essas células-tronco tecido específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos (ZAGO; COVAS, 2006). As proporções de células que estão em ciclo ou fora do ciclo, ou ainda as que passam por

divisões simétricas ou assimétricas, variam e estão sob regulação do organismo (LODISH et al., 2002). As células-tronco adultas (CTA) não podem ser separadas apenas com base na morfologia ou moléculas de superfície, porque populações de CTA não apresentam um único marcador (MEIRELLES et al., 2008).



**Esquema 2. Divisão assimétrica das células-tronco (CT).** A CT pode se auto-renovar ou diferenciar em muitos tipos de células. Fonte: <http://dels.nas.edu/bls/stemcells/what-is-a-stem-cell.shtml/>

A MO possui características muito especiais quanto aos compartimentos que albergam as CTs. Evidências apontam para o desenvolvimento de uma hierarquia das células-tronco residentes na MO. As células-tronco pluripotentes (CTP) dão origem às células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras endoteliais. É possível que as CTPs possam originar as células-tronco tecido-comprometidas para vários órgãos (coração, fígado, cérebro) (RATAJCZAK, 2008).

### 1.1.2 Células-tronco hematopoiéticas - CTH

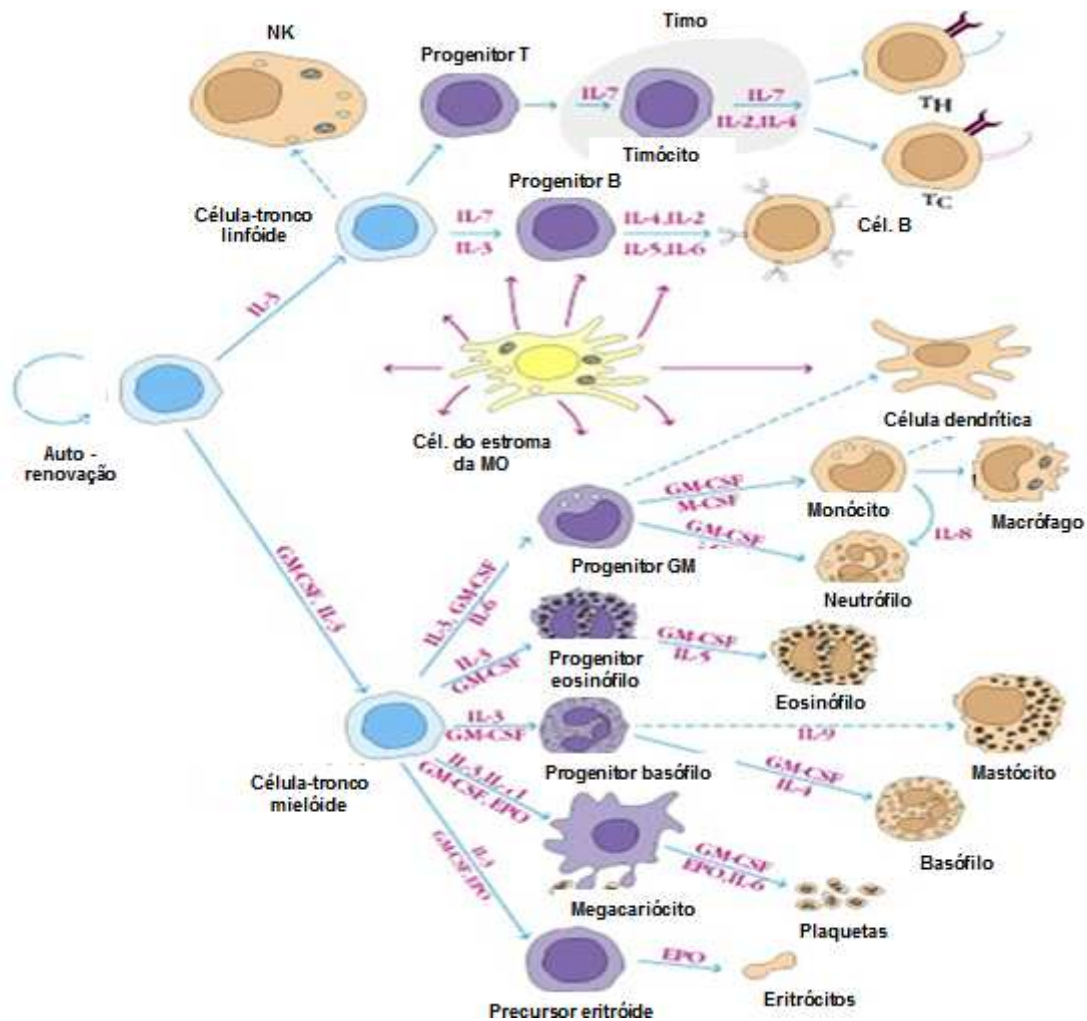
Embora existam diferenças na expressão dos marcadores de superfície entre humanos e murinos, o desenvolvimento de CTH tem sido caracterizado minuciosamente em camundongos, que servem de modelo para entender a hematopoiese humana (RATAJCZAK, 2008).

Durante a embriogênese, as CTHs migram de um sítio anatômico para outro, iniciando no saco vitelínico e região PAS/AGM (para-aorta-esplancnopleura/aorta-gônada-mesonefro) e continuam através do fígado fetal para finalmente chegarem na MO (RATAJCZAK, 2008).

A auto-renovação pela divisão de CTH permite simultaneamente sustentar a produção de células sanguíneas e manutenção do *pool* de CT. O balanço de diferenciação e auto-renovação depende de mecanismos regulatórios incluindo estímulo e inibição hematopoiética (MA et al., 2007).

A diferenciação da CTH passa por vários estágios intermediários, caracterizados pela progressiva perda da capacidade de auto-renovação e restrição a determinada linhagem. Acredita-se que a célula derivada da CTH já está comprometida com o processo de diferenciação que passa a ser denominada célula progenitora e não possa reverter ou paralisar este processo, resultando na formação das células maduras. As CTHs se diferenciam dando origem a células progenitoras linfóide ou mielóides que são comprometidas com uma linhagem particular (GOLDSBY et al., 2002), como é demonstrado no Esquema 3.

Na MO, as células hematopoiéticas crescem e amadurecem em uma malha de células estromais, células não hematopoiéticas que auxiliam no crescimento e diferenciação das células hematopoiéticas através do microambiente indutor hematopoiético consistindo de uma matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento ligados à membrana e solúveis (GOLDSBY et al., 2002). A hematopoiese é restrita ao compartimento extravascular, onde as células hematopoiéticas encontram-se associadas com as células estromais e separadas do compartimento vascular pelas células endoteliais (ZAGO; COVAS, 2006).



**Esquema 3. Proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas sob influência de citocinas** (adaptado de GOLDSBY et al., 2002). GM-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos; M-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos; EPO – Eritropoietina; IL – Interleucina.

### 1.1.3 Células-tronco mesenquimais - CTM

O microambiente medular é formado por células “fixas” – as células estromais – e células não-fixas – as células acessórias (linfócitos e monócitos) que durante sua presença transitória na medula podem produzir substâncias reguladoras e influenciar no processo hematopoiético. As células estromais incluem células reticulares (adventícias e fibroblásticas), macrófagos, células endoteliais e adipócitos. Estima-se que em cultura de longa duração, os fibroblastos compreendam 45-55% do número celular total, os macrófagos correspondam a 25-35% das células aderentes e as células endoteliais e os adipócitos respondam por 5-20% do conteúdo celular, variando conforme as condições de cultura empregadas (ZAGO; COVAS, 2006).

A descoberta de que a MO contém uma população de CT distinta das CTH, capaz de originar células do tecido conjuntivo como adipócitos, osteoblastos, condrócitos e células do estroma medular, foi resultado de numerosas pesquisas realizadas nos últimos 40 anos (ZAGO; COVAS, 2006).

Alexander Friedenstein (1974), Maureen Owen (1985) e seus colaboradores foram os primeiros a utilizar cultivo *in vitro* e transplante em animais de laboratório para caracterizar a composição do estroma da MO. Eles demonstraram a distinção entre células hematopoiéticas e osteogênicas com base em vários experimentos. Quando estas células são plaqueadas em baixa densidade, células do estroma da medula óssea (BMSC, do inglês *bone marrow stromal cell*) formam colônias derivadas de um único precursor, a CFU-F (Unidade Formadora de Colônia Fibroblástica) (BIANCO et al., 2001) com as seguintes características:

- constituíam uma população celular rara da MO;
- não entravam na fase de síntese (S) do ciclo celular antes de 60 horas de cultura;
- possuíam elevada capacidade replicativa;
- eram clonogênicas;
- formavam colônias de densidade e formato irregulares;
- eram capazes de formar tecido ósseo *in vivo* mesmo após terem sido extensivamente cultivadas *in vitro* (ZAGO; COVAS, 2006).

Maureen Owen, em 1985, propôs que as CFU-Fs seriam CTs que originariam o estroma da MO. Estas CTs estromais, à semelhança das CTHs, apresentariam uma hierarquia organizacional, possuindo vários compartimentos proliferativos, como o compartimento de CT propriamente dito, o compartimento das células progenitoras comprometidas e o compartimento de maturação onde se acumulariam as células indiferenciadas. Estas CT estromais originariam as células reticulares, os fibroblastos, os adipócitos e os osteócitos medulares (OWEN, 1985).

Em 1991, Arnold Caplan propôs que estas CT isoladas da MO de indivíduos adultos seriam as correspondentes às CTMs do embrião.

Originalmente investigadas devido ao seu papel na formação do microambiente hematopoiético, as células do estroma da medula possuem a habilidade de se diferenciar em tipos celulares fenotipicamente não-relacionados às células do seu tecido de origem (BIANCO et al., 2001), ilustrado no Esquema 4.

As CTMs têm sido obtidas, além da MO, de músculo esquelético (WILLIAMS et al., 1999), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), cordão umbilical (ERICES et al., 2000), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), sistema circulatório (KUZNETSOV et al., 2001), polpa

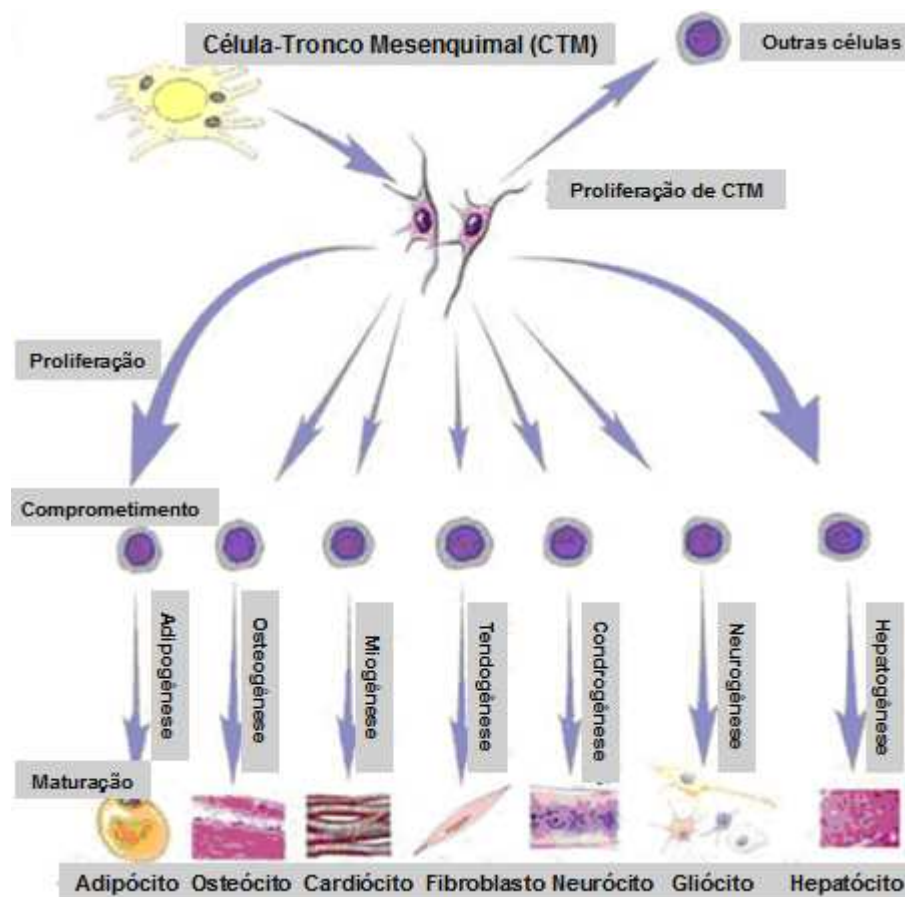
dental (GRONTHOS et al., 2000), fluído amniótico (IN'T ANKER et al., 2003), bem como de fígado, pulmão e sangue fetal (CAMPAGNOLI et al., 2001). Essas populações não são funcionalmente equivalentes em relação ao potencial de diferenciação, particularmente quando avaliadas usando testes específicos *in vivo* (KUZNETSOV et al., 1997).

As CTMs têm gerado um grande interesse devido o seu uso potencial na medicina regenerativa e engenharia tecidual. Atualmente, a escolha mais comum de CTM é da MO. Entretanto, o uso de células obtidas da MO apresenta alguns problemas, incluindo um procedimento invasivo na obtenção da MO e idade restritiva dos doadores. A facilidade de isolamento e o grande potencial de expansão *in vitro* tornou as CTMs atrativas como um sistema modelo para estudos de diferenciação celular e potencial uso em terapia celular e gênica (PIVORIUNAS et al., 2006).

Embora nenhum marcador específico para CTM seja conhecido, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the Internacional Society for Celular Therapy* propõe como critério mínimo para definir CTM humana a positividade para CD105, CD73 e CD90 e negatividade para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19, e HLA-DR. Stro-1, o melhor marcador conhecido de CTM, não é exclusivo destas células e é perdido durante a cultura. Recentes estudos têm mostrado que SSEA-1 e SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen*) são marcadores para células mesenquimais primitivas da MO de humanos e murinos. Experimentos usando transplante de CTMs cultivadas em animais indicam que os efeitos terapêuticos podem não ser explicados pela diferenciação em células tecido-específico somente. As CTMs secretam fatores bioativos com propriedade angiogênicas e antiapoptóticas, fatores antifibróticos, secretam moléculas quimioatrativas e propriedades imunorregulatórias (MEIRELLES et al., 2008).

O termo CTM foi gradualmente sendo adotado em muitas literaturas sem, no entanto, aplicar os critérios mais específicos para esta definição. Assim, foi proposto o uso do termo “células estromais mesenquimais multipotentes” para designar células aderentes ao plástico isoladas da MO ou outros tecidos com capacidade de diferenciação multipotente (DOMINICI et al., 2006).

Devido à grande quantidade de termos empregados e definições semelhantes (BIANCO et al., 2008), optamos por utilizar “células do estroma da medula óssea”, englobando todos os tipos de células que estão presentes no microambiente da MO (exceto as células hematopoiéticas) e crescem aderidas em cultura. Não podemos chamar de CTMs nem progenitoras mesenquimais, pois não foram feitos testes que comprovem esta afirmativa.

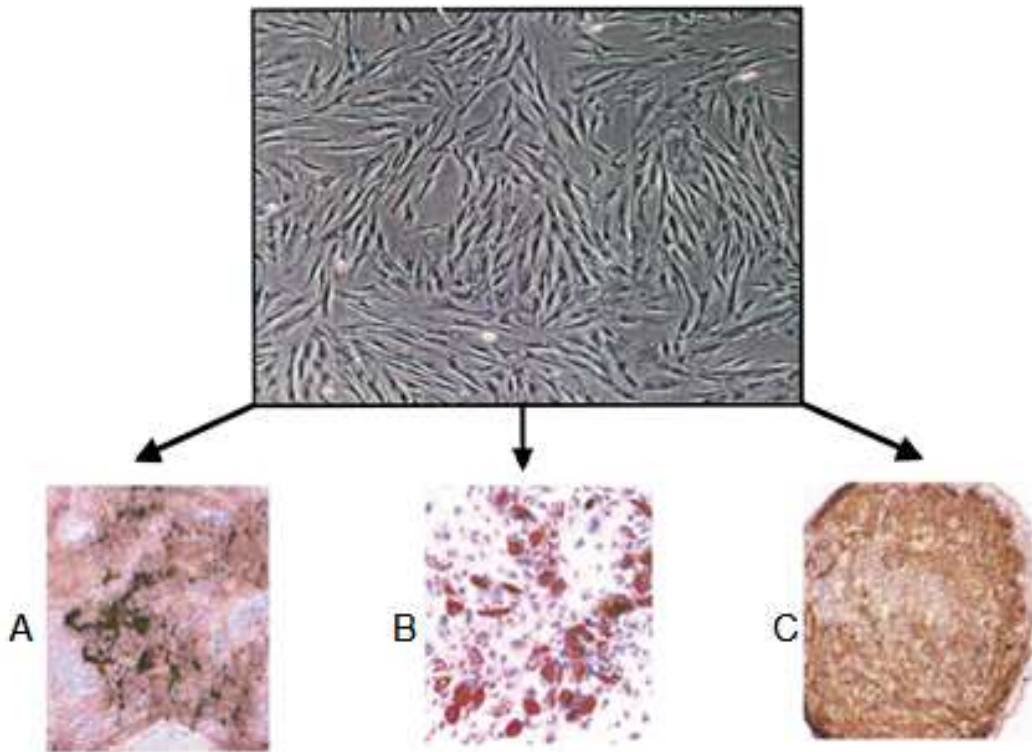


**Esquema 4. Diferenciação de células-tronco mesenquimais.** Adaptado de CAO; FENG, 2009.

#### 1.1.4 Células do estroma

As células multipotentes do estroma (CEM) adultas estão presentes em múltiplos tecidos e são definidas como células com habilidade para se diferenciar em múltiplas linhagens. Essas células são definidas seguindo os seguintes critérios: (a) propriedade de aderência ao plástico (b) fenótipo CD14<sup>-</sup> ou CD11b<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> ou CD79α<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> (c) capacidade para se diferenciar em linhagens de condrócitos, osteoblastos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006), ilustrado no Esquema 5. As CEMs possuem muitas propriedades, incluindo efeitos imunes dose-dependentes, efeitos proliferativos e potencial osteogênico (LAZENNEC; JORGENSEN, 2008).





**Esquema 5. Células-tronco mesenquimais expandidas em cultura.** Estas células exibem uma morfologia fibroblástica. Sob condições de indução apropriadas, as culturas demonstram diferenciação osteogênica (A), adipogênica (B) e condrogênica (C). Adaptado de DEANS; MOSELEY, 2000.

As CEMs sustentam a hematopoiese através da sua adesão/interação com CTHs e secreção de citocinas e fatores de crescimento que são necessários para diferenciação das CTHs (RINGDÉN; LE BLANC, 2005). As CEMs secretam fator de célula-tronco (*stem cell factor*-SCF), interleucina-6 (IL-6), fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). Também produzem reguladores negativos da hematopoiese, como interleucina-8 (IL-8)/CXCL8 (*CXC chemokine ligands*-8), proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1 $\alpha$ ), fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e citocinas que induzem a síntese de outras citocinas pelos macrófagos (principalmente IL-1 e fator de necrose tumoral alfa-TNF- $\alpha$ ) (MAJUMDAR et al., 2000).

CEMs expressam moléculas de adesão, que são mediadores envolvidos na migração e “homing” das células da MO, além de sintetizarem moléculas de matriz extracelular, como fibronectina, lamininas, colágeno e glicosaminoglicanos. Essas moléculas fazem parte da arquitetura da camada de aderência permitindo o ancoramento das CTHs (LAZENNEC; JORGENSEN, 2008).

Estas células também modulam a função da maioria da população das células imunes quando estimuladas por um sinal mitogênico e não são sensíveis à lise mediada por linfócito T citotóxico (RASMUSSEN et al., 2003). Expressam muitos fatores proangiogênicos como angiopoietina-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF-2). Todas essas moléculas agem sinergicamente em células endoteliais para promover a vasculogênese e angiogênese. CEMs expressam quimiocinas como IL-8 que está envolvida no recrutamento de progenitores endoteliais (HONCZARENKO et al., 2006).

## **1.2 MATRIZ EXTRACELULAR – MEC**

A matriz extracelular (MEC) fornece resistência estrutural aos tecidos, mantendo a forma dos órgãos (KRESSE; SCHONHERR, 2001). A MEC organiza células em tecidos e coordena suas funções, fornece um caminho para as migrações celulares, ativa os clássicos processos de transdução celular que induzem o crescimento e proliferação celulares e a expressão de genes. Estes efeitos da matriz envolvem moléculas de adesão celular (CAM) ligadas à membrana que se ligam diretamente aos componentes da MEC e do citoesqueleto (LODISH et al., 2002).

Existe uma complexa rede de muitas proteínas e polissacarídeos formando uma elaborada malha dentro dos tecidos. Os principais componentes são as proteínas estruturais (colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina e elastina), proteínas especializadas (fatores de crescimento, pequenas proteínas matricelulares) e proteoglicanos (DALEY et al., 2008).

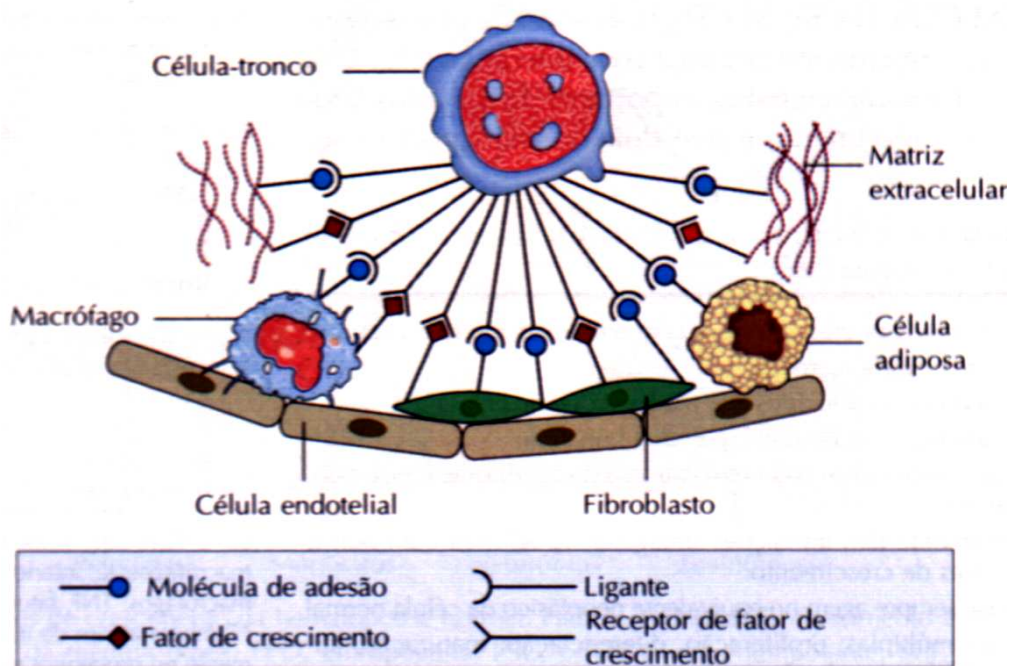
Componentes da MEC modulam a bioatividade dos fatores de crescimento e citocinas, como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PDGF, promovendo a ativação através de processos proteolíticos (MUNGER et al., 1997), inativando-as através do sequestro de ligantes dos respectivos receptores (NILI et al., 2003) ou ligando-se direta nos receptores das citocinas, como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) (SANTRA et al., 2002).

Para que as células hematopoiéticas possam proliferar e se diferenciar, elas devem estar ligadas à fibronectina da MEC, sintetizada pelas células do estroma da MO. Acredita-se que um decréscimo no número de moléculas de algumas integrinas, presentes nas células hematopoiéticas num estágio tardio de sua diferenciação, permita às células maduras do sangue destacar-se da matriz e das células do estroma da MO e entrar na circulação (LODISH et al., 2002).

A MEC é constituída de várias macromoléculas secretadas pelas células estromais (Esquema 6), que têm duas funções importantes:

(1) permitir a fixação das células-tronco trazidas pela circulação periférica ao estroma medular, por meio de seus receptores especiais de membrana (moléculas de adesão);

(2) propiciar o contato íntimo entre essas células e os fatores de crescimento hematopoiéticos secretados pelas células estromais que entram em contato com seus respectivos receptores de membrana (LORENZI, 1999).



**Esquema 6. Microambiente hematopoiético.** Interação entre matriz do estroma e célula-tronco. (HOFFBRAND et al., 2004)

### 1.3 FIBROBLASTOS E MIOFIBROBLASTOS

Desde as primeiras descrições das CTMs, chamava atenção a sua semelhança morfológica com fibroblastos em cultura (PITTENGER et al., 1999).

Os fibroblastos, de uma forma geral, são células derivadas do mesênquima que sintetizam colágeno fibrilar intersticial que providencia o suporte estrutural para os diversos tecidos e órgãos (ZAGO; COVAS, 2006).

Os fibroblastos são heterogêneos fenotipicamente e muitos expressam características de células musculares lisas, ou também chamados de miofibroblastos (POWELL et al., 1999).

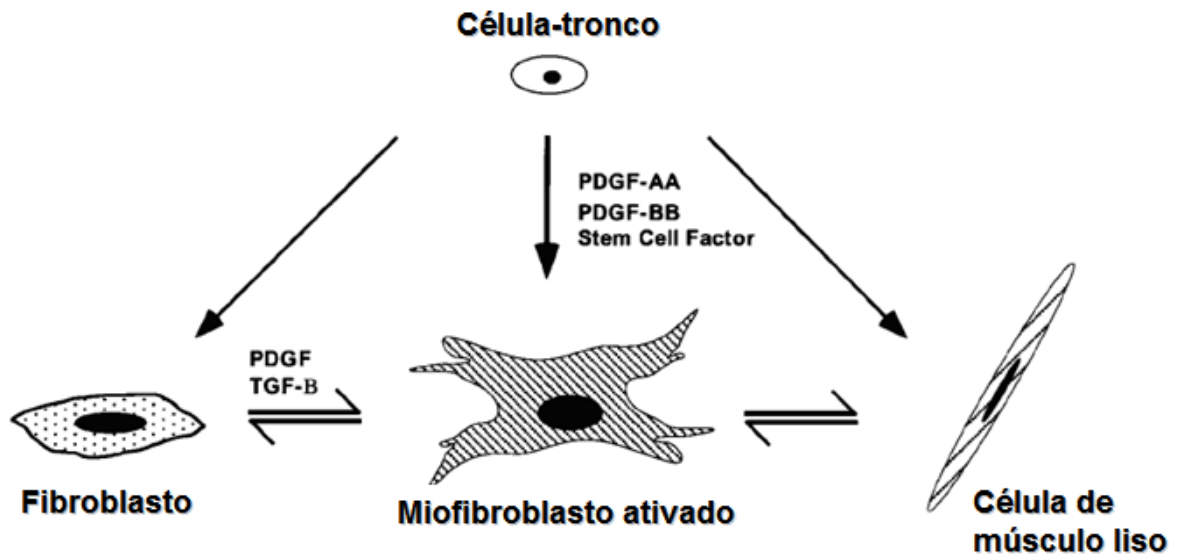
A diferente expressão de proteínas do citoesqueleto, incluindo as isoformas de actina, serve como marcador de heterogeneidade fibroblástica. Quando crescidos em cultura, fibroblastos de diferentes órgãos modificam-se para miofibroblastos, mas mostram vários graus de expressão de alfa-actina de músculo liso,  $\alpha$ -SMA (HINZ et al., 2001). TGF- $\beta$ 1 aumenta a proliferação, produção de colágeno e expressão de  $\alpha$ -SMA em fibrócitos cultivados (ABE et al., 2001).

Miofibroblastos, através de interações mesenquimal-epiteliais, são importantes componentes da organogênese e morfogênese (crescimento e diferenciação de tecidos ou órgãos), estando envolvidos na formação e reparo da matriz extracelular, além de secretarem fatores de crescimento e mediadores de inflamação (POWELL et al., 1999).

A característica principal dos miofibroblastos é representada por um aparato contrátil similar aos das células musculares lisas e particularmente pela expressão de  $\alpha$ -SMA, sendo um marcador de diferenciação de miofibroblastos (POWELL et al., 1999). Postula-se que miofibroblastos sejam derivados de progenitores de CTs, fibroblastos residentes tissulares ou células musculares lisas tissulares (Esquema 7). Possuem papel central no fechamento de feridas teciduais através de sua capacidade de produzir uma forte força de contração, possivelmente gerada em fibras de tensão, similares aquelas presentes em fibroblastos cultivados (POWELL et al., 1999).

Vimentina, Desmina e SMA são os três filamentos mais frequentemente usados para classificar miofibroblastos, variando conforme espécie e fatores ambientais. PDGF é o principal fator responsável pela proliferação de miofibroblastos (POWELL et al., 1999).

Em condições normais, células fibroblásticas exibem pouco ou nenhum contato célula-célula ou célula-matriz associado à actina e pequena produção de MEC. Após injúria tecidual, os fibroblastos são ativados e migram para o local do dano e sintetizam MEC comandados por citocinas locais. Em resposta a estímulos mecânicos, os fibroblastos apresentam fibras de tensão contráteis compostas primeiramente por actina citoplasmática. Em cultura, os fibroblastos são mecanicamente ativados pelo substrato plástico rígido, conferindo ao miofibroblasto ativado no mínimo 2 vezes mais força de contração que fibroblastos  $\alpha$ -SMA negativos (HINZ et al., 2007).



**Esquema 7. Esquema proposto para a origem do miofibroblasto.** Adaptado de POWELL et al., 1999.

#### 1.4 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são extremamente heterogêneos na expressão de seus genes e de suas atividades celulares. Apresentam meia-vida, morfologia e fenótipos variáveis. Os macrófagos maduros, por si só, fazem parte do microambiente estromal da MO. Essas células se associam com as células hematopoiéticas em desenvolvimento para realizar funções tróficas não-fagocíticas, bem como para remover os núcleos eritróides e de células efetas (ROITT et al., 2003).

Macrófagos e monócitos desempenham papel importante na imunidade inata, inflamação crônica, reparo tecidual e progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2007). Os monócitos se originam na MO a partir um precursor mielóide comum aos granulócitos (GM-CSF) e são liberados na corrente sanguínea, onde circulam por muitos dias antes de migrar para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos tissulares específicos (GORDON; TAYLOR, 2005).

A maioria dos macrófagos teciduais de um adulto é considerada derivada de monócitos circulantes que constitutivamente repõem a população residente. Entretanto, estudos sobre a origem dos macrófagos residentes em diversos tecidos têm mostrado que a proliferação local tem um papel considerável na renovação e manutenção de muitos tipos de

macrófagos, enquanto que o recrutamento de precursores circulantes tem pequeno ou nenhum papel em alguns casos (GORDON; TAYLOR, 2005).

Os receptores de superfície dos macrófagos estão relacionados com a regulação de funções em células mielóides, incluindo diferenciação, crescimento, adesão, migração, fagocitose, ativação e citotoxicidade. A habilidade no reconhecimento de muitos ligantes endógenos e exógenos, e respostas apropriadas a eles, é essencial para função do macrófago na homeostasia, bem como, na defesa do organismo através de imunidade inata e adquirida, autoimunidade, inflamação e imunopatologia (TAYLOR et al., 2005).

Macrófagos provenientes de células do sangue periférico humano cultivadas são imunocitoquimicamente positivos para Ki-M1p, CD31, CD54; negativos para CD1a, CD3, CD15, CD34 e CD62E (CLAUSEN et al., 2000). Os marcadores de diferenciação na membrana plasmática como o antígeno F4/80 mostraram-se úteis na definição da distribuição dos macrófagos maduros em muitos (mas não em todos) tecidos. Em seres humanos o antígeno CD68, um marcador vacuolar intracelular, é amplamente expresso; o homólogo murino (macrossialina) é um pan-marcador de macrófagos também presente em muitas células dendríticas mielóides e em osteoclastos, diferente de F4/80 (ROITT et al., 2003).

Os mecanismos moleculares da distribuição constitutiva dos macrófagos e da migração induzida envolvem moléculas de adesão celular, citocinas e fatores de crescimento (ROITT et al., 2003). O fator estimulador de colônia dos macrófagos (M-CSF, ou CSF-1) é necessário para maturação de macrófagos, havendo evidências que é um importante regulador do desenvolvimento dos macrófagos teciduais. Dependendo do ambiente, monócitos/macrófagos podem ser convertidos em outros fenótipos funcionais, como células dendríticas e osteoclastos (MARTINEZ et al., 2006). Os macrófagos residentes na MO não possuem funções pró-inflamatórias como os macrófagos sensibilizados imunologicamente, mas participam das reações de tropismo para o desenvolvimento de células hematopoiéticas e endocitose (ROITT et al., 2003).

Macrófagos secretam TGF- $\beta$  que promovem proliferação e crescimento de fibroblastos maduros (O'SULLIVAN et al., 2007).

## **1.5 ESTROMA MEDULAR E HEMATOPOIESE**

A produção das células sanguíneas (hematopoiese) é um processo complexo envolvendo proliferação celular, diferenciação, morfogênese, maturação funcional e morte celular. As células maduras do sangue possuem tempo de vida limitado e para que as

atividades metabólicas do indivíduo se mantenham constantes (homeostasia), elas necessitam ser continuamente substituídas (VALADARES, 2004).

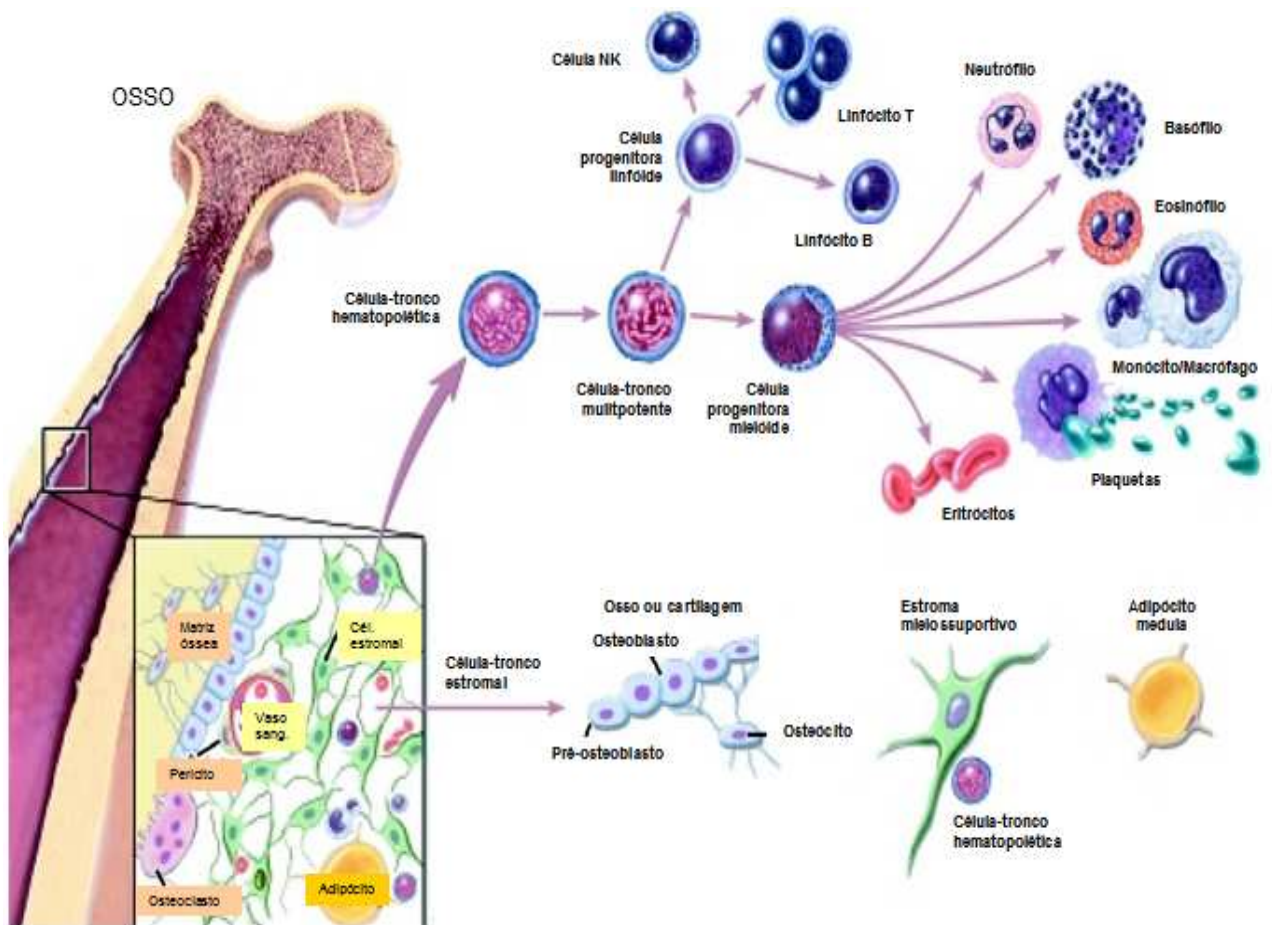
Como dito anteriormente, a medula óssea tem uma estrutura que permite a proliferação ou multiplicação das células pluripotentes e, ao mesmo tempo, a diferenciação destas. Para que esses fatos ocorram, há necessidade de um parênquima de sustentação para tais células, que deve ser muito rico em sangue. Nesse parênquima existem vasos capilares sinusoidais numerosos e outras células importantes, como células reticulares, adipócitos, células do tecido conjuntivo frouxo e células histiocitárias. Esse conjunto forma o estroma medular (Esquema 8). Existe, portanto, um verdadeiro sistema regulador da hematopoiese que é constituído pelas células-tronco, seus receptores específicos de membrana, pelas células estromais produtoras de fatores hematopoiéticos e pela matriz extracelular (LORENZI, 1999).

Uma vez que as células pluripotentes sejam fixadas no microambiente hematopoiético, inicia-se o processo de proliferação e maturação celular. Existem diversos fatores da hematopoiese e eles atuam de dois modos: estimulam ou inibem a proliferação e a diferenciação (maturação) celular. Os fatores de crescimento ou CSFs (*colony-stimulating factors*) são produzidos por células mononucleares do sangue (monócitos e linfócitos), pelos macrófagos da MO, por neutrófilos e por células do estroma medular; e atuam sobre as células indiferenciadas que se distribuem na MO. À medida que as células se diferenciam, perdem a capacidade de resposta ao estímulo que causou sua proliferação e, conseqüentemente, o aumento em número (LORENZI, 1999).

A regulação do estado de equilíbrio da hematopoiese é realizada de várias maneiras, que incluem:

- O controle dos níveis e dos tipos de citocinas produzidas pelas células estromais da medula;
- A produção de citocinas com atividade hematopoiética por outros tipos celulares, tais como células T ativadas e macrófagos;
- A regulação da expressão de receptores para as citocinas ativadas nas células-tronco e células progenitoras;
- A remoção de algumas células pela indução controlada da morte celular (GOLDSBY et al., 2002).





**Esquema 8. Diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e estromais.** Fonte: adaptação de <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp/>

### 1.5.1 Métodos de avaliação da hematopoiese

Uma vez que a mielotoxicidade pode resultar tanto do efeito direto da droga sobre os progenitores hematopoiéticos quanto do efeito sobre as células do estroma medular ou expressão de citocinas/receptores, diferentes protocolos de investigação têm sido desenvolvidos e propostos para a avaliação da integridade da hematopoiese *in vitro* (PARENT-MASSIN et al., 1993; GRIBALDO et al., 1996; PESSINA et al., 1998; PESSINA et al., 1999; PESSINA et al., 2003). Todos estes testes são modificações da técnica original descrita por Bradley e Metcalf (1966).

Existem três métodos mais utilizados *in vitro* para avaliar a hematopoiese: ensaio clonogênico, cultura de estroma medular e cultura líquida de longa duração. Os dois primeiros são comentados abaixo.



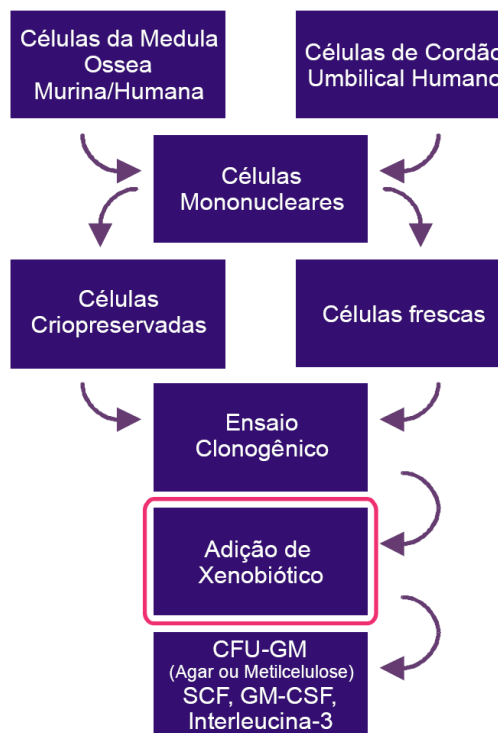
### 1.5.1.1 Ensaio Clonogênico

Os ensaios clonogênicos, simulando a hematopoiese, são sistemas de cultura de células progenitoras hematopoiéticas, geralmente em meio semi-sólido, amplamente empregado na hematologia experimental e clínica por mais de 30 anos. Na hematologia clínica estes métodos são empregados para confirmar diagnóstico, em transplantes de MO ou ainda para prever o tempo de recuperação medular nos casos de falência deste órgão (DELDAR et al., 1988; DELDAR, STEVENS, 1993; DELDAR, 1994). Já na área experimental, estes ensaios são aplicados para se avaliar a hematopoiese frente às condições patológicas como o estresse, infecção bacteriana, câncer, bem como para avaliar o efeito de drogas sobre a hematopoiese, como por exemplo, dos agentes quimioterápicos (VALADARES et al., 1998; QUEIROZ et al., 2001; QUEIROZ et al., 2004).

A utilização de ensaios clonogênicos de forma investigativa em estudos pré-clínicos de novas substâncias é mais recente. *In vitro*, em presença de meio de cultura para tecidos e de uma mistura de citocinas específicas para cada linhagem celular, os progenitores formam colônias distintas fenotipicamente de células diferenciadas. A estas células deu-se o nome de unidades formadoras de colônias (*colony forming unit*, CFU) (PARENT-MASSIN, 2001; MALERBA et al., 2004). O tipo de hematotoxicidade mais frequente e amplamente estudado *in vitro* são os efeitos agudos de drogas sobre os progenitores da MO da série granulocítica/macrofágica. A quantificação da mielotoxicidade é feita a partir do número de células progenitoras sobreviventes em função do nível de exposição ao xenobiótico na presença de concentrações máximas do GM-CSF (GRIBALDO, 2002; PESSINA et al., 2003; DIODOVICH et al., 2004).

O Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) em conjunto com uma rede de laboratórios internacionais realizaram a validação do método *in vitro* para determinação de Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos/Macrófagos (CFU-GM), apresentado em 2003, como uma importante ferramenta na investigação preditiva de neutropenia clínica durante a fase investigativa pré-clínica de novas substâncias. Neste ensaio, são empregadas células de MO murina e/ou células humanas de cordão umbilical (ricas em CT) (Esquema 9). Os dados obtidos podem dizer qual a dose ou nível plasmático da droga será hematotóxico, qual a menor dose que produz citopenia, qual a menor dose em que mais provavelmente ocorrerá o restabelecimento celular, qual a máxima dose tolerada e potencial de novas substâncias produzirem neutropenia clínica (PESSINA et al., 2003; DIODOVICH et al., 2004; MALERBA et al., 2004). Em 2003, Pessina e colaboradores publicaram a validação

do método de CFU-GM para prever neutropenia clínica e um modelo para predição da Máxima Dose Tolerada de xenobióticos mielossupressivos.



**Esquema 9. Ensaio clonogênico de CFU-GM em estudos toxicológicos.** (VALADARES, 2004)

### 1.5.1.2 Cultura de Estroma – Células Aderentes

As células do estroma medular, também conhecidas como CTMs ou CFU-Fs, são CT não-hematopoiéticas que aderem a placas de cultura (JAVASON et al., 2001; HUNG et al., 2002).

Neste ensaio, as células de MO são inoculadas em meio de cultura apropriado, suplementado com soros animais como fonte de nutrientes. Esta cultura consiste em um modelo *in vitro* para estudo do estroma medular (GRIBALDO, 2002).

As células do estroma são coletadas da MO dos fêmures de camundongos com o uso de meio de cultura apropriado e plaqueados geralmente em placas de 24 poços ou garrafas de cultura, permitindo o desenvolvimento da camada estromal na base do frasco/poço de cultura. Colocando-se uma lamínula dentro da placa de cultura para que as células cresçam sobre ela, pode-se posteriormente analisá-las utilizando técnicas específicas de identificação de alguns elementos estromais (ROMANOV et al., 2003). As culturas são mantidas em estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>, metade do volume do sobrenadante é removido e substituído por igual

volume de meio de cultura suplementado, isto possibilita a remoção das células não-aderentes da cultura (como as células hematopoiéticas). Quando as células atingem 80% de confluência, em aproximadamente 15 dias, apresentam várias colônias fibroblásticas na placa (ROMANOV et al., 2003).

## 1.6 CICLO CELULAR

A auto-reprodução é uma característica fundamental das células em todos os organismos vivos. Todas as células se reproduzem dividindo-se em duas; cada célula parental dará origem a duas células-filhas no final de cada ciclo de divisão celular (COOPER; HAUSMAN, 2007).

O ciclo celular é dividido em duas partes básicas: mitose e interfase. 95% do tempo do ciclo celular correspondem à interfase, onde os cromossomos estão descondensados e distribuídos pelo núcleo uniformemente. A interfase é subdividida em 3 etapas: em  $G_1$  a célula é metabolicamente ativa e continua crescendo, mas não duplica seu DNA, S é a fase de síntese, ocorrendo a replicação do DNA e em  $G_2$  o crescimento celular continua e as proteínas são sintetizadas em preparação para a mitose. Em  $G_0$  as células são metabolicamente ativas, mas não proliferam, a menos que sejam sinalizadas para entrar em  $G_1$  (COOPER; HAUSMAN, 2007).

$G_1$  (fase *gap* 1) é incorporada entre a divisão nuclear (M) e síntese de DNA (S),  $G_2$  (fase *gap* 2) ocorre entre S e M. Esses intervalos, denominados “pontos de verificação” permitem o reparo de danos no DNA e erros de replicação (Esquema 10).  $G_1$  é o período quando muitos sinais intervêm para influenciar na divisão celular. Ao final de  $G_1$  as células podem morrer, diferenciar ou auto-renovar. A fase S é o ponto limite no ciclo celular, e antes de uma proliferação celular, o ponto de verificação em  $G_1/S$  avalia a presença de lesão de DNA. O ponto de controle  $G_2/M$  monitora o término da replicação de DNA e verifica se é seguro para a célula iniciar a mitose e separar as cromátides-irmãs. A demora na progressão no ciclo celular fornece o tempo necessário para o reparo do DNA; se a lesão não for reparável, as vias apoptóticas são ativadas (BARTEK; LUKAS, 2001).

A progressão ordenada das células através das diversas fases do ciclo celular é comandada pelas ciclinas e pelas quinases ciclina-dependentes (CDKs) e seus inibidores (SHER; MCCORMICK, 2002). As CDKs conduzem ao ciclo celular por meio da fosforilação de proteínas-alvo críticas para a progressão das células para a próxima fase do ciclo celular. Elas são constitutivamente inativas durante o ciclo celular, sendo ativadas pela fosforilação

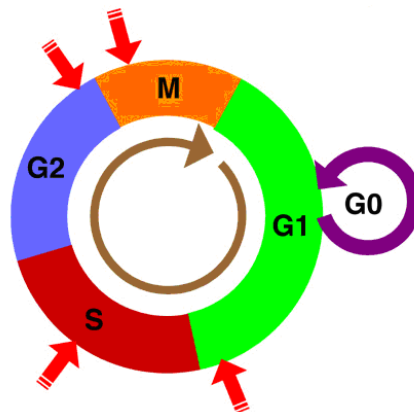
depois de se ligarem à família de proteínas chamadas de ciclinas. As ciclinas são sintetizadas durante fases específicas do ciclo celular, e sua função é ativar as CDKs. Os mitógenos (fatores de crescimento extracelulares) induzem a síntese de CDKs (EKHOLM; REED, 2000).

As células recém divididas podem retornar a  $G_1$  e iniciar um novo ciclo proliferativo ou entrar num período de latência (ROBERTS; SHERR, 2003).

A atividade dos complexos ciclina-CDK é estreitamente regulada pelos “inibidores de CDK” e funcionam como supressores de tumor. O gene supressor de tumor p53 possui papel de acompanhamento no ciclo celular, desencadeando os pontos de verificação que levam a reduzir ou suspender a progressão do ciclo celular de células lesadas ou causar apoptose (SHER; MCCORMICK, 2002). A parada no ciclo celular em  $G_1/S$  é principalmente mediada por p53 e em  $G_2/M$  envolve tanto mecanismos dependentes de p53 como independentes (BARTEK; LUKAS, 2001).

A maioria das células se retira do ciclo celular em  $G_1$  e entra no estado  $G_0$  para se diferenciar. Algumas células diferenciadas (ex. fibroblastos) podem ser estimuladas a reingressar no ciclo e se duplicar. Muitas células diferenciadas, entretanto, nunca entram outra vez no ciclo celular para se duplicar novamente (LODISH et al., 2002).

A progressão de  $G_1$  e proliferação celular são limitadas por sinalizações extracelulares que mantêm a homeostasia tecidual. A sinalização por TGF- $\beta$  promove crescimento e desenvolvimento durante embriogênese e em muitas células mesenquimais de adultos. Em tecidos mais diferenciados, entretanto, muitas células respondem ao TGF- $\beta$  com citostase ou até apoptose (MASSAGUÉ, 2004).



**Esquema 10. Ciclo celular.** As setas vermelhas indicam os pontos de checagem. Fonte: <http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm/>  
 $G_0$  – estado de quiescência;  $G_1$  e  $G_2$  - fase *gap*; S – síntese; M – mitose

## 1.7 MESILATO DE IMATINIBE (MI)

O Mesilato de imatinibe (MI) é um agente oral anticâncer molecularmente específico, racionalmente desenhado que seletivamente inibe muitas proteínas tirosinoquinases centrais na oncogênese em humanos (GUILHOT, 2004). MI é metabolizado pelo sistema enzimático citocromo P450, CYP3A hepática é a principal enzima responsável pelo metabolismo do MI. CGP 74588, o principal metabólito circulante formado, é uma piperazina N-desmetilada endógena que *in vitro* possui atividade comparável ao do MI (FRYE et al., 2004).

Proteínas tirosinoquinases controlam a ativação de vias de transdução de sinal que regulam processos celulares críticos, como crescimento, diferenciação e apoptose. Elas são funcionalmente desreguladas ou superexpressas em inúmeros tipos de câncer (SAVAGE; ANTMAN, 2002).

O MI é uma pequena molécula derivada da 2-fenilaminopirimidina. Tem atividade seletiva contra pequeno número de proteínas tirosinoquinases, incluindo o oncogene BCR-ABL, tirosinoquinases c-Kit, c-Abl e PDGF-R. Age como antagonista competitivo por ligar-se com alta afinidade ao sítio de ligação do ATP nos domínios das quinases destes alvos. Essa ação leva ao bloqueio da proliferação via BCR-ABL expresso em células leucêmicas (KANTARJIAN et al., 2002). O bloqueio do sítio de ação também é o mecanismo pelo qual o MI interrompe a sinalização exacerbada em células com mutação de c-Kit ocorrida em Tumores Estromais Gastrointestinais (GISTs) (GOMES et al., 2008).

Tendo sido aprovado, após estudos de fases I e II, para o uso em doentes de leucemia mielóide crônica (LMC) em fase blástica, em fase de transformação ou em fase crônica resistentes ou altamente intolerantes ao interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) (DOBBIN; GADELHA, 2002), o MI foi a primeira droga aprovada para uso clínico que bloqueia o sinal de uma proteína específica causadora do câncer. Até então, outras drogas conhecidas direcionadas a alvos moleculares específicos agiam em proteínas associadas, mas não diretamente causadoras dos mesmos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2004).

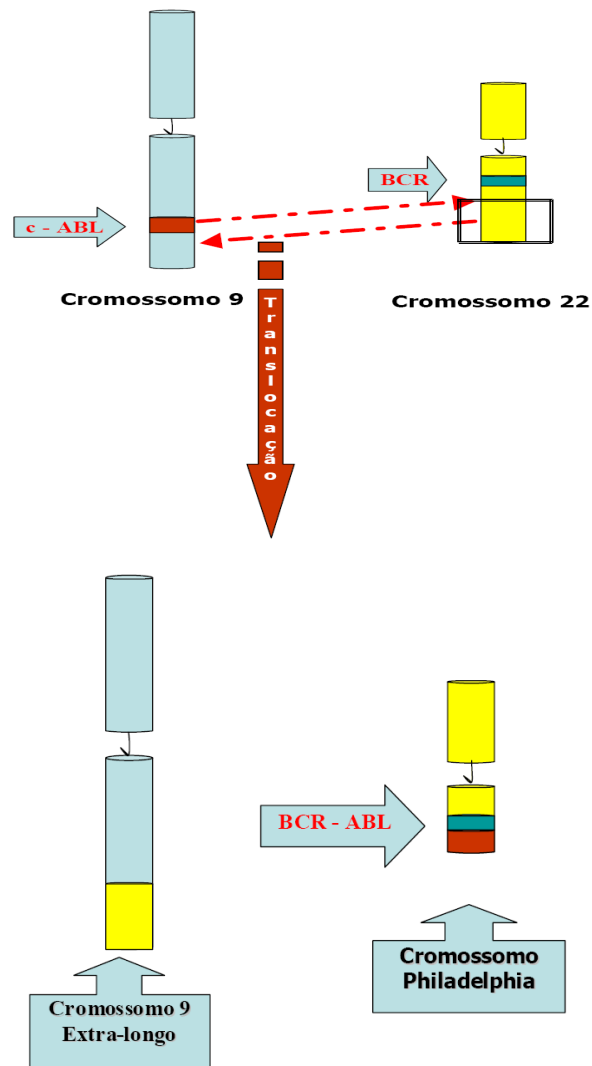
Modelos pré-clínicos em células de GIST de humanos mostraram que a inibição do c-Kit mutante pelo MI promove o impedimento do crescimento e apoptose dessas células. Após resultados satisfatórios, em fevereiro de 2002, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o MI para tratamento de pacientes com GIST metastático ou não-operáveis (ressecção cirúrgica) (GIORGI; VERWEIJ, 2005).

### 1.7.1 Leucemia Mielóide Crônica – LMC

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a nova Classificação dos Tumores dos Tecidos Hematopoiético e Linfóide, onde a LMC é classificada como uma neoplasia mieloproliferativa BCR-ABL positiva (TEFFERI et al., 2009).

Classicamente, a LMC é descrita como uma doença mieloproliferativa crônica clonal, caracterizada por leucocitose com desvio à esquerda, esplenomegalia e pela presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph) (TEFFERI et al., 2005). O diagnóstico de LMC é confirmado pela presença do cromossomo Ph que resulta da translocação t(9;22) (q34;q11) entre os cromossomos 9 e 22, na qual parte do protooncogene Abelson ABL é transferida para o gene BCR (*Breackpoint Cluster Region*) no cromossomo 22 e parte do cromossomo 22 é transferida para o cromossomo 9. O cromossomo 22 anormal é o Ph (HOFFBRAND et al., 2004) (Esquema 11). O cromossomo Ph pode ser detectado em 90% dos pacientes com LMC e, quando testes moleculares são realizados, mais de 95% dos pacientes evidenciam essa anormalidade (MAURO et al., 2002).

Em condições normais, o gene BCR codifica uma proteína com função relacionada à regulação do processo de sinalização e divisão celular, enquanto o gene ABL codifica uma proteína tirosinoquinase que participa da regulação do ciclo celular e da resposta a estresse genotóxico (BERGANTINI et al., 2005).



**Esquema 11. Translocação t(9;22) (q34;q11)** (DEININGER et al., 2000).

Na translocação Ph, éxons 5' do BCR são fundidos nos éxons 3' do ABL. O gene quimérico resultante BCR-ABL codifica uma proteína de fusão de tamanho 210kDa, com atividade tirosinoquinase excessiva em relação ao produto normal de 145kDa do ABL. A translocação Ph também é observada em uma minoria dos casos de leucemia linfoblástica aguda e, em alguns deles, o ponto de ruptura do BCR ocorre na mesma região que na LMC. O gene BCR-ABL quimérico é expresso como proteína p190 que, tal como a p210, tem atividade aumentada da tirosinoquinase (HOFFBRAND et al., 2004).

A célula leucêmica BCR-ABL apresenta uma mieloproliferação contínua resultante, provavelmente, de três mecanismos principais:

- Alteração da adesão das células progenitoras às células estromais e à matriz extracelular;
- Manutenção de um sinal mitogênico constante;

- Resistência a apoptose celular (BERGANTINI et al., 2005).

### **1.7.1.1 Tratamentos para LMC**

O arsênico foi a primeira terapia efetiva no tratamento da LMC, administrado em 1865. Em 1912, foi introduzido benzeno associado à radioterapia. Em 1953, o bussulfan, um agente alquilante, foi introduzido dando início à era moderna da quimioterapia no tratamento da LMC, porém, com inúmeros relatos de fibrose pulmonar. O uso do bussulfan com 6-tioguanina resultou em melhora da sobrevida e tornou o tratamento padrão durante 35 anos, até a introdução do IFN- $\alpha$  (RANDOLPH, 2005). O IFN- $\alpha$ , um estimulante não-específico do sistema imune que regula a atividade das células T, além de aumentar a sobrevida, induziu ao desaparecimento do cromossomo Ph e reduziu a progressão para crise blástica (FAUSEL, 2007). A partir de 1986, o transplante de medula óssea (TMO) tornou-se o tratamento padrão para pacientes com LMC (RANDOLPH, 2005).

Embora alguns agentes como hidroxiuréia, um agente fase S específico, e bussulfan possam controlar a doença por meses até anos, a LMC transforma-se e torna-se refratária ao tratamento, já que não eliminam as células Ph<sup>+</sup>. Uma alternativa aos pacientes de LMC intolerantes ou não-responsivos às terapias convencionais começou a ser testada em 1998, o MI, um inibidor específico de BCR-ABL e vem sendo utilizado e testado até hoje (FADERL et al., 1999).

Atualmente, pacientes portadores de LMC podem ser tratados com hidroxiuréia, IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  associado à citarabina, MI, TMO e infusões de leucócitos dos doadores (DLI) na recaída da doença pós-TMO (BERGANTINI et al., 2005). Somente em uma pequena fração de pacientes o TMO é adequado, e somente uma pequena fração tem uma resposta citogenética completa com IFN- $\alpha$  (BEUTLER et al., 2001). No Brasil, os tratamentos para LMC baseiam-se nos protocolos determinados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) e na Portaria nº 347, de 23 de junho de 2008, do Ministério da Saúde, que determina o uso de MI como tratamento de primeira linha para LMC.

### **1.7.1.2 A era do Mesilato de Imatinibe**

O MI produz uma remissão completa aparente no sangue periférico e na MO, com níveis até molecularmente indetectáveis da alteração cromossômica, com efeitos colaterais moderados, além de ser uma alternativa para as limitações do TMO (CHU et al., 2005).



O MI ocupa o sítio de ligação do ATP do componente ABL tirosinoquinase da oncoproteína BCR-ABL, inibindo a fosforilação dos resíduos de tirosina e mantém este na conformação inativa (MARIN et al., 2002) (Esquema 12).

A inibição da atividade de BCR-ABL pelo MI resulta na modulação transcricional de vários genes envolvidos no controle do ciclo celular, adesão celular e organização do citoesqueleto, levando as células Ph+ à morte por apoptose (DEININGER et al., 2000).

O MI na LMC bloqueia diferentes vias de sinalização celular que estão ativadas por esta proteína. Parece modular diferentes proteínas anti e pró-apoptóticas pertencentes às vias extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) da apoptose celular (BERGANTINI et al., 2005). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), ativando a cascata das caspases (GRIVICICH et al., 2007). O aumento da expressão de FasL nas células leucêmicas parece contribuir para a deflagração do mecanismo autócrino de ativação da via extrínseca da apoptose e conduzir a célula à morte. Por outro lado, as células efetoras citotóxicas passariam a exercer sua função normal e contribuir para uma resposta imune antileucêmica mais efetiva (BERGANTINI et al., 2005). Embora muito especulado, o mecanismo de ação ainda não é uma unanimidade entre os pesquisadores.

Em 2007, Usman e colaboradores publicaram o resultado de um estudo prospectivo observacional realizado entre 2001-2007 com 232 pacientes de LMC e GIST tratados com MI. Toxicidades não-hematológicas tais como hipopigmentação (40%), edema periorbital (21%), náusea (16,4%), boca seca (8,7%), ganho de peso (10,3%), fadiga (11%), entre outras, foram relatadas e variaram conforme a fase da doença. O desenvolvimento da mielossupressão é significativamente mais comum na LMC do que em pacientes com GIST tratados com MI. A mielossupressão em GIST é considerada não dose-dependente (GUILHOT, 2004). A mielossupressão pode ser grave e prolongada em alguns pacientes tratados com MI, sendo necessária a diminuição da dose ou até mesmo a interrupção do tratamento até que a hematopoiese normal seja restabelecida (GUILHOT, 2004).

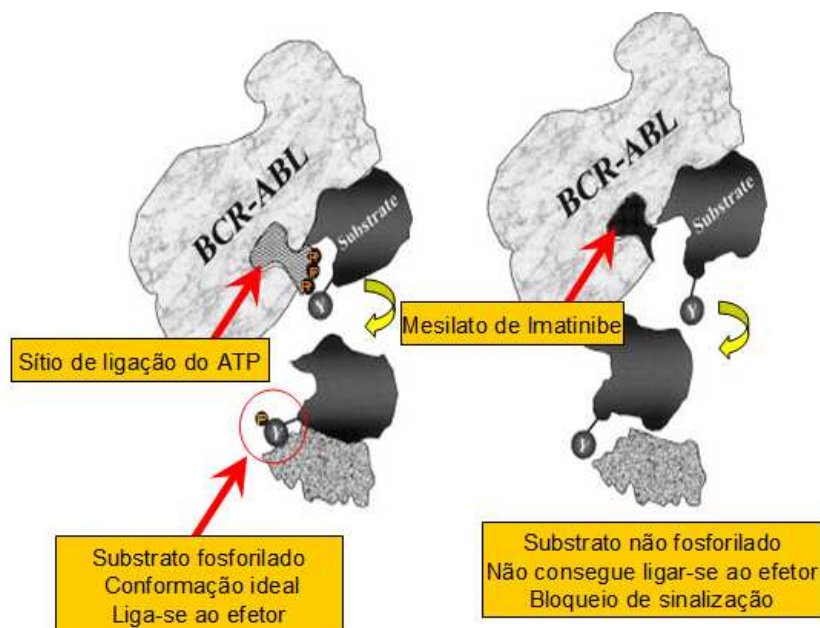
#### **1.7.1.2.1 Resistência ao Mesilato de Imatinibe**

Alguns pacientes falham ao tratamento inicialmente (resistência primária), enquanto outros perdem uma resposta previamente adquirida (resistência secundária), sendo esta última a mais comum e associada ao desenvolvimento de mutações no sítio BCR-ABL (GOLEMOVIC et al., 2005).

Enquanto o MI é efetivo na maior parte dos pacientes com LMC, alguns ainda em fase crônica (FC) e uma maior proporção em fases mais avançadas são resistentes ou intolerantes ao MI (JABBOUR et al., 2008). A resistência ao MI é incomum em pacientes em FC inicial, enquanto a incidência estimada de resistência em dois anos é de 10%-20% em LMC-FC após falha ao IFN- $\alpha$ , 40%-50% em fases acelerada (FA) e 70%-80% em crise blástica ou leucemia linfóide aguda (LLA) Ph + (BRAVE et al., 2008).

A resistência depende de vários mecanismos, tais como a superexpressão do BCR-ABL, defeitos genéticos adicionais e mutações que podem atingir várias regiões da molécula – a alça de fosfato, a alça de ativação, o domínio da quinase (BRANDFORD et al., 2003). Além desses, outros mecanismos de resistência *in vitro* ao MI também foram identificados, como a Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) pela Glicoproteína P (Pgp) e resistência causada pelo Ácido Alfa-1-Glicoproteína (AGP), uma proteína plasmática que não é encontrada nas células leucêmicas, mas, sim, no plasma de murinos (DOBBIN; GADELHA, 2002).

Os fatores relacionados à resistência que devem sempre ser considerados são: eficácia, toxicidade e tolerância da droga, controle da aderência e a possibilidade de toxicidade em longo prazo. Por esta razão, são necessárias outras opções terapêuticas que já estão em desenvolvimento a partir de um grande número de alvos (SOUZA, 2008).



**Esquema 12. Sítio de atuação do Mesilato de Imatinibe.** Adaptado de DEININGER et al., 2000.

### 1.7.1.2.2 Novas opções terapêuticas

O dasatinibe já foi aprovado nos EUA, na Europa e, recentemente (dezembro de 2007), no Brasil; o nilotinibe, em fase avançada de estudos (inclusive fase III), o bosutinibe, o INNO - 406 e outras drogas que atuam em alvos como as aurora-quinases ou os inibidores de histonadeacetilases (SOUZA, 2008).

O dasatinibe foi aprovado para o tratamento de adultos com LMC em FC, FA ou crise blástica resistentes ou intolerantes ao tratamento prévio com imatinibe. Dasatinibe é um inibidor de tirosinoquinase BCR-ABL disponível na forma oral, sendo, *in vitro*, 300 vezes mais ativo do que o MI. A ação antileucêmica do dasatinibe ocorre sobre a conformação fechada e aberta da molécula do BCR-ABL. É uma droga multialvos, que atinge cerca de 15 alvos dentro da molécula do BCR-ABL. Atua sobre o domínio da ABL quinase, mas também inibe as quinases das famílias Src e Lyn. É ativa na terapêutica de um grande número de mutações, com exceção da T315I, que aparentemente é insensível a todas as drogas disponíveis comercialmente, no momento. O dasatinibe mostrou toxicidade hematológica maior que o MI e a toxicidade não-hematológica foi bastante semelhante, com exceção da efusão pleural e edema pulmonar, que não foi constatada com uso de MI (HOCHHAUS, 2007).

O nilotinibe é uma nova aminopiridina, disponível na forma oral, que é um inibidor ATP-competitivo da atividade da proteína tirosinoquinase do BCR-ABL, prevenindo a ativação das vias mitogênico e antiapoptótica dependentes do BCR-ABL, levando à morte do fenótipo do BCR-ABL (GOLEMOVIC et al., 2005). Dados de estudos pré-clínicos demonstram que o nilotinibe atinge concentrações intracelulares mais elevadas do que o MI e inibe a atividade da tirosinoquinase do BCR-ABL induzindo a apoptose em concentrações mais baixas do que o MI (MANLEY et al., 2005). O nilotinibe mostra perfil, potência e seletividade pelo ABL entre vinte e cinquenta vezes maior que o MI. Não foram observadas diferenças nas respostas dentre os pacientes com e sem mutações, com exceção daqueles que apresentam a mutação T315I onde o nilotinibe é insensível (KANTARJIAN et al., 2006; LE COUTRE et al., 2007). Estudo recente mostra ainda que pacientes resistentes ao MI e ao dasatinibe podem se beneficiar com o uso do nilotinibe (BRECCIA et al., 2007).

Outras drogas também estão em desenvolvimento para o tratamento de pacientes resistentes ou intolerantes aos inibidores de primeira e segunda geração, particularmente

contra a mutação T315I. Bosutinibe (SKI-606) é um novo e ativo inibidor dual do Src e do complexo ABL. O bosutinibe é muito mais ativo que o MI *in vitro* e em algumas mutações testadas (PUTTINI et al., 2006). O INNO-406, previamente conhecido como NS-187, é ativo contra os complexos BCR-ABL e Lyn, sendo, portanto, também um inibidor dual (CARTER et al., 2005).

### **1.7.2 Tumor Estromal Gastrointestinal - GIST**

Os GISTs são neoplasias mesenquimais originadas de algum órgão do trato gastrointestinal ou do mesentério e omento (LYDON; DRUKER, 2004). Com o uso de microscopia eletrônica e da imunohistoquímica e a descoberta dos marcadores c-Kit (CD 117) e CD34, hoje se podem diferenciar os GISTs dos leiomiomas e leiomiossarcomas. Foi demonstrado que a maioria dos GISTs expressava c-Kit, que é largamente expresso em células da linhagem hematopoiética, mastócitos e também nas células intersticiais de Cajal. Os estudos usando a imunohistoquímica com marcadores moleculares demonstraram que a origem celular desta neoplasia é provavelmente a célula intersticial de Cajal, dita célula “marca-passo”, pois controla a motilidade intestinal (WANG et al., 2000). GISTs são molecularmente caracterizados pela mutação no oncogene KIT, localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q11-12) (GOMES et al., 2008). KIT é uma proteína transmembrana que funciona como um receptor para o SCF e como uma tirosinoquinase. A maioria das mutações ocorre em GISTs não tratados, no éxon 11 que codifica a parte intracelular justamembrana da proteína, e raramente em éxons que codificam o domínio quinase intracelular (JOENSUU, 2006). Atualmente, o diagnóstico de GIST é parcialmente dependente da superexpressão de CD117 nas células tumorais, juntamente com positividade para CD34 (GOMES et al., 2008).

GISTs avançados são não-respondedores aos quimioterápicos convencionais. As frequentes mutações de c-Kit levam a um ganho de função, resultando na ativação da sinalização de c-Kit que leva a uma proliferação celular descontrolada e resistente a apoptose (FRYE et al., 2004). MI é um antagonista competitivo para o sítio de ligação do ATP, bloqueando, desta forma, a capacidade do c-Kit de transferir grupos fosfato do ATP para os resíduos de tirosina das proteínas, interrompendo o sinal de transdução mediado por c-Kit (KURAMATO et al., 2006; MARTIN et al., 2002).

Estudos em fase I e fase II demonstraram grande eficácia da terapia com MI em GIST, tumores resistentes a quimioterapia convencional ou radioterapia. Estudos de fase I

demonstraram que duas doses diárias de 400mg foram bem toleradas e promoveram a inibição do crescimento tumoral. Estudo de fase II demonstrou que mais da metade dos pacientes tiveram redução tumoral, não tiveram progressão da doença e não desenvolveram novas lesões (GUILHOT, 2004). O MI revolucionou o tratamento dos GIST metastáticos induzindo respostas objetivas em mais de 50% dos pacientes tratados e prolongando a sobrevida média de 18 meses (na era pré-imatinibe) para 60 meses (BLANKE et al., 2008).

A cirurgia é o tratamento padrão para GIST não-metastático, com ressecção em bloco, enquanto o MI é o tratamento padrão para GIST metastático (JOENSUU, 2006). A dose inicial recomendada é de 400 mg/dia, mas até um terço dos pacientes apresentando progressão de doença nessa dose podem ter a doença controlada pelo aumento para 800 mg/dia. Aproximadamente 65-70% dos pacientes atingem resposta parcial, e outros 15-20% têm a doença estabilizada (DEMETRI et al., 2002).

Apesar da ótima atividade clínica do MI, 10% dos pacientes com GIST avançado exibem resistência primária ao fármaco e 20% desenvolvem resistência secundária (JOENSUU, 2006). A resistência primária, em geral, está associada a mutações do KIT éxon 9 e PDGFR $\alpha$  éxon 18, e a resistência secundária está associada a mutações secundárias do KIT éxon 11 (ZALCBURG et al., 2005).

Pacientes que progridem, apesar do escalonamento de doses de MI, são candidatos à terapia com outros inibidores de tirosinoquinases, como o sunitinibe. O sunitinibe é um agente oral que inibe a fosforilação de diversas tirosinoquinases, incluindo c-Kit, PDGF-R, VEGF-R, Flt-3 (*FMS-Like Tyrosine Kinase 3*) e RET (abreviatura do inglês *Rearranged during transfection*); que foi aprovado nos Estados Unidos, em julho de 2006, como tratamento de segunda linha, quando não há resposta devido resistência primária ou secundária, ou devido à intolerância (CASALI et al., 2006).

Os benefícios com MI demonstrados pelos pacientes de GIST frequentemente não são duráveis, o grau de resposta não parece estar correlacionado com a duração da terapia. A resposta dos pacientes de GIST tratados com MI é dependente não somente da presença, mas também do tipo de mutações encontradas (RAUT et al.; 2006). Muitos estudos indicaram que o efeito do MI nas células estromais do trato gastrointestinal é mais citostático (parada do crescimento e multiplicação) do que citotóxico (morte celular), o que tornaria as células mais suscetíveis a mutação dos seus receptores (SCIOT et al., 2006).

Embora, inicialmente, se considerava que o MI afetava minimamente a hematopoiese normal, recentes estudos demonstram que o MI pode inibir o crescimento de algumas células

hematopoiéticas não-malignas (DEWAR et al., 2005). Foi demonstrado que o MI pode afetar a mobilização, proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas resultando na mielossupressão dos pacientes em tratamento. Os efeitos colaterais do MI são dose-dependentes, reversíveis e afetam todas as linhagens hematopoiéticas, embora em graus variáveis (APPEL et al., 2006). Em adição aos efeitos diretos no crescimento de progenitores hematopoiéticos, MI pode afetar o crescimento destas células através da influência no microambiente medular (HOLTZ et al., 2002). O MI tem mostrado afetar severamente as células do estroma medular *in vitro* (MELZER et al., 2004), o que torna fundamental o conhecimento das suas ações sobre estas células, bem como, o entendimento da interação das células do estroma medular e células hematopoiéticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a mielossupressão causada pelo Mesilato de Imatinibe sobre células progenitoras hematopoiéticas e células do estroma da medula óssea de camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito mielossupressor do MI sobre células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea de camundongos, *in vitro*, por meio do ensaio clonogênico CFU-GM;
- Verificar a viabilidade e/ou proliferação de células do estroma da medula óssea de camundongos cultivadas na presença de MI;
- Identificar a presença de adipócitos em cultura de células do estroma da medula óssea de camundongos na presença de MI;
- Avaliar os efeitos do MI nas fases do ciclo celular de células do estroma da medula óssea de camundongos;
- Verificar a expressão de  $\alpha$ -SMA em células do estroma da medula óssea de camundongos cultivadas na presença de MI.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS<sup>1</sup>

#### 3.1 REAGENTES:

- Albumina bovina, Anticorpo primário anti- $\alpha$  SMA, Azul de Trypan 0,5%, 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Dimetilsulfóxido (DMSO), Fator Estimulador de Colônia de Granulócito/Macrófago (GM-CSF), Hidrocortisona, Histopaque-1077, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), Membrana de nitrocelulose para filtração com poros de 0,22 $\mu$ m de diâmetro, Oil Red O, Tripsina (0,25%) - EDTA (0,02%), Triton X-100 e Tween 20 adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);

- 5-bromo-2-deoxiuridinina (BrdU) adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA);
- Anticorpo primário anti-BrdU adquirido da Calbiochem (Merck; Darmstadt, Alemanha);
- Anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo - Tx-Rd e Anticorpo secundário anti-IgG2a de camundongo - FITC adquiridos da Sourthen Biothec (Birmingham, Alabama, EUA);
- Bicarbonato de sódio e Paraformaldeído adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) adquirido da Cultilab (SP, Brasil);
- Formaldeído 37% e Isopropanol adquiridos da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico adquiridos da Vetec (RJ, Brasil);
- Garrafas de Cultura e Placas de Cultura adquiridas da TPP (Zollstrasse, Suíça);
- Gentamicina adquirida da Schering-Plough (Kenilworth, NJ, EUA);
- Lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro adquiridas da Glasscyto;
- Mesilato de Imatinibe (Glivec®) adquirido da Novartis (Basel, Suíça);
- PI/RNASE Solution Kit adquirido da Immunostep (Salamanca, Espanha);
- Penicilina/estreptomicina (PS) e Soro Bovino Fetal (SBF) adquiridos da Gibco™ (Carlsbad, CA, EUA).

#### 3.2 METODOLOGIA

##### 3.2.1 Modelo Experimental

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) sadios machos, entre 1,5 e 2 meses de idade oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. O

---

<sup>1</sup> Animais e pacientes foram estudados neste trabalho, porém, por convenção, optou-se por adotar o nome "Materiais e Métodos" para este capítulo incluindo tanto procedimentos *in vitro* como *in vivo*.



projeto para uso de camundongos na pesquisa com o MI foi aceito pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo PP00127 em 13 de agosto de 2007 (Anexo I).

Os camundongos chegaram ao Laboratório de Citologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, CCS – UFSC, e foram imediatamente sacrificados, não sendo necessária nenhuma estrutura adicional para acondicionamento dos animais.

### **3.2.2 Obtenção da medula óssea dos camundongos**

Os camundongos foram mortos por deslocamento cervical. Após extração dos fêmures com auxílio de material cirúrgico estéril, a MO foi retirada diretamente dos fêmures em capela de fluxo laminar. Os fêmures foram limpos com gazes e as epífises foram cortadas. A MO foi retirada com auxílio de uma seringa com agulha contendo meio de cultura específico. Todos os materiais foram previamente autoclavados. As células mononucleares da MO foram obtidas através de separação por meio de gradiente de densidade com Histopaque (1.077 g/mL) conforme recomendações do fabricante e ressuspensas em meio de cultura.

### **3.2.3 Quantificação das células mononucleares viáveis**

As células coletadas, após passarem pelo processo de separação através do gradiente de densidade, foram quantificadas e avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan em hemocitômetro, em uma suspensão de células 1:1 com o corante. As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno.

### **3.2.4 Obtenção do Mesilato de Imatinibe**

Os comprimidos de Mesilato de Imatinibe 400mg (Glivec® - Novartis) foram obtidos através de uma doação do Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina (CEPON/SC), local onde o medicamento é distribuído para os usuários. Esclarecemos que os comprimidos doados eram devoluções de pacientes que por algum motivo interromperam seu uso, não comprometendo, portanto, o estoque do medicamento disponível para os demais pacientes.

### **3.2.5 Preparo do Mesilato de Imatinibe**

Soluções estoques de 10mM de MI foram preparadas a partir da trituração de um comprimido de 400mg do princípio ativo dissolvido em 68mL de solução de DMSO/H<sub>2</sub>O de Mili-Q (1:1), foram filtrados utilizando filtro com poros de 0,22µm de diâmetro, aliquotados em tubo eppendorf de 1mL e congelados para posterior utilização. A concentração final de DMSO quando o MI foi inserido em cultura ficou em média entre 0.1% e 0.37%, portanto não exerceu efeito inibitório sobre o crescimento das células em estudo (BARTOLOVIC, 2004). No dia do experimento, foram feitas as diluições necessárias com o meio IMDM para se obter as diferentes concentrações testadas.

### **3.2.6 Meios de cultura**

#### **3.2.6.1 Meio de cultura IMDM**

O meio de cultura utilizado foi o meio IMDM contendo L-glutamina tamponado com 25mM de HEPES, suplementado com 10% (v/v) de SBF;  $5 \times 10^{-7}$ M de hidrocortisona e 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina (PS), diluído em água de Mili-Q estéril e esterelizado por filtração à vácuo utilizando membrana de nitrocelulose com poros de 0,22µm de diâmetro. O meio preparado foi estocado em freezer e as alíquotas em uso permaneceram sob refrigeração por até 5 dias.

#### **3.2.6.2 Meio de cultura IMDM 2x concentrado**

O meio de cultura IMDM 2x foi preparado com a metade do volume de água de Mili-Q recomendado e não foi adicionado SBF nem hidrocortisona.

### **3.2.7 Ensaio clonogênico com células progenitoras hematopoiéticas**

O ensaio clonogênico foi preparado em capela de fluxo laminar, com rigorosa assepsia e esterilidade do material. Foram utilizadas placas de cultura estéreis de 6 poços. Foram plaqueadas duas camadas de 1mL cada: primeiramente a Camada Base (para sustentação) e após a Camada de Células.

### **3.2.7.1 Camada Base**

A Camada Base é composta por 0,3mL de IMDM 2x concentrado; 0,3 mL de SBF e 0,4 mL de Ágar 1,25%.

### **3.2.7.2 Camada de Células**

Conforme o protocolo estabelecido pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* (PESSINA et al., 2003), a camada de células foi preparada com 0,2 mL de IMDM 2x concentrado adicionado de 1% de albumina bovina; 0,3 mL de SBF; 0,3mL de Ágar 1,25%; 0,1mL de suspensão de células mononucleares da MO ( $1 \times 10^5$  células mononucleares viáveis/mL); 0,1mL de GM-CSF 5ng/mL e quantidade variável do fármaco a ser testado (0 $\mu$ M (controle); 1,25 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M; 5 $\mu$ M; 10 $\mu$ M; 20 $\mu$ M; 25 $\mu$ M; 30 $\mu$ M; 35 $\mu$ M; 40 $\mu$ M; 50 $\mu$ M e 60 $\mu$ M de MI). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Células cultivadas sem a presença do fármaco foram consideradas o grupo controle do experimento.

### **3.2.7.3 Incubação e contagem de colônias**

Depois do plaqueamento das duas camadas, as placas foram incubadas durante 7 dias em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o número de colônias formadas foi contado através de microscopia ótica.

O material incubado foi transferido para uma lâmina de microscopia, foi corado por May-Grünwald e Giemsa e a morfologia das colônias foi avaliada.

### **3.2.8 Cultura de células do estroma da medula óssea**

A cultura de células do estroma foi preparada em capela de fluxo laminar conforme descrito por TESTA e MOLINEUX (1993). Foram utilizadas placas de cultura estéreis de 24 poços ou garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e o meio de cultura IMDM. O volume final de meio por poço foi de 1mL e para as garrafas foi de 30 mL. A quantidade de células utilizadas foi de  $2 \times 10^6$  células mononucleares viáveis/poço e  $6 \times 10^7$  células mononucleares viáveis /garrafa. As placas e garrafas foram incubadas por 4-14 dias em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção da cultura foi realizada a cada 3-4 dias, onde metade do volume do sobrenadante foi removida juntamente com as células que não aderiram ao plástico

e substituído por igual volume de meio de cultura IMDM. O fármaco foi adicionado no primeiro dia de cultura e novamente acrescentado durante as trocas de meio em concentração proporcional. Células cultivadas sem a presença do fármaco foram consideradas o grupo controle do experimento.

A partir destas culturas foram realizados os seguintes ensaios: MTT, citotóxica Oil Red O, ciclo celular, fluorescência do LA/BE, imunocitoquímicas para BrdU e  $\alpha$ -SMA. Paralelamente, culturas em placas e garrafas foram utilizadas para avaliação da morfologia celular, sendo coradas com May-Grünwald e Giemsa.

### **3.2.8.1 Viabilidade celular - Método do MTT**

A viabilidade celular foi realizada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio de coloração amarelada que sofre redução para um derivado formazan de cor azulada por intermédio da atividade oxidativa das células. Esse método funciona como indicador da função mitocondrial. Apenas as células vivas metabolizam o sal, o que torna o método indicador da viabilidade celular. Inicialmente, as células foram incubadas por 7 e 14 dias, como descrito anteriormente, com 0 $\mu$ M (controle), 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M e 25 $\mu$ M de MI. Após esse período, o sobrenadante dos poços de cultura foi removido e então adicionado meio de cultura IMDM contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 3 horas de incubação a 37°C, o sobrenadante foi removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em solução ácida de isopropanol (isopropanol-HCl 0,04 N) e o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços. Em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium) no comprimento de onda 540nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis.

### **3.2.8.2 Viabilidade celular – Fluorescência de LA/BE**

As células apoptóticas foram visualizadas usando dois corantes fluorescentes: o laranja de acridina (LA), que é permeável à membrana, e o brometo de etídio (BE), que é impermeável (GENG *et al.*, 1999). Nesse ensaio, as células viáveis exibem coloração verde (proveniente do laranja de acridina), e as apoptóticas exibem coloração alaranjada (proveniente do brometo de etídio). Primeiramente, as células foram cultivadas sobre

lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro por 7 e 14 dias com 0 $\mu$ M (controle), 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M e 20 $\mu$ M de MI. Após esse período, retirou-se, cuidadosamente, a lamínula circular e colocou-se em uma lâmina de microscopia. O reagente foi preparado na hora do ensaio que consiste na mistura de volumes iguais do reagente laranja de acridina (10  $\mu$ g/mL) e do brometo de etídio (10  $\mu$ g/mL). A lamínula com as células e os corantes fluorescentes foi recoberta com outra lamínula e incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente (TA). As lâminas foram observadas em microscópio de imunofluorescência Olympus BX41 em aumento de 80x e fotografadas.

### **3.2.8.3 Citoquímica para identificação de adipócitos**

A citoquímica para identificação de adipócitos na cultura foi realizada através da coloração de vacúolos lipídicos nas células por Oil Red (PREECE, 1972), um corante lipossolúvel. O princípio da coloração obedece à lei da partição cromática de Berthelot - o corante é dissolvido numa mistura de um solvente orgânico e água, em proporção adequada, de modo que o coeficiente de partição entre a mistura e o corpo graxo seja muito pequeno. Quando as células são colocadas em contato com esta solução, o corante se dissolverá em alta concentração nos lipídios (NEVES, 1977).

Após os 14 dias de incubação com 0 $\mu$ M (controle), 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M e 25 $\mu$ M de MI, todo o meio de cultura foi retirado da placa. Os poços foram cuidadosamente lavados 2 vezes com tampão PBS 7,4. As células foram fixadas com 500 $\mu$ L de formalina 10%/poço e incubadas em TA por 30 minutos. Após, a formalina foi removida e as células foram lavadas 2 vezes com PBS 7,4. Foram adicionados 200 $\mu$ L de Oil Red O (solução de uso) em cada poço e incubou-se por 10 minutos em TA. Removeu-se o corante e as células foram rapidamente lavadas com isopropanol 60%. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada até que o excesso de corante fosse totalmente removido. Após a secagem, as células foram avaliadas por microscópio ótico Olympus CX21.

#### **3.2.8.3.1 Modo de preparo das soluções**

Formalina 10%: 4g de fosfato de sódio monobásico + 6,5g de fosfato de sódio dibásico + 100mL de formaldeído 37% dissolvidos em 900 mL de água destilada. Homogeneizou-se bem com auxílio de bastão de vidro ou agitador magnético e manteve-se em TA.

Oil Red O – Solução estoque: 0,3g Oil Red O dissolvido em 100mL isopropanol. Filtrou-se e foi estocado em TA.

Oil Red O – Solução de uso: 3 partes de Oil Red O estoque adicionadas de 2 partes de água destilada. Deixou-se em repouso em TA por 20min e procedeu-se a filtração em papel filtro. Estabilidade de 1-2 horas em TA.

#### **3.2.8.4 Ciclo celular**

Para avaliar os efeitos do MI nas fases do ciclo celular foi utilizado o *PI/RNASE Solution Kit* cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo iodeto de propídeo (PI), após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo, por variações no seu conteúdo de DNA, e, dessa forma, quantifica-se a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994).

Para a realização desta metodologia, as células foram inicialmente plaqueadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas durante 14 dias com 0µM (controle), 5µM, 10µM, 15µM e 20µM de MI. Após esse período, as células foram descoladas com 2mL de tripsina (0,25%)-EDTA (0,02%) sob agitação por até 5 minutos. A tripsina foi então inativada com a adição 2 mL de IMDM contendo SBF.

O procedimento foi realizado conforme o kit do fabricante Immunostep. Brevemente, as células lavadas foram fixadas com 200 µL de etanol 70% e incubadas durante 30 minutos em temperatura de – 4°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas em 300g durante 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se ao *pellet* celular 500µL de solução de PI contendo RNase e permaneceu 15 minutos em TA. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA) com auxílio do software BD CELLQuest™. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento com o fármaco para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo. Os histogramas foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

### **3.2.8.5 Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU**

A proliferação das células cultivadas foi avaliada através do ensaio de incorporação do BrdU que corresponde a um análogo da timidina, incorporando-se ao DNA das células que estão proliferando (durante a fase S do ciclo celular).

Após 4, 8 e 14 dias de cultura com 0 $\mu$ M (controle); 5 $\mu$ M; 7,5  $\mu$ M; 10 $\mu$ M; 15 $\mu$ M; 20 $\mu$ M e 25 $\mu$ M de MI, as células foram incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> com 1 $\mu$ g/mL de BrdU. Após o período de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos em TA. Logo após, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com ácido clorídrico 2N durante 30 minutos à 37°C. As culturas foram lavadas com PBS e procedeu-se a reação imunocitoquímica descrita a seguir.

### **3.2.8.6 Análise Imunocitoquímica – BrdU e $\alpha$ -SMA**

Para realização do ensaio de imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos em TA, lavadas 3 vezes com PBS 7,4 e as membranas celulares foram permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos em TA. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF durante 40 minutos, e, em seguida as células foram submetidas à reação imunocitoquímica utilizando-se anticorpos primários e secundários específicos. A incubação com os anticorpos primários (anti-BrdU IgG1 1:100 e anti- $\alpha$ SMA IgG2a 1:800 - anti alfa actina de músculo liso) foi realizada por um período de 1 hora à TA. A seguir, procederam-se 3 lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) e uma nova incubação de 1 hora com os anticorpos secundários (anti-IgG1 de camundongo conjugado à TxRd 1:75 e anti-IgG2a de camundongo conjugado à FITC 1:75). Após 3 novas lavagens com PBS-Tween, as células foram incubadas com corante nuclear DAPI 50ng/mL por 15 segundos à TA para análise do número total núcleos celulares. As marcações fluorescentes foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX 40.

### **3.2.9 Cultivo da RAW 264.7**

Para analisar o efeito do fármaco somente sobre linhagens macrofágicas, foram cultivadas células de uma linhagem “macrophage-like” comercializada pela *American Type Culture Collection* (ATCC®) denominada RAW 264.7 proveniente de um tumor murino

(leucemia). A linhagem foi obtida em colaboração com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná.

As culturas foram preparadas em fluxo laminar, utilizando placas de cultura estéreis de 24 poços. O meio utilizado foi DMEM suplementado com 1,8 g/L de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de SBF, 0,1% (v/v) de antibiótico gentamicina 40 mg/mL totalizando um volume de 2mL/poço. A quantidade de células utilizadas foi de  $1 \times 10^4$  células viáveis/poço. As placas foram incubadas durante 72 horas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção da cultura foi realizada 24 horas após o início da cultura, onde metade do volume do sobrenadante foi removido e substituído por igual volume de meio de cultura DMEM. O fármaco foi adicionado no primeiro dia de cultura (0µM (controle); 2,5µM; 5µM; 7,5 µM; 10µM; 15µM e 20µM) e novamente acrescentado durante as trocas de meio em concentração proporcional. Células cultivadas sem a presença do fármaco foram consideradas o grupo controle do experimento.

Ao final das 72 horas, as células foram descoladas com 200µL de tripsina (0,25%) - EDTA (0,02%) sob agitação por até 5 minutos e a tripsina foi então inativada com a adição 200µL de meio DMEM contendo SBF. As células foram quantificadas e avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan em hemocítômetro como previamente descrito.

### **3.2.10 Análise de prontuários**

Dados de prontuários médicos de pacientes com diagnóstico de Tumor Estromal Gastrointestinal (GIST) foram coletados no CEPON/SC mediante aprovação do Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da UFSC (CEPSH) sob nº de processo 202/08 em 25 de agosto de 2008 (Anexo II) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CEPON registrado sob o número 004/2008 em 09 de maio de 2008 (Anexo III).

#### **3.2.10.1 Amostragem**

Foram avaliados os dados de um total de 22 pacientes com diagnóstico de GIST desde a sua inclusão no protocolo de administração de MI. O primeiro paciente foi incluído em 2002 e até o momento da coleta de dados (dezembro/2008) haviam 36 pacientes inseridos neste protocolo.



### **3.2.10.2 Dados**

Foram coletados dados referentes aos hemogramas realizados avaliando os seguintes parâmetros:

- Número de leucócitos totais;
- Número de neutrófilos;
- Número de plaquetas;
- Número de eritrócitos;
- Valor de hematócrito;
- Valor de hemoglobina.

Também foram coletados os seguintes dados dos pacientes:

- Sexo;
- Idade;
- Dose do fármaco administrada.

### **3.2.10.3 Critérios de inclusão:**

- Pacientes de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, com diagnóstico definitivo de GIST que fizeram uso de MI pelo período mínimo de 1 ano.

- Pacientes que fizeram quimioterapia anterior ao uso de MI tiveram os primeiros dados coletados a partir de 6 meses da entrada no protocolo.

### **3.2.10.4 Critérios de exclusão:**

- Paciente que utilizavam concomitantemente outra medicação sabidamente mielossupressora.

- Pacientes que apresentaram outras patologias concomitantes ao GIST.

### **3.2.10.5 Recrutamento dos pacientes**

Como é uma análise retrospectiva apenas de prontuários dos pacientes, houve necessidade apenas da obtenção de uma lista contendo o nome dos pacientes que utilizavam o medicamento, fornecido pelo CEPON/SC. Os prontuários foram liberados para análise apenas após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos

pacientes. Os TCLEs foram obtidos no momento da retirada do medicamento na Farmácia do CEPON, quando os pacientes puderam ser esclarecidos pelo próprio pessoal da Farmácia ou pelo pesquisador sobre o trabalho.

### **3.2.10.6 Valores de Referência**

Os valores de referência utilizados para avaliar os dados da série leucocitária foram os adotados por HENRY, 2008. Leucócitos totais = 4.500 a 11.000/mm<sup>3</sup>, neutrófilos totais = 1.800 a 7.700/mm<sup>3</sup>. Os valores de referência para hemoglobina foram os adotados pela OMS, 2001. Mulher não grávida  $\geq$  12g/dL e homens  $\geq$  13g/dL.

### **3.2.11 Análise estatística dos resultados**

Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  1 Erro Padrão da Média (E.P.M.) ou 1 Desvio Padrão (DP). Para análise estatística dos resultados, usou-se o Teste “t” de *Student* independente por grupos; ou Análise de Variância de uma via (ANOVA), o teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey. Os cálculos e gráficos foram realizados utilizando-se o programa *Statistica 6.0* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **4. RESULTADOS**

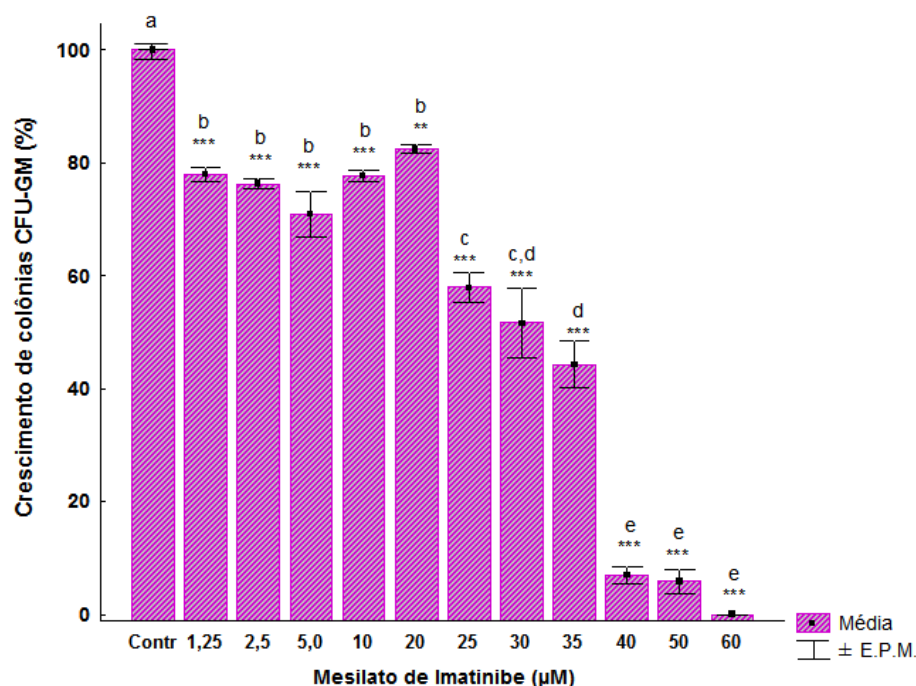
### **4.1 Efeito mielossupressor do Mesilato de Imatinibe sobre células progenitoras hematopoiéticas CFU-GM**

As células mononucleares da MO dos camundongos foram cultivadas com o fármaco em concentrações crescentes (1,25 – 60  $\mu\text{M}$ ) em meio semi-sólido durante 7 dias. Após esse período, as células foram analisadas em microscópio invertido apresentando-se em colônias compostas por granulócitos e/ou macrófagos. Todas as colônias presentes em cada poço foram contadas através de microscopia ótica. Considerou-se uma colônia quando esta apresentou mais de 50 células, entre 10-50 células foi considerado um “cluster” (TESTA; MOLINEUX, 1993).

#### **4.1.1 Efeito no crescimento de colônias CFU-GM**

Como demonstrado na Figura 1, o MI interferiu na formação de colônias CFU-GM (CFU-G/CFU-M), verificado pelo crescimento de colônias em relação ao grupo controle (100%).

O grupo controle (células sem tratamento) e células tratadas com 1,25  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5,0  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 20  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$ ; 35 $\mu\text{M}$ ; 40  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$  e 60  $\mu\text{M}$  de MI demonstraram um crescimento de 100%  $\pm$  1,8%; 77,93%  $\pm$  1,3%; 76,29%  $\pm$  1,1%; 70,94%  $\pm$  4,1%; 78,36%  $\pm$  1,1%; 82,51%  $\pm$  0,8%; 57,98%  $\pm$  2,5%; 51,68%  $\pm$  6,3%; 44,31%  $\pm$  4,1%; 6,99%  $\pm$  1,5%; 5,86%  $\pm$  2,2% e 0% (nenhum crescimento), respectivamente.



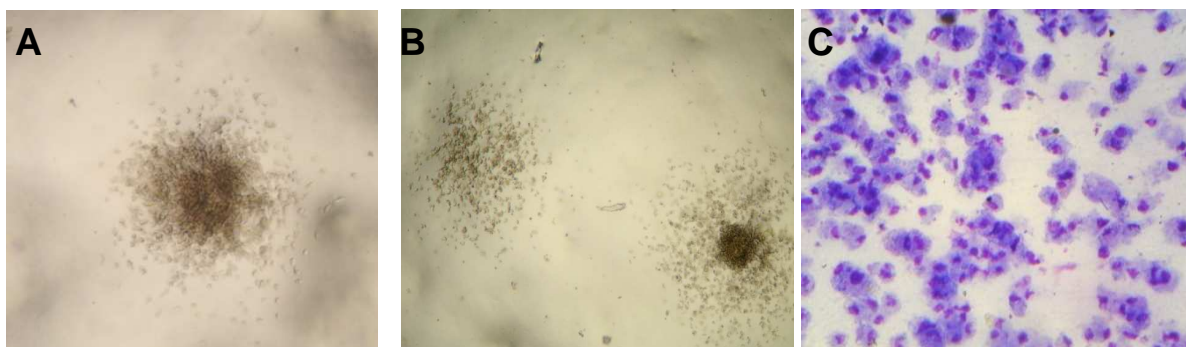
**Figura 1. Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre o crescimento de colônias CFU-GM obtidos da medula óssea de camundongos.** As células foram cultivadas durante 7 dias na presença do fármaco conforme descrito em materiais e métodos. A quantificação de colônias foi demonstrada em percentual de crescimento (%) em relação ao grupo controle (100% de crescimento). Cada ponto representa a média  $\pm$  1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Como observado, a concentração de MI que inibiu totalmente o crescimento de colônias CFU-GM foi 60  $\mu$ M.

Para efeito de comparação com outros fármacos, a  $IC_{50}$  (concentração que inibiu 50% do crescimento de colônias) foi calculada através de equação matemática, obtendo-se um resultado de 26,5  $\mu$ M de MI.

#### 4.1.2 Morfologia das colônias CFU-GM

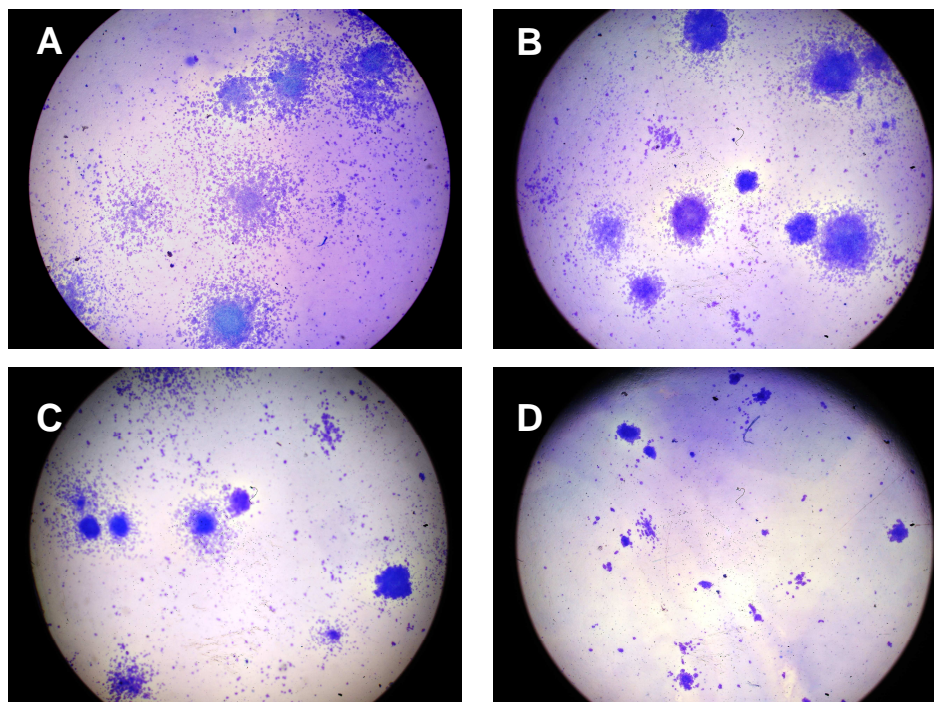
Nos ensaios clonogênicos, podemos encontrar diferentes tipos de colônias quando as células são estimuladas com GM-CSF, como pode ser observado na Figura 2. A colônia compacta possui um núcleo denso e um halo periférico, enquanto que a colônia difusa/espalhada não apresenta um núcleo aparente (PESSINA et al., 2000).



**Figura 2. Morfologia das colônias CFU-GM encontradas após 7 dias de cultivo em meio semi-sólido.** Em microscópio óptico observa-se uma colônia compacta em aumento de 100x (A); uma colônia difusa (à esquerda) e uma compacta (à direita) em aumento de 100x (B) e células G/M de colônia corada pela técnica May-Grünwald e Giemsa em aumento de 400x (C).

#### 4.1.3 Alteração do número e morfologia das colônias na presença de MI

Os efeitos apresentados no item 4.1.1 podem ser observados também visualizando fotografias representativas (Figura 3) das culturas tratadas com o MI. Observou-se que houve uma diminuição gradativa no número e no tamanho das colônias CFU-GM conforme foi aumentando a concentração de MI. Inicialmente, havia colônias compactas e difusas nas mesmas proporções, porém, com o aumento da concentração do fármaco, houve diminuição do número de colônias com morfologia difusa.



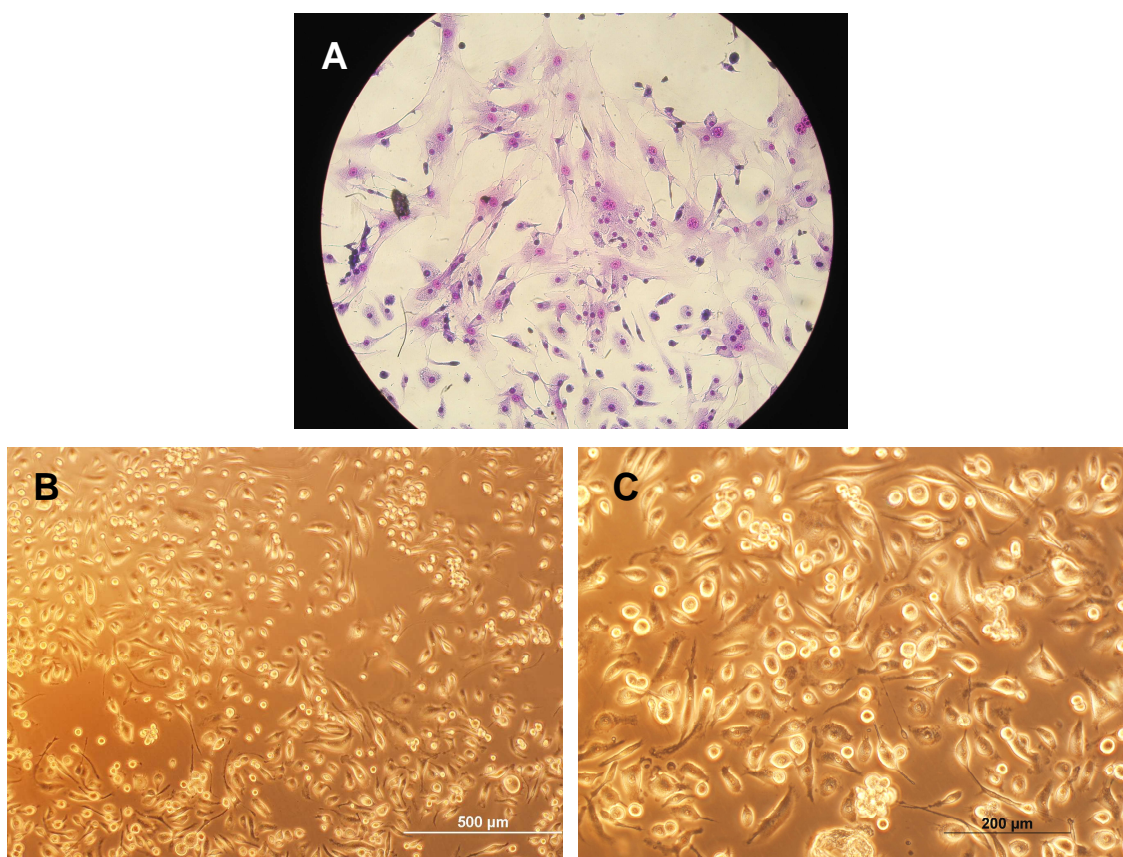
**Figura 3. Morfologia das colônias CFU-GM em culturas tratadas com Mesilato de Imatinibe (MI).** As colônias inicialmente apresentam-se grandes e numerosas (A – controle). Entre 1,25 $\mu$ M e 20 $\mu$ M de MI (B), o tamanho das colônias diminui. Entre 25 $\mu$ M e 35 $\mu$ M (C), o número e o tamanho



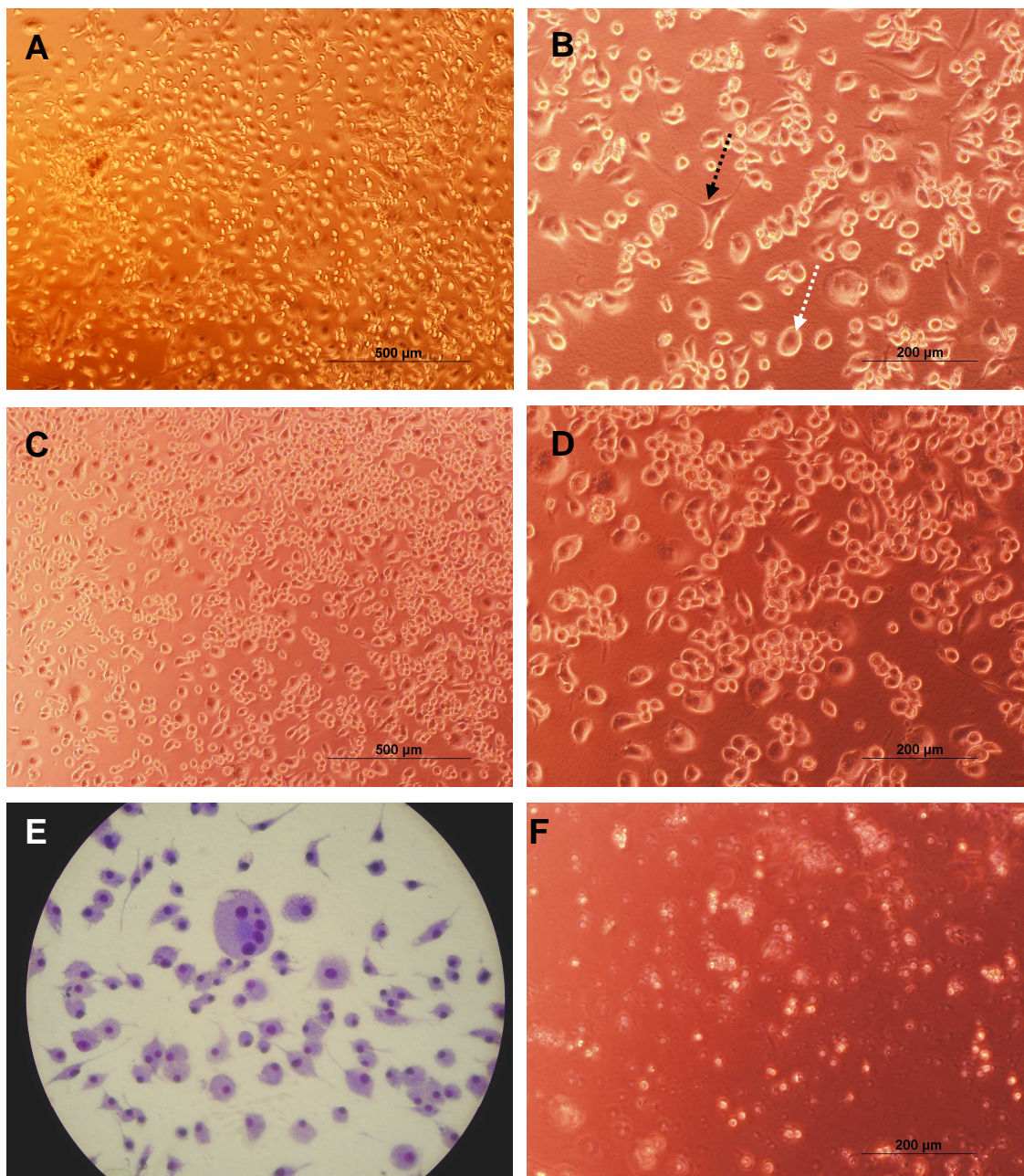
das colônias diminuem, principalmente, colônias de morfologia difusa. Finalmente, a partir de 40 $\mu$ M (D), quase não são encontradas colônias e clusters são visualizados. Células foram coradas pela técnica May-Grünwald e Giemsa e visualizadas em aumento de 40x.

#### 4.2 Morfologia das células do estroma da medula óssea

As células do estroma da MO de camundongos quando cultivadas durante 14 dias, conforme descrito anteriormente, apresentam uma significativa alteração na morfologia. Como pode ser observado na Figura 4a, quase todas as células do grupo controle possuíam características fibroblásticas, núcleo grande, citoplasma abundante e alongado. Conforme as células foram tratadas com o MI, a morfologia predominante foi alterando, o número de células aumentou e nas concentrações mais elevadas do fármaco quase só havia células arredondadas, com núcleo pequeno ou menor que os núcleos observados inicialmente, citoplasma menos abundante, com características sugestivas de macrófagos (Figura 4b). Observa-se uma nítida diferença na morfologia entre as figuras 4a (A) e 4b (E).



**Figura 4a. Morfologia das células do estroma da medula óssea de camundongos após 14 dias de cultivo com Mesilato de Imatinibe (MI).** (A) Células do grupo controle coradas pela técnica May-Grünwald e Giemsa em aumento de 200x; (B-C) Células do grupo controle sem coloração.

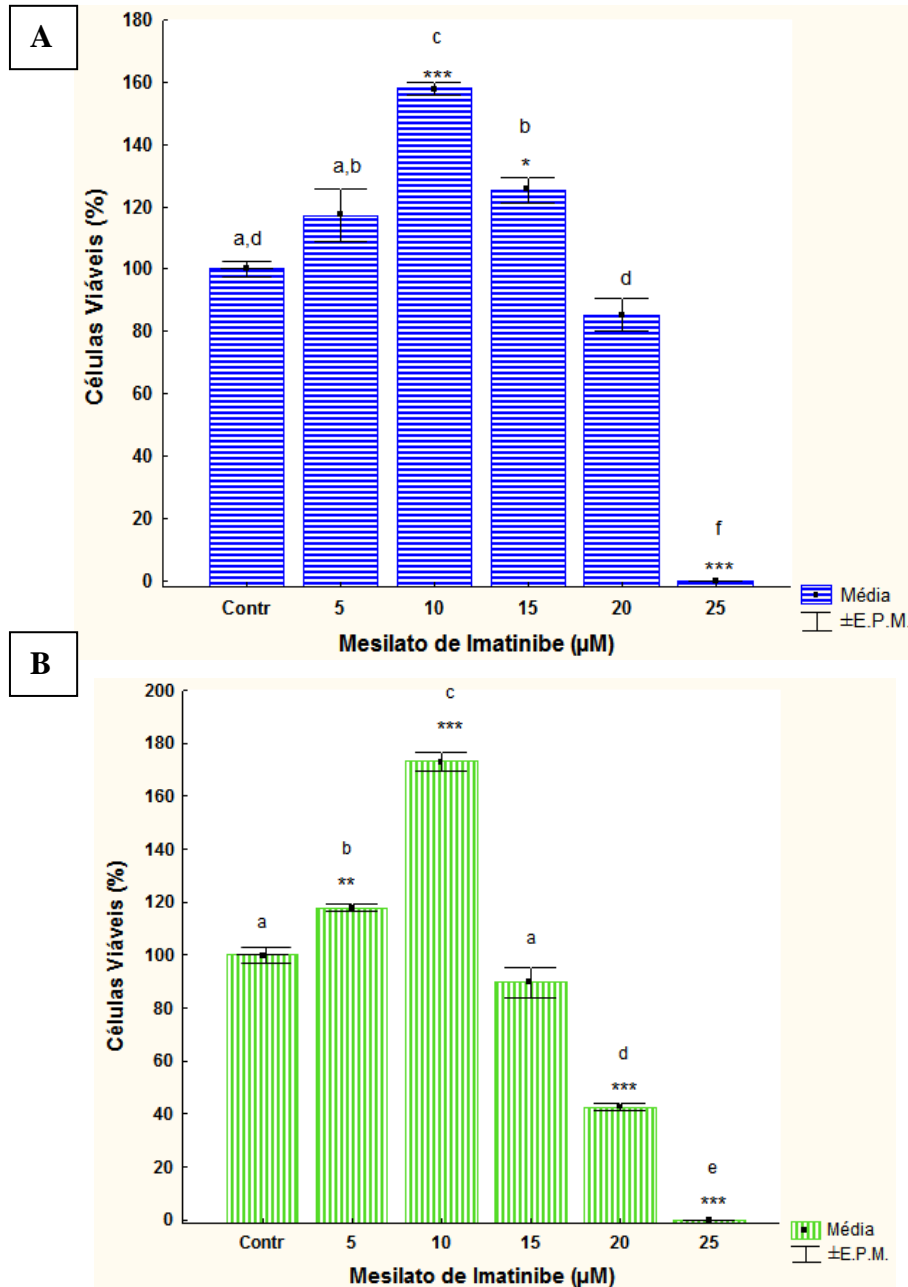


**Figura 4b. Morfologia das células do estroma da medula óssea de camundongos após 14 dias de cultivo com Mesilato de Imatinibe (MI).** (A-B) Células tratadas com 5 $\mu$ M de MI, (C-D) células tratadas com 10 $\mu$ M de MI, (E) células tratadas com 10 $\mu$ M de MI coradas pela técnica May-Grünwald e Giemsa em aumento de 400x e (F) restos de células tratadas com 20 $\mu$ M de MI. A seta branca indica célula com característica fibroblastóide e a seta preta indica célula arredondada.

### 4.3 Viabilidade celular - Método do MTT

As células foram incubadas por 7 e 14 dias, submetidas ao ensaio do MTT e os resultados estão representados na Figura 5. Observa-se no 7<sup>o</sup> dia (A) que até 15  $\mu$ M de MI houve aumento do percentual de células viáveis e em 20  $\mu$ M o percentual decaiu até atingir

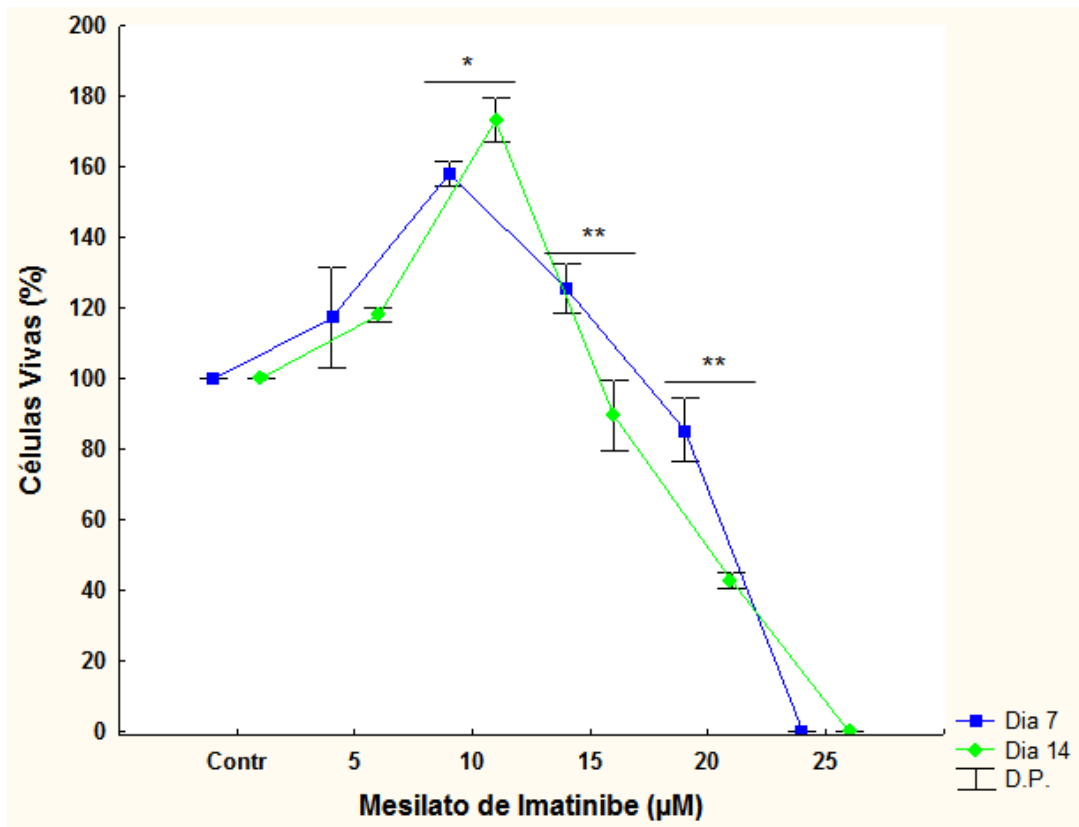
0% de células viáveis em 25  $\mu$ M. No 14<sup>o</sup> dia (B) de cultivo foi observado que em 5 e 10  $\mu$ M de MI houve aumento do percentual de células viáveis e em 15  $\mu$ M o percentual decaiu até atingir 0% de células viáveis em 25  $\mu$ M.



**Figura 5. Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre células do estroma da medula óssea de camundongos após 7 e 14 dias de cultivo.** A viabilidade celular foi avaliada no 7<sup>o</sup> dia (A) e no 14<sup>o</sup> dia (B) de cultura pelo método do MTT como descrito anteriormente. A densidade ótica do grupo controle corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



Os dados obtidos nos dias 7 e 14 foram comparados através do teste “t” de *Student*, conforme demonstrado na Figura 6. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes nas culturas tratadas com 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M e 20  $\mu$ M de MI, sendo que em 15 e 20  $\mu$ M essa diferença foi mais significativa.



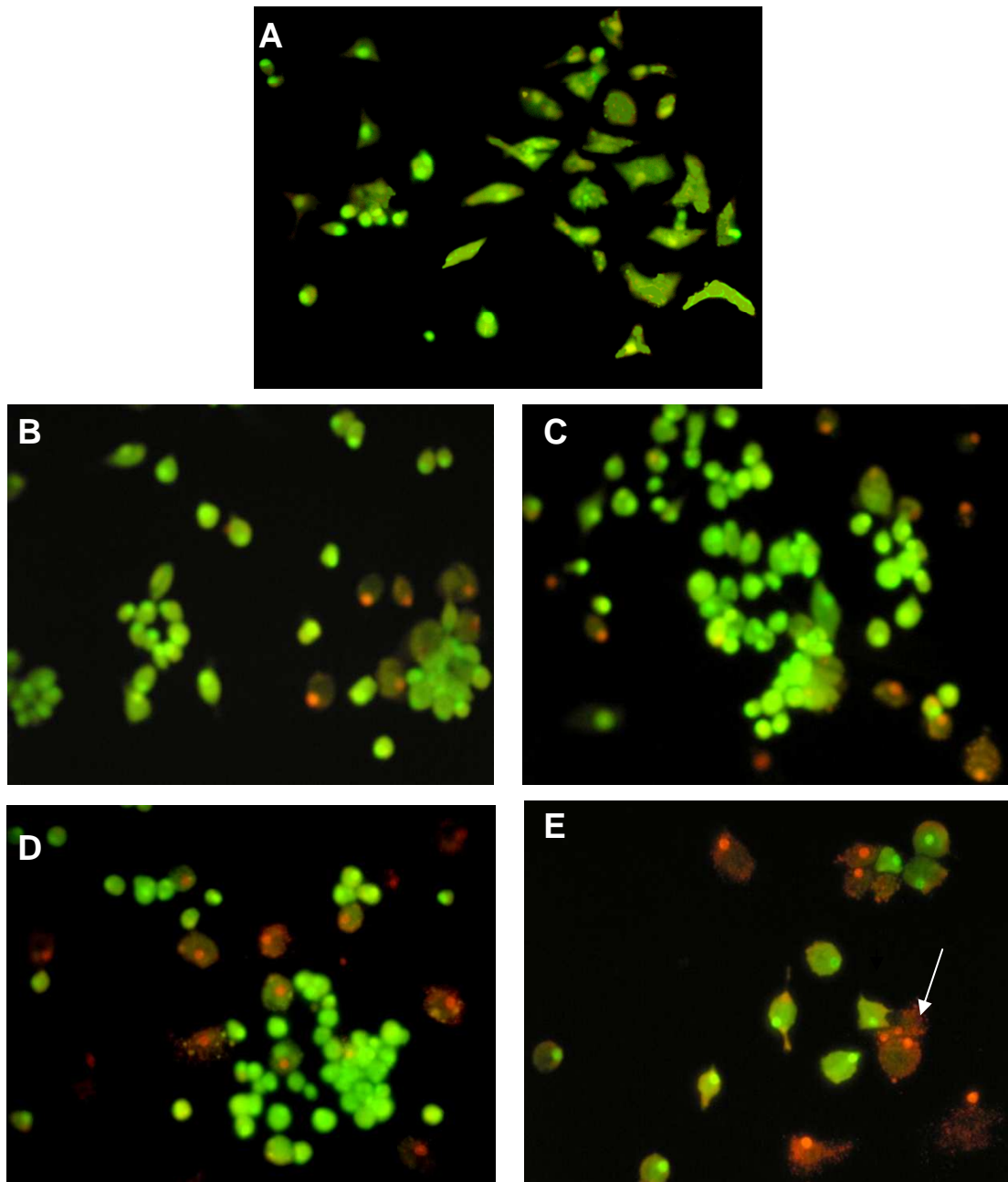
**Figura 6. Efeito comparado do Mesilato de Imatinibe sobre células do estroma da medula óssea de camundongos após 7 e 14 dias de cultivo.** Cada ponto representa a média  $\pm$  1 D.P. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle pelo teste “t” independente por grupo \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.4 Viabilidade celular - Fluorescência de LA/BE

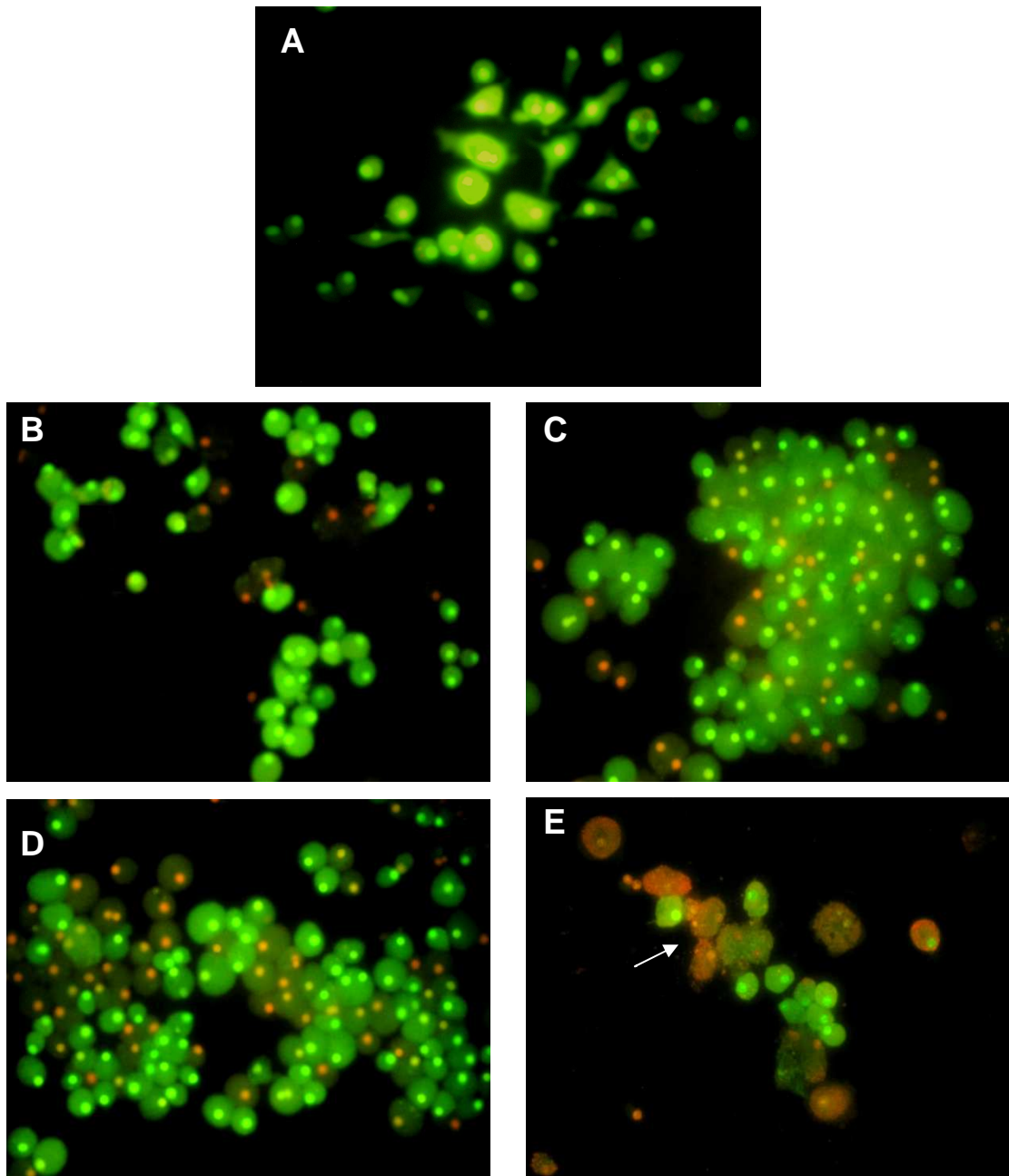
Células do estroma da MO de camundongos foram cultivadas conforme descrito anteriormente durante 7 e 14 dias na presença de MI. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência com a utilização de dois corantes: o laranja de acridina (LA) e o brometo de etídio (BE). As células viáveis apresentaram coloração verde fluorescente (LA) e as células apoptóticas exibiram coloração laranja (BE).

Nas Figuras 7 e 8, as células do grupo controle eram quase na totalidade viáveis e de morfologia variada. No tratamento com MI, a morfologia predominante foi sendo modificada e células apoptóticas foram surgindo. Em 10  $\mu$ M de MI, as células apresentaram-se

arredondadas, parecendo haver maior número de células que o controle e um número considerável de células em processo apoptótico (o início é caracterizado pela coloração alaranjada somente no núcleo). Quando as células foram tratadas com MI 20  $\mu$ M, havia poucas células em geral, a minoria viável, e muitas células apoptóticas, algumas com corpos apoptóticos evidentes. O efeito do tratamento das células com MI foi semelhante em 7 e 14 dias de cultivo, variando no número de células visualizadas que é superior no 14º dia, período quando a cultura atinge confluência de aproximadamente 70-80%.



**Figura 7.** Alterações citomorfológicas de células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe (MI) incubadas durante 7 dias. (A) Controle; (B) MI 5 $\mu$ M; (C) MI 10 $\mu$ M; (D) MI 15 $\mu$ M; (E) MI 20 $\mu$ M. As células viáveis apresentaram coloração verde fluorescente (laranja de acridina) e as células apoptóticas exibiram coloração laranja (brometo de etídio). A seta branca mostra uma célula com corpos apoptóticos evidentes.

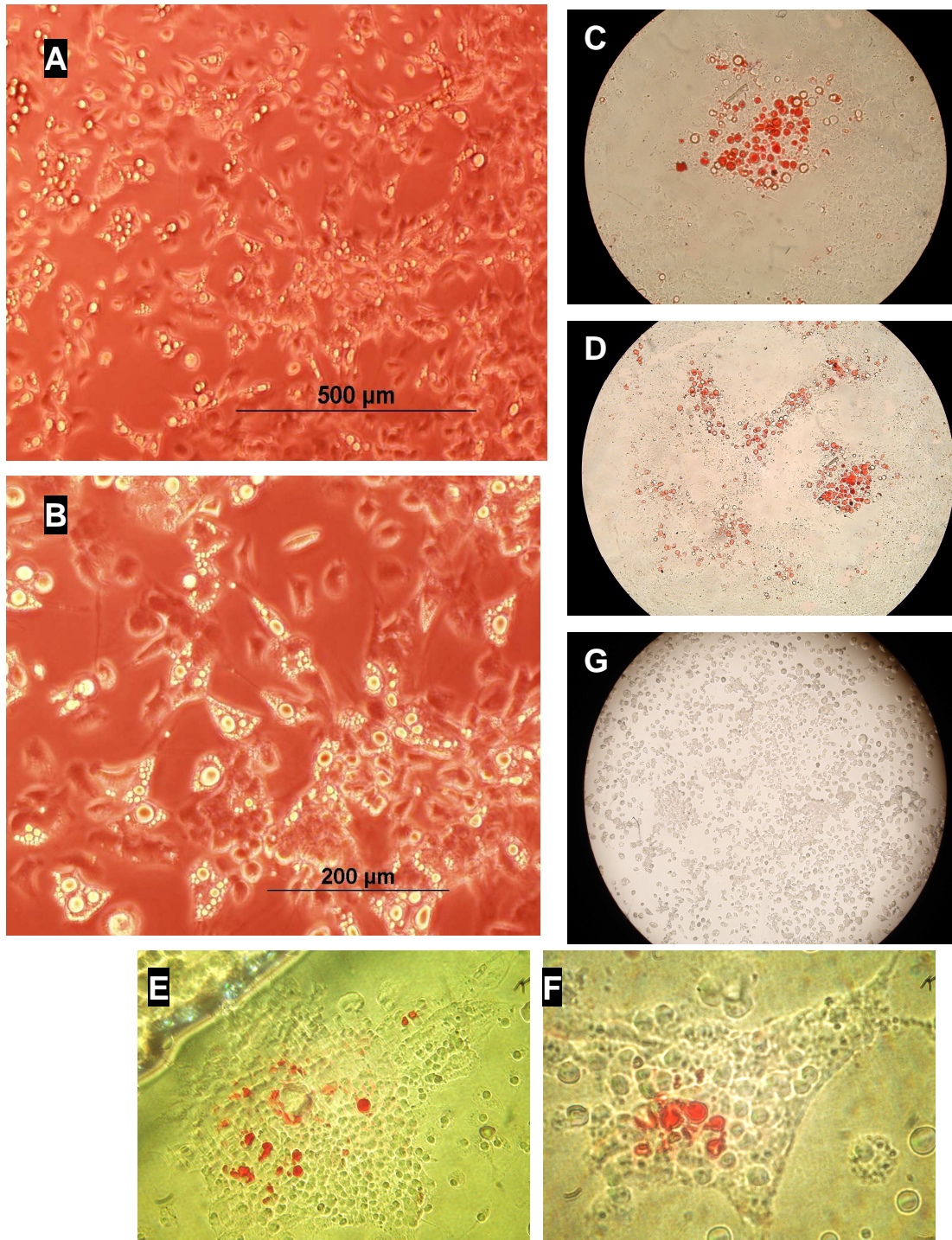


**Figura 8.** Alterações citomorfológicas de células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe (MI) incubadas durante 14 dias. (A) Controle; (B) MI 5 $\mu$ M; (C) MI 10 $\mu$ M; (D) MI 15 $\mu$ M; (E) MI 20 $\mu$ M. As células viáveis apresentaram coloração verde fluorescente (laranja de acridina) e as células apoptóticas exibiram coloração laranja (brometo de etídio). A seta branca mostra células com corpos apoptóticos evidentes.

#### **4.5 Citoquímica para identificação de adipócitos**

Após 14 dias de cultivo das células do estroma da MO de camundongos, as culturas foram submetidas à coloração usando o corante Oil Red O. As células adiposas são vistas apresentando vacúolos lipídicos de coloração avermelhada de tamanhos variados no interior do citoplasma. Como pode ser visto na Figura 9, o MI demonstrou 100% de efeito inibitório sobre células adiposas em todas as concentrações testadas (2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M, 20 $\mu$ M e 25 $\mu$ M) de MI e somente o grupo controle continha células com conteúdo lipídico corado pelo Oil Red O, situação repetidamente observada em experimentos realizados nas mesmas condições.

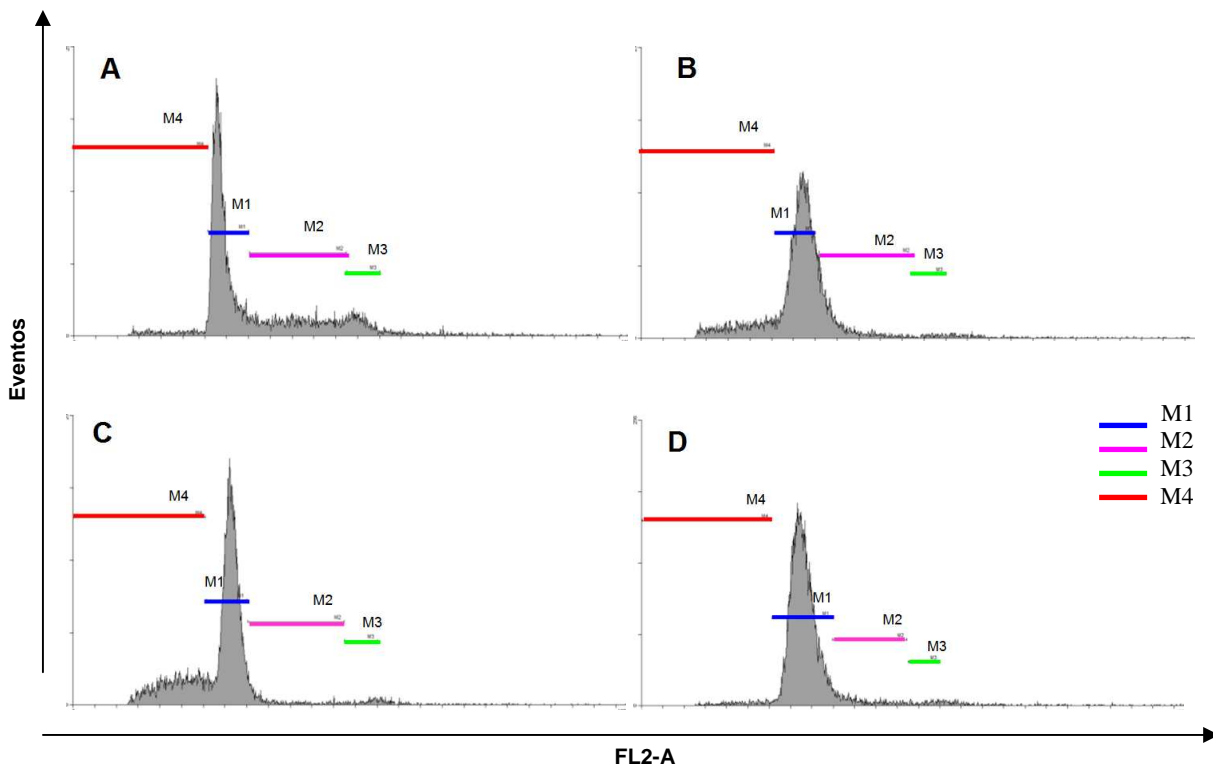




**Figura 9. Identificação de adipócitos pela coloração com Oil Red O.** Células do estroma da medula óssea de camundongos foram cultivadas na presença do MI por 14 dias. Na visualização da cultura em microscópio ótico, vacúolos lipídicos refringentes (A-B) são vistos no grupo controle, sem coloração. As células coradas com Oil Red O apresentam conteúdo lipídico avermelhado de tamanhos variados (C-D) aumento de 40x (E) aumento de 100x (F) aumento de 400x, encontradas somente no grupo controle. (G) Nenhuma célula corou com Oil Red O quando foram cultivadas com MI em concentrações de 2,5-25  $\mu$ M.

#### 4.6 Ciclo celular

Os efeitos do MI nas fases do ciclo celular de células obtidas do estroma da MO de camundongos foram avaliados através da coloração dos ácidos nucléicos pelo iodeto de propídeo (PI), após a digestão do RNA. As células foram tratadas por 14 dias com 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 15 $\mu$ M e 20 $\mu$ M, apresentando um bloqueio progressivo nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> do ciclo celular a partir de 5 $\mu$ M, e conseqüente diminuição do percentual de células nas fases S/G<sub>2</sub>/M. A Figura 10 é representada pelos histogramas das células conforme fluorescência detectada (FL2-Área) e número de eventos; e pelas respectivas médias em cada fase do ciclo.



	Média (%) de células detectadas		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (M <sub>1</sub> )	S (M <sub>2</sub> )	G <sub>2</sub> /M (M <sub>3</sub> )
<b>Controle</b>	66,3	25,1	8,6
<b>MI 5<math>\mu</math>M</b>	73,8	24,6	1,6
<b>MI 10<math>\mu</math>M</b>	90,1	7,8	2,1
<b>MI 15<math>\mu</math>M</b>	91,5	6,8	1,7
<b>MI 20<math>\mu</math>M</b>	#	#	#

# O número de células vivas que se encontravam em alguma das fases do ciclo celular foi insuficiente, não atingindo o mínimo detectável para leitura no citômetro de fluxo. A maioria das células já estava morta e descolada das garrafas de cultura.

**Figura 10. Efeito do Mesilato de Imatinibe sobre as fases do ciclo celular de células do estroma da medula óssea de camundongos.** As células do estroma da medula óssea de camundongos foram incubadas por 14 dias na ausência de MI (grupo controle; A) e na presença de MI 5 $\mu$ M (B), MI 10  $\mu$ M (C) e MI 15 $\mu$ M (D). O ciclo celular foi analisado pela

intensidade de coloração dos ácidos nucleicos pelo iodeto de propídeo, conforme descrito em materiais e métodos. M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> representam as fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M, sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, respectivamente, cujas médias das células em percentual (%) em cada fase do ciclo celular estão dispostas abaixo dos histogramas.

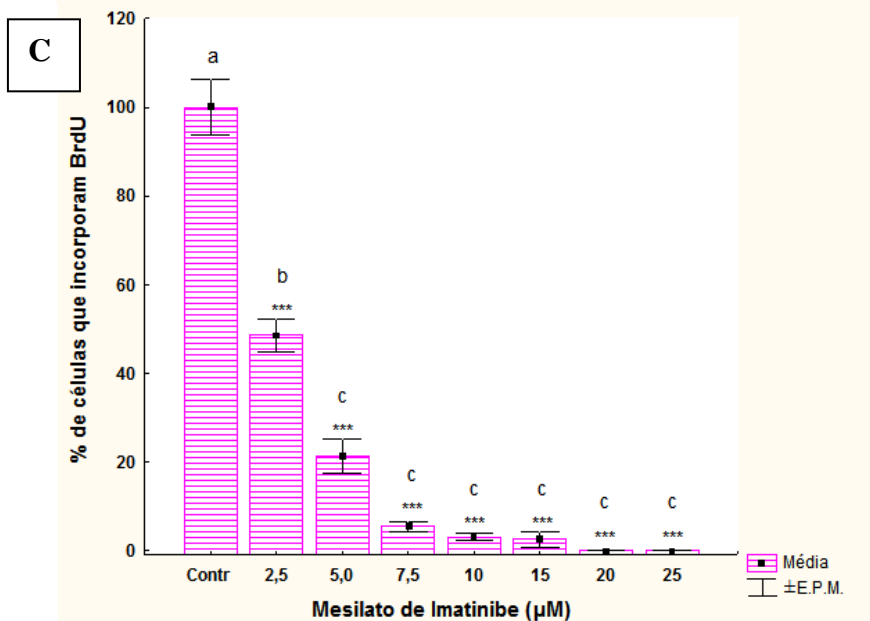
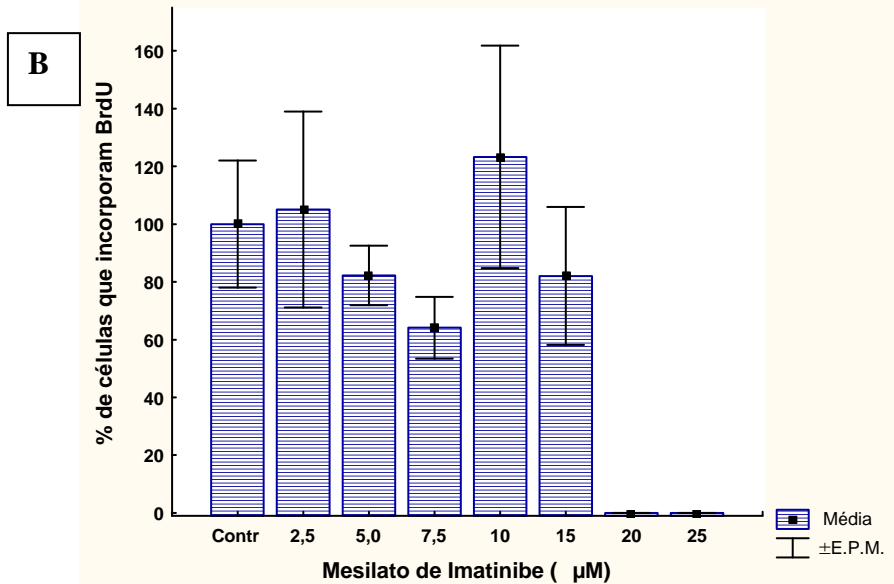
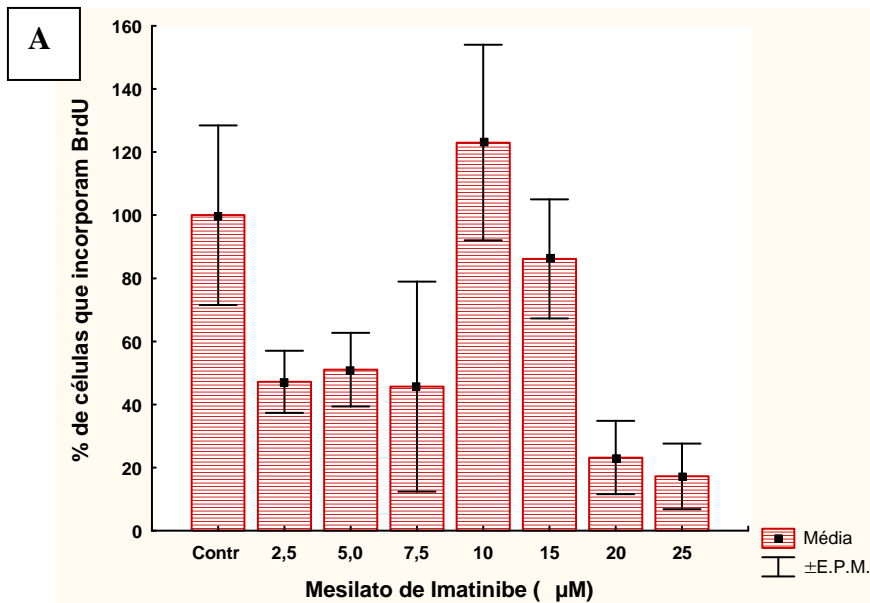
M<sub>4</sub> representa células que estão em apoptose ou debris de células, portanto, não estão no ciclo celular. Foram realizados dois experimentos independentes nas mesmas condições.

#### **4.7 Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU**

A proliferação das células do estroma da MO de camundongos cultivadas foi avaliada através do ensaio de incorporação do BrdU, que consiste da incorporação do BrdU ao DNA das células que estão proliferando (durante a fase S do ciclo celular) e o número total de células foi identificado por DAPI. Para avaliar em que dia ocorreu maior proliferação, o ensaio foi realizado nos dias 4, 8 e 14 de cultura.

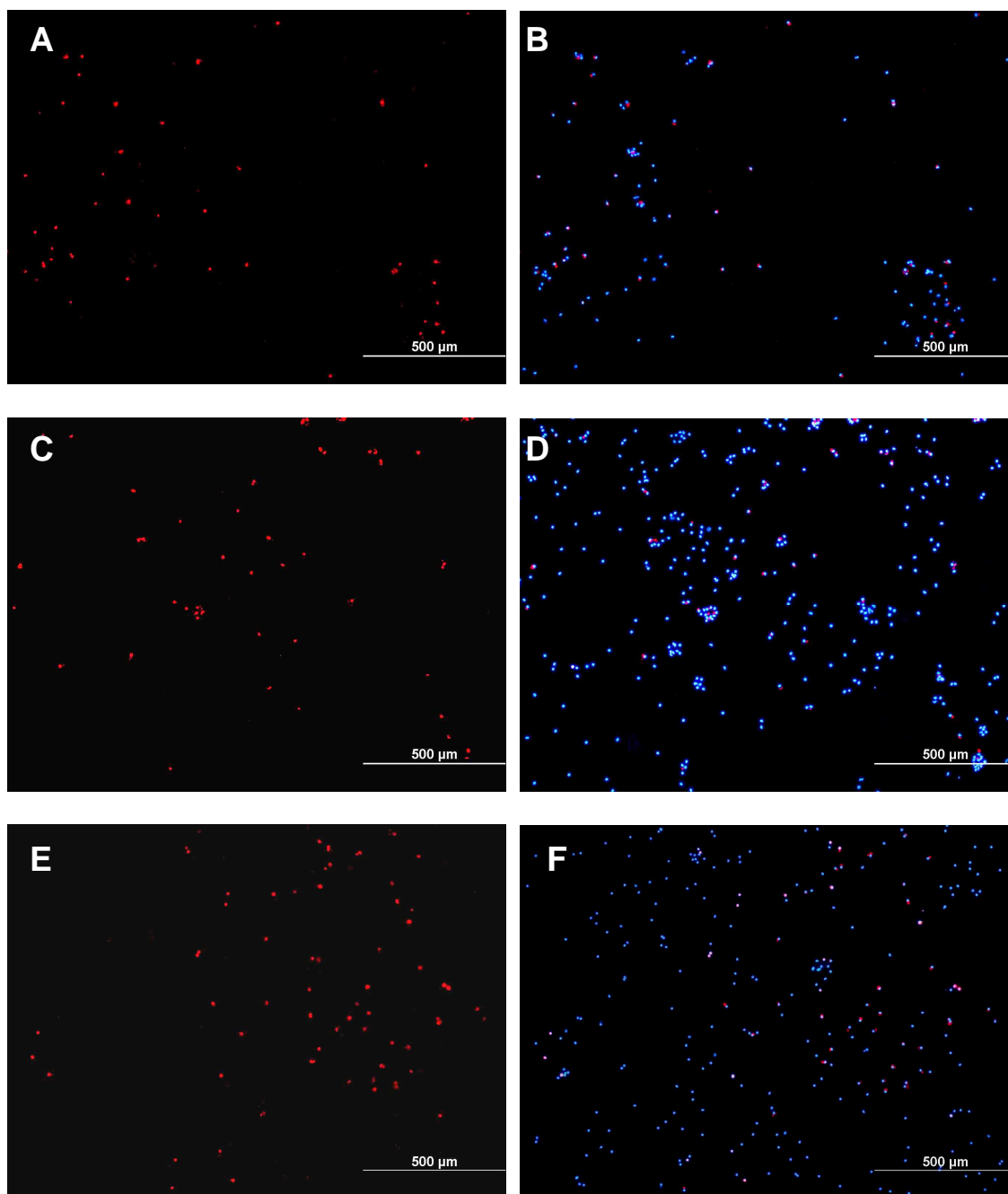
O percentual de proliferação foi obtido a partir do número médio de células quantificadas por campo fotografado (visto nas Figuras 12 e 13), representando o poço de cultura como um todo e comparadas com o grupo controle. Os resultados estão representados na Figura 11. No 4° dia (A) e 8° dia (B), não houve diferença estatística em relação ao grupo controle em nenhuma concentração de MI testada, porém, observou-se uma tendência para diminuição da proliferação nos grupos tratados, exceto em 10 µM, que houve uma tendência em aumentar a proliferação celular. No 14° dia (C), a proliferação celular foi diminuída significativamente em todas as concentrações testadas, principalmente a partir de 5 µM.

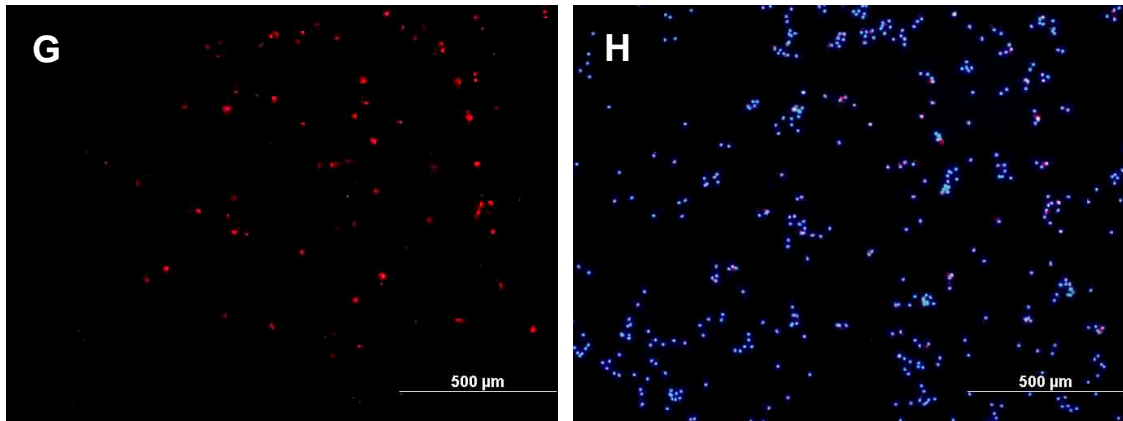




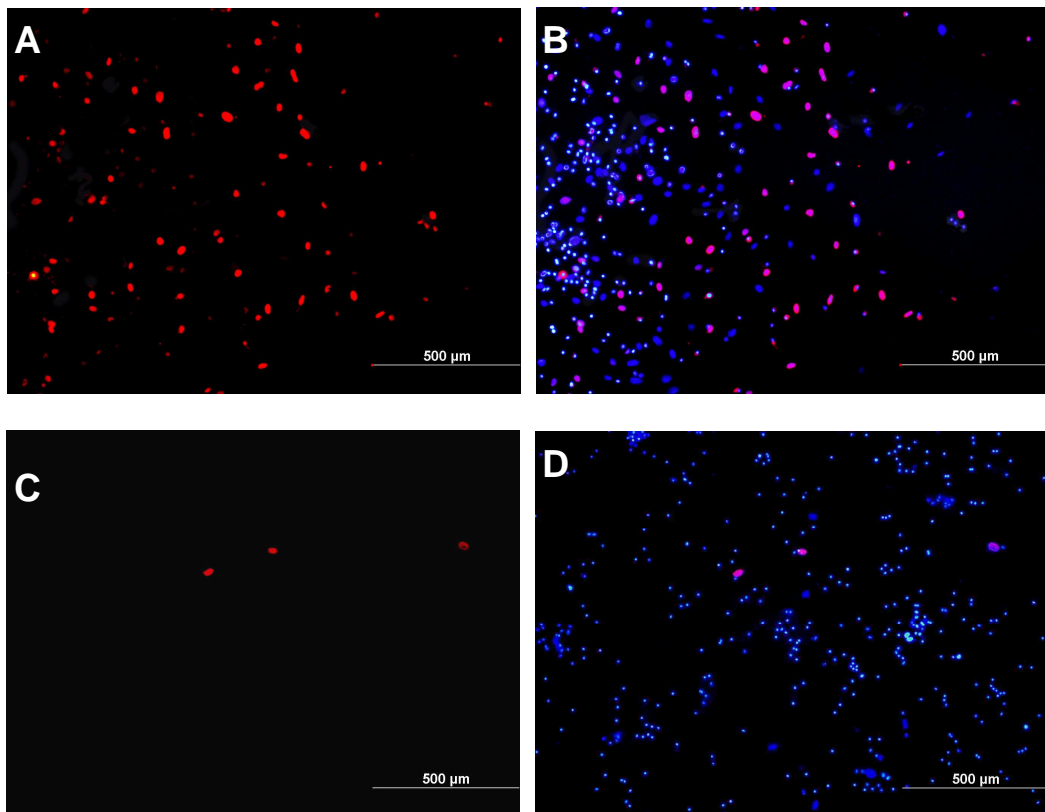
**Figura 11. Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU em células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe.** As células foram cultivadas durante 4(A), 8(B) e 14(C) dias, quantificadas quanto a incorporação de BrdU no núcleo e comparadas com o grupo controle (100%). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

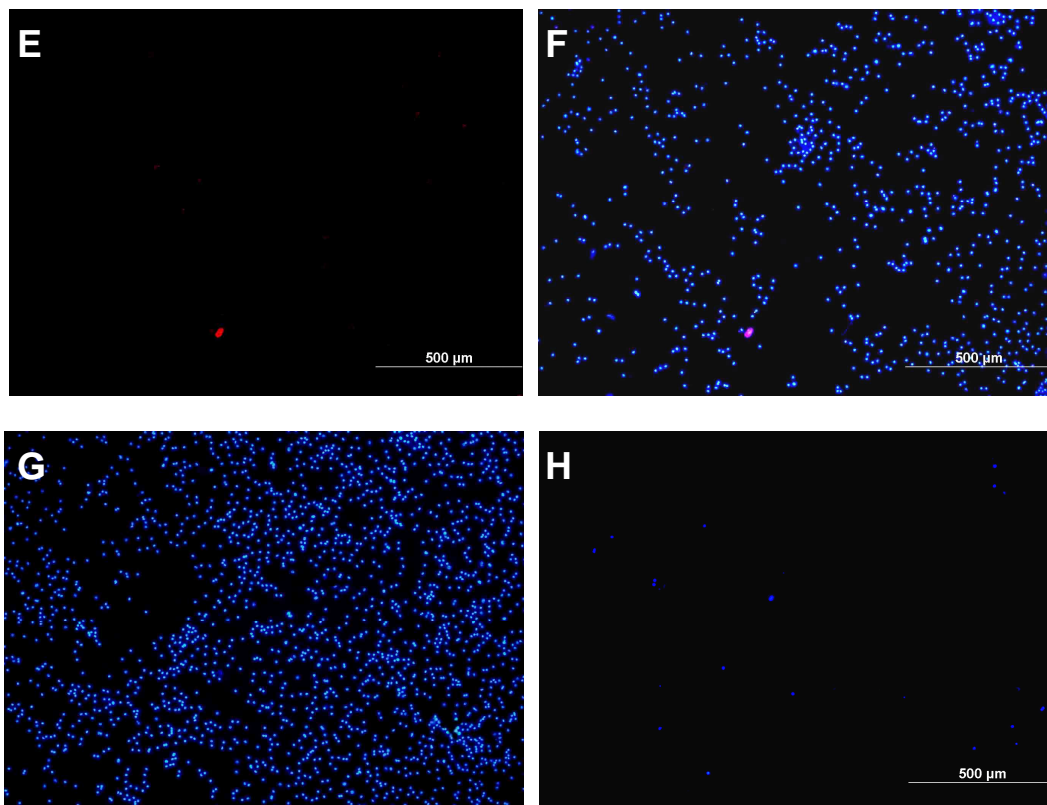
A Figura 11 foi obtida após quantificação das células como acima comentado. As fotos estão representadas na Figura 12 e 13.





**Figura 12. Análise da incorporação do BrdU em células cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe (MI) por 4 e 8 dias.** Fotografias representativas da imunofluorescência do BrdU. Em vermelho, núcleos de células que incorporaram BrdU, e em azul, núcleos corados com DAPI. Grupo controle (A-B) e tratado com MI 10 μM (C-D) no 4º dia; Grupo controle (E-F) e tratado com MI 10 μM (G-H) no 8º dia de cultivo.

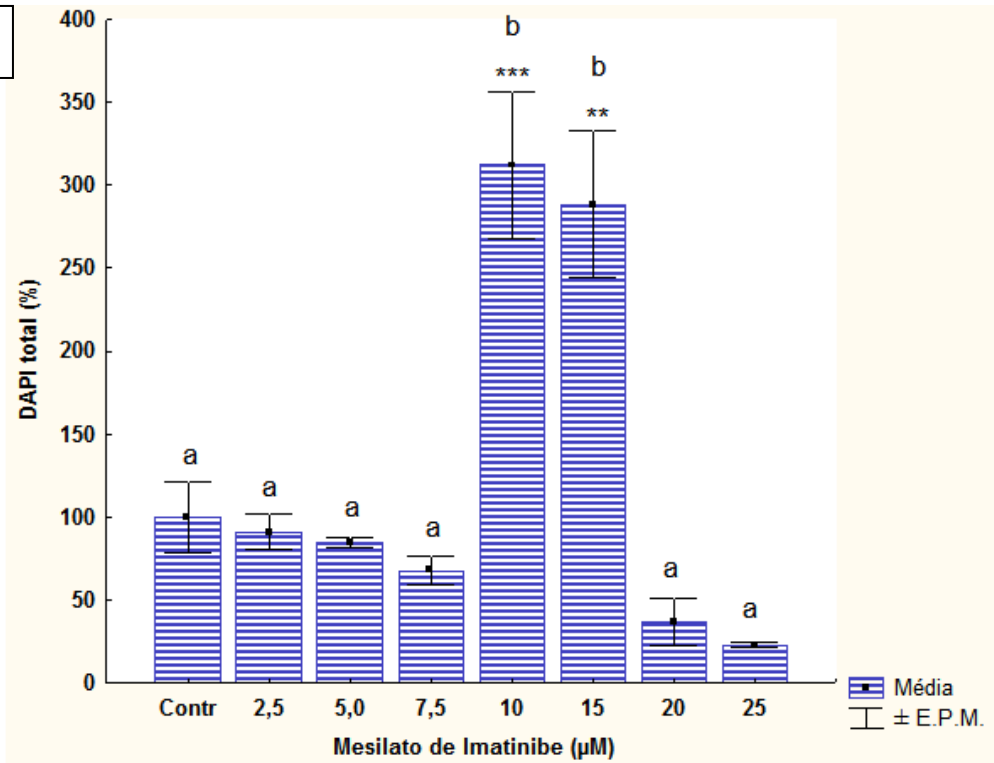
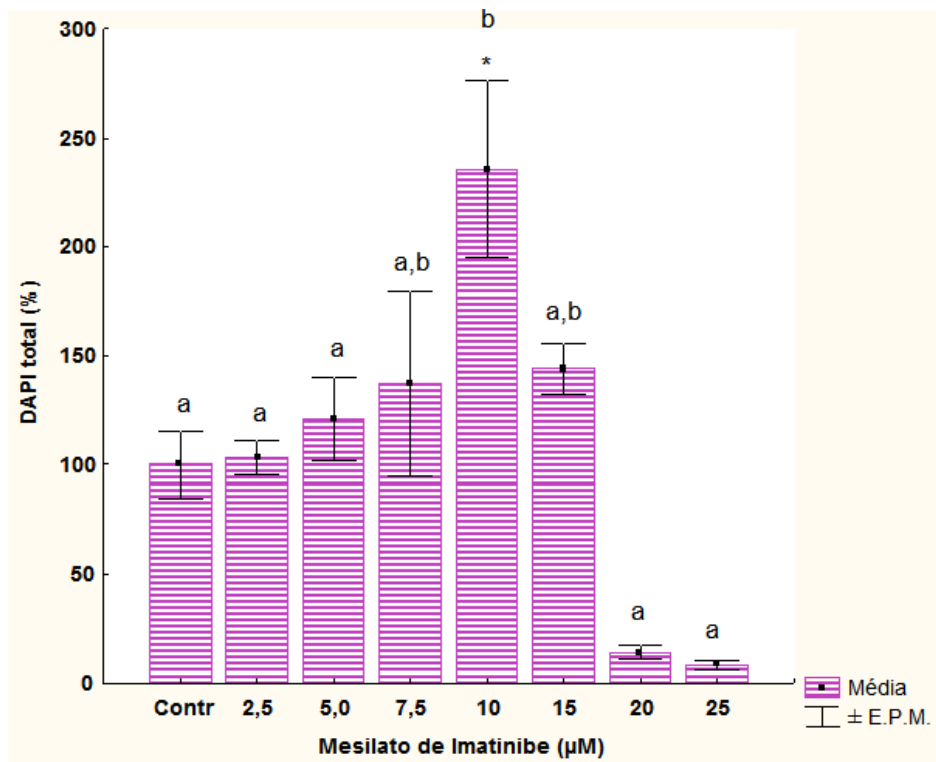


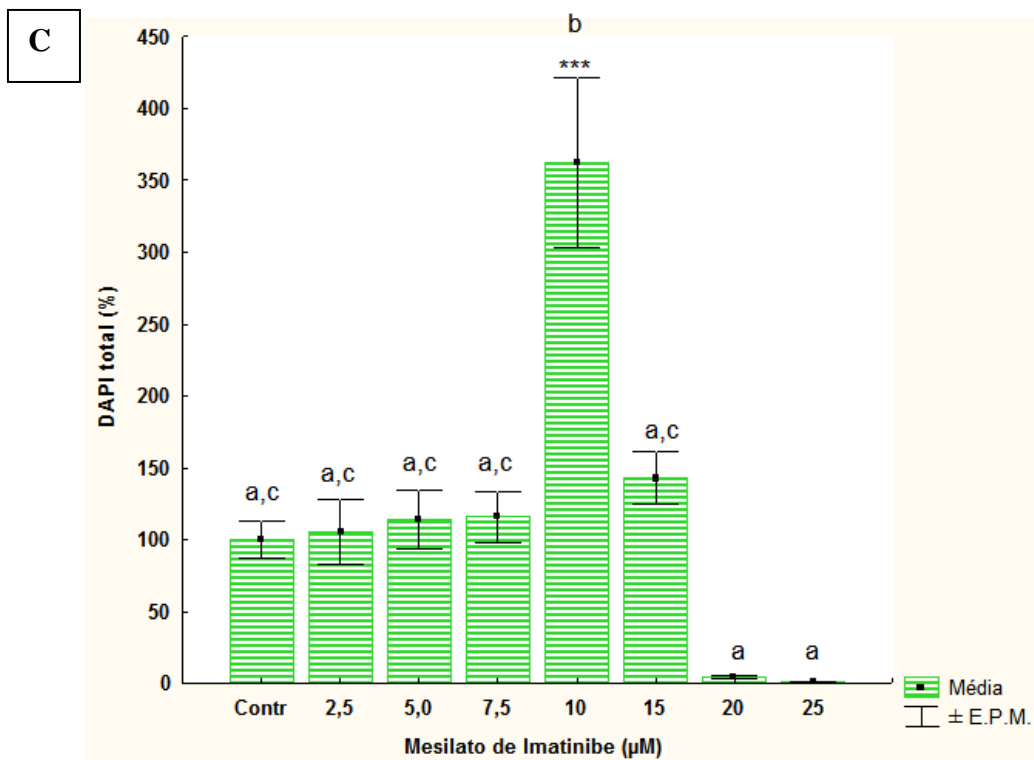


**Figura 13. Análise da incorporação do BrdU em células cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe (MI) por 14 dias.** Fotografias representativas da imunofluorescência do BrdU. Em vermelho, núcleos de células que incorporaram BrdU, e em azul, núcleos corados com DAPI. Grupo controle (A-B), tratados com MI 5µM (C-D); 15µM (E-F). Nas células tratadas com 10µM (G) e 20µM (H) nenhuma incorporou BrdU.

#### **4.8 Quantificação de núcleos corados com DAPI**

Os núcleos corados por DAPI foram contados a partir das imagens mostradas nas Figuras 12 e 13 e refletem o número total de células presentes na cultura. A quantificação das células está representada na Figura 14.

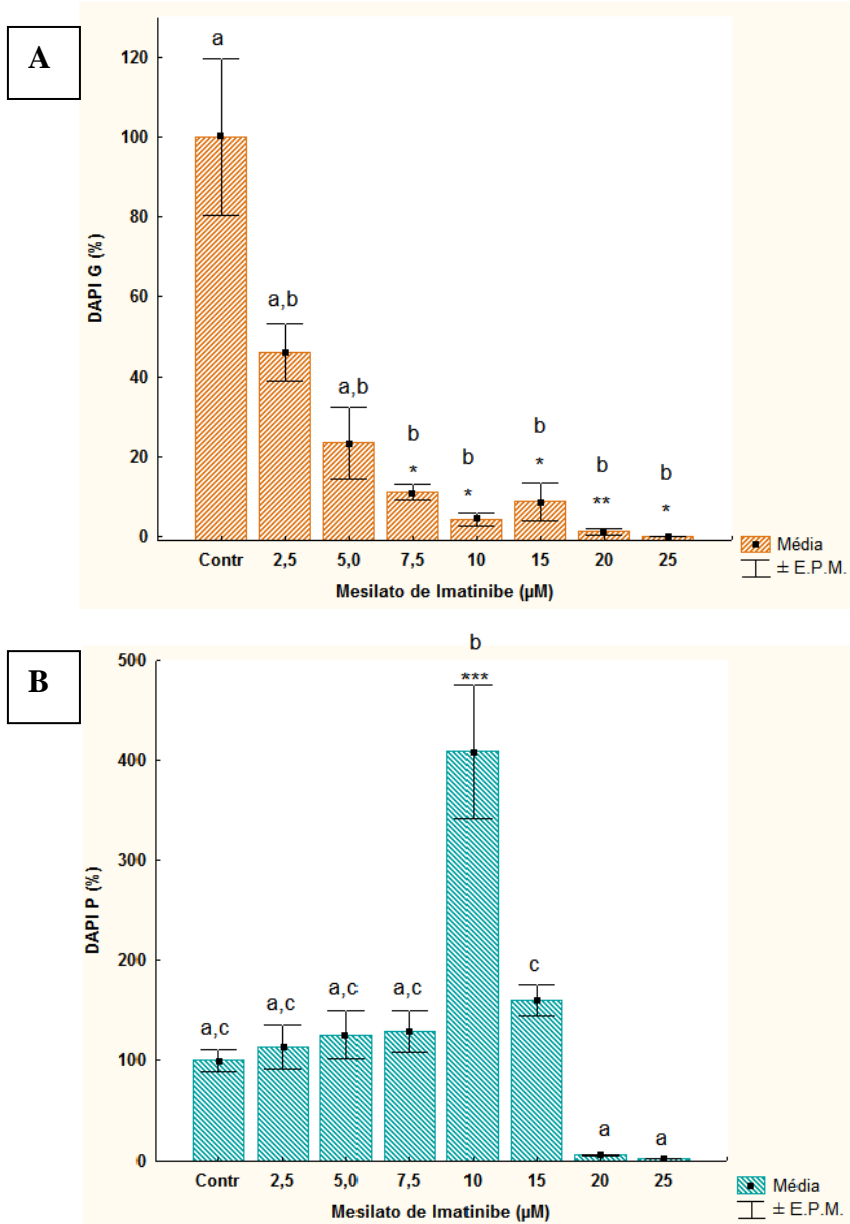
**A****B**



**Figura 14. Quantificação dos núcleos de células do estroma da medula óssea de camundongos cultivadas na presença de Mesilato de Imatinibe (MI) corados com DAPI.** As células foram cultivadas durante 4 (A), 8 (B) e 14 (C) dias na presença de concentrações 2,5 – 25µM de MI e comparadas com o grupo controle (100%). \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p>0,05).

Como visto acima, o número de células na presença de 10 µM e 15 µM no 4º dia, assim como com 10µM de MI no 8º e 14º dias de cultura, estava bastante aumentado em relação ao grupo controle.

Como se pode ver na Figura 13, representativa do 14º dia de cultura, os núcleos corados por DAPI variaram muito em número, e também em tamanho, o que não foi visto no 4º e 8º dias, provavelmente, pelo menor tempo de cultivo. No grupo controle e em baixas concentrações de MI, os núcleos eram grandes e a maioria correspondia às células que incorporaram BrdU. Em concentrações mais elevadas de MI, os núcleos eram menores, porém em maior quantidade. Esses núcleos corados com DAPI foram quantificados (visto na Figura 14) e classificados em 2 categorias: DAPI P (núcleos pequenos) e DAPI G (núcleos grandes, em média de 4 a 10 vezes maiores que DAPI P) e estão representados na Figura 15.

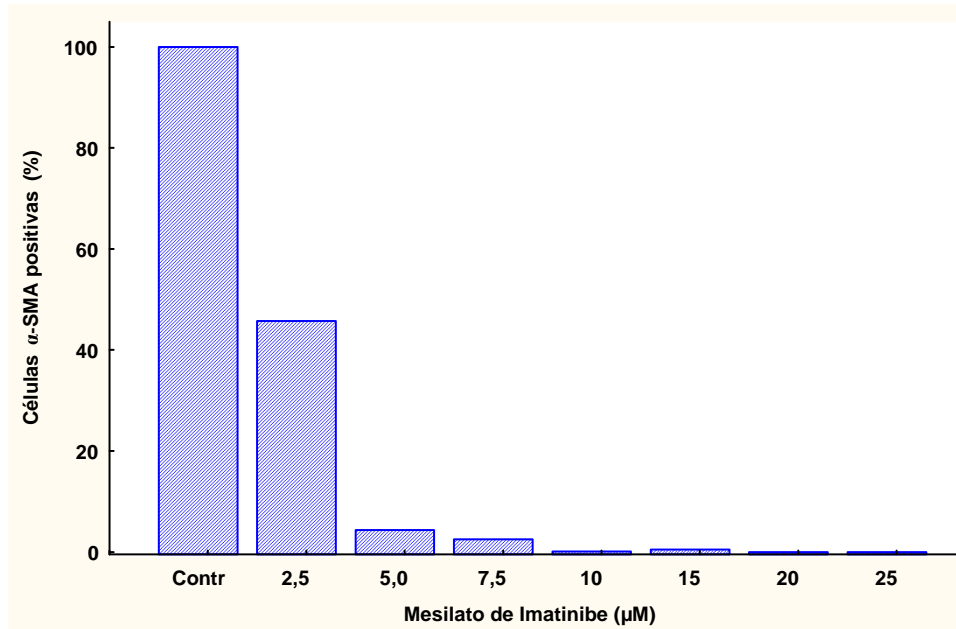


**Figura 15. Quantificação de núcleos de células cultivadas por 14 dias com Mesilato de Imatinibe corados com DAPI classificados conforme o tamanho.** (A) Núcleos de tamanho Grande e (B) Núcleos de tamanho Pequeno em relação ao grupo controle (100%). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

#### 4.9 Avaliação da expressão de $\alpha$ -SMA

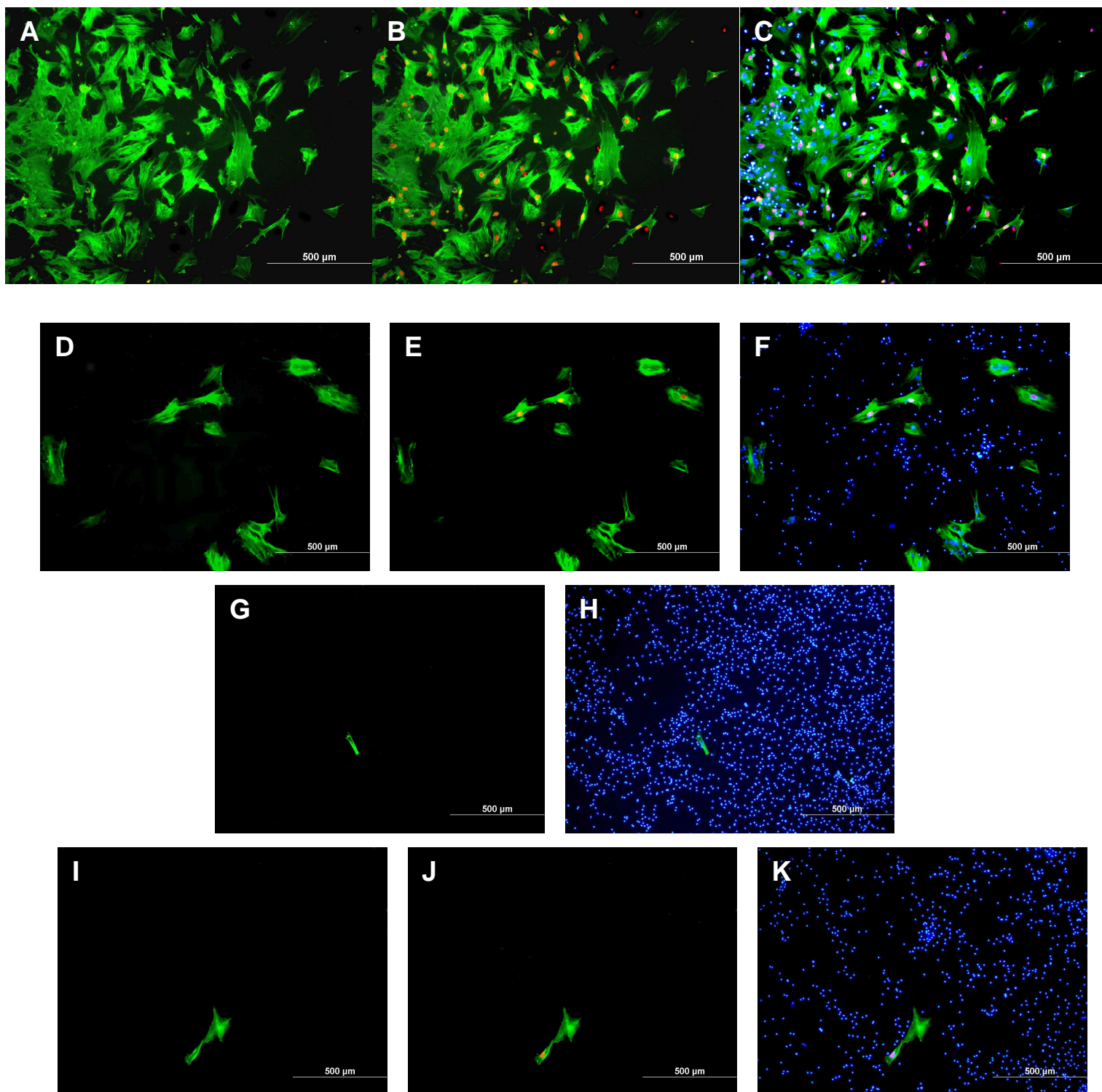
A expressão de  $\alpha$ -SMA foi avaliada em células cultivadas durante 14 dias submetidas à reação de imunocitoquímica. Conforme as imagens representadas na Figura 17, a quantificação de células  $\alpha$ -SMA foi obtida através da contagem de todas as células  $\alpha$ -SMA positivas tratadas com MI presentes em cada poço da placa de cultivo e comparada com o grupo controle (considerado 100%). Como foram consideradas todas as células positivas do poço e não de apenas alguns campos, não foi feita a média de valores de cada concentração de MI, portanto, não é possível fazer análise estatística.

Os valores obtidos para culturas tratadas com MI 2,5  $\mu\text{M}$  (45,74%); 5,0  $\mu\text{M}$  (4,35%); 7,5  $\mu\text{M}$  (2,51%); 10  $\mu\text{M}$  (0,09%); 15  $\mu\text{M}$  (0,48%); 20  $\mu\text{M}$  (0%) e 25  $\mu\text{M}$  (0%) são relativos ao grupo controle (100%) e estão representados na Figura 16.



**Figura 16. Quantificação de células  $\alpha$ -SMA positivas.** Células do estroma da medula óssea de camundongos foram cultivadas por 14 dias e submetidas à reação imunocitoquímica para verificação da expressão de  $\alpha$ -SMA. Os resultados estão expressos em percentual (%) em relação ao grupo controle (100%).





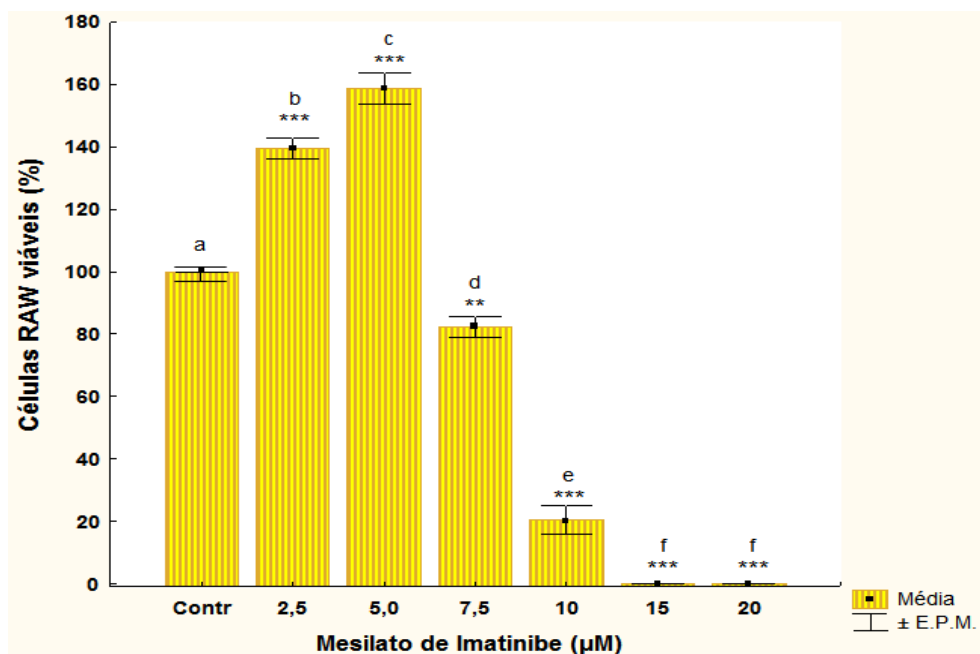
**Figura 17. Imagens representativas da imunofluorescência para  $\alpha$ -SMA.** Em verde, células  $\alpha$ -SMA positivas; em vermelho, núcleo de células BrdU positivas e em azul, marcação de núcleo com DAPI. (A,B,C) representam o grupo controle; (D,E,F) células tratadas com 5  $\mu$ M; (G,H) 10  $\mu$ M e (I,J,K) 15  $\mu$ M de Mesilato de Imatinibe.

A Figura acima mostra que ocorreu uma grande diminuição na quantidade de células que expressaram  $\alpha$ -SMA nos grupos tratados. A maioria das células  $\alpha$ -SMA positivas corresponderam às células BrdU positivas e células com núcleo grande visto pelo DAPI.

#### 4.10 Cultivo da RAW 264.7

A partir dos resultados obtidos com as células do estroma da MO de camundongos, foi levantada a hipótese de que as células tratadas com MI que apareceram arredondadas e em maior número que o grupo controle seriam macrófagos. Os macrófagos são células que também fazem parte do estroma medular, porém, podem sofrer efeitos diferentes dos causados pelo MI em fibroblastos, já que constituem células de origem diferente, além de possuírem receptores, funções e outras características também muito diferentes. Assim, foi realizado o cultivo de uma linhagem de macrófagos murinos tratados com MI para verificar se o efeito era semelhante ao encontrado nas culturas de células do estroma.

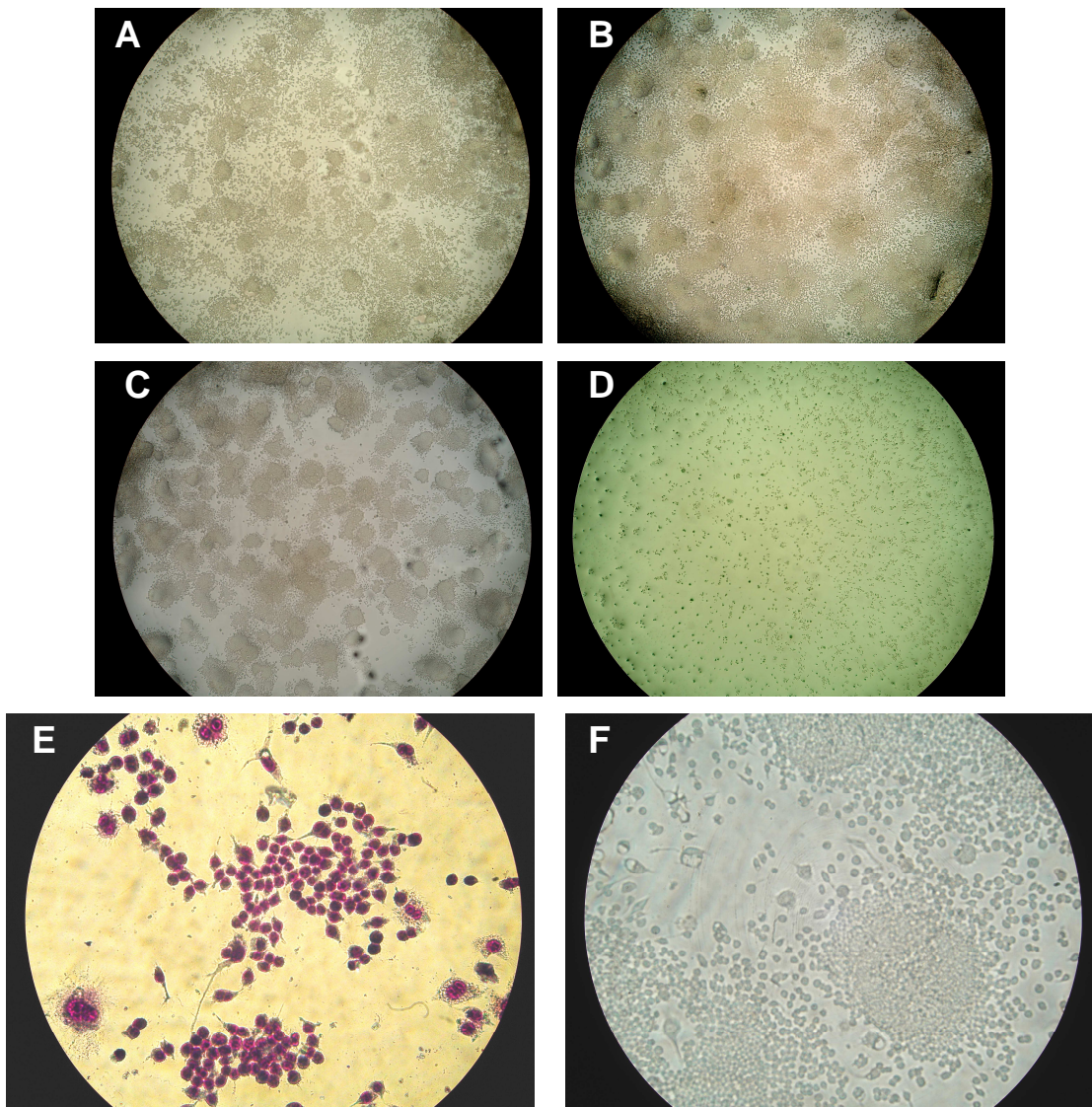
As células RAW 264.7 foram cultivadas na presença do MI por 72 horas até confluência aproximada de 70-80% do poço (semelhante à confluência atingida em 14 dias de cultivo das células do estroma da MO). As células viáveis foram quantificadas e avaliadas pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan em hemocítmetro e os resultados estão representados na Figura 18 em percentual de células viáveis em relação ao grupo controle (sem MI).



**Figura 18. Quantificação de células RAW 264.7 tratadas com Mesilato de Imatinibe.** As células foram cultivadas com 2,5 – 20 µM de MI por 72 horas, quantificadas e avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan em hemocítmetro. Cada ponto representa a média  $\pm$  1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle por

ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Letras iguais indicam que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

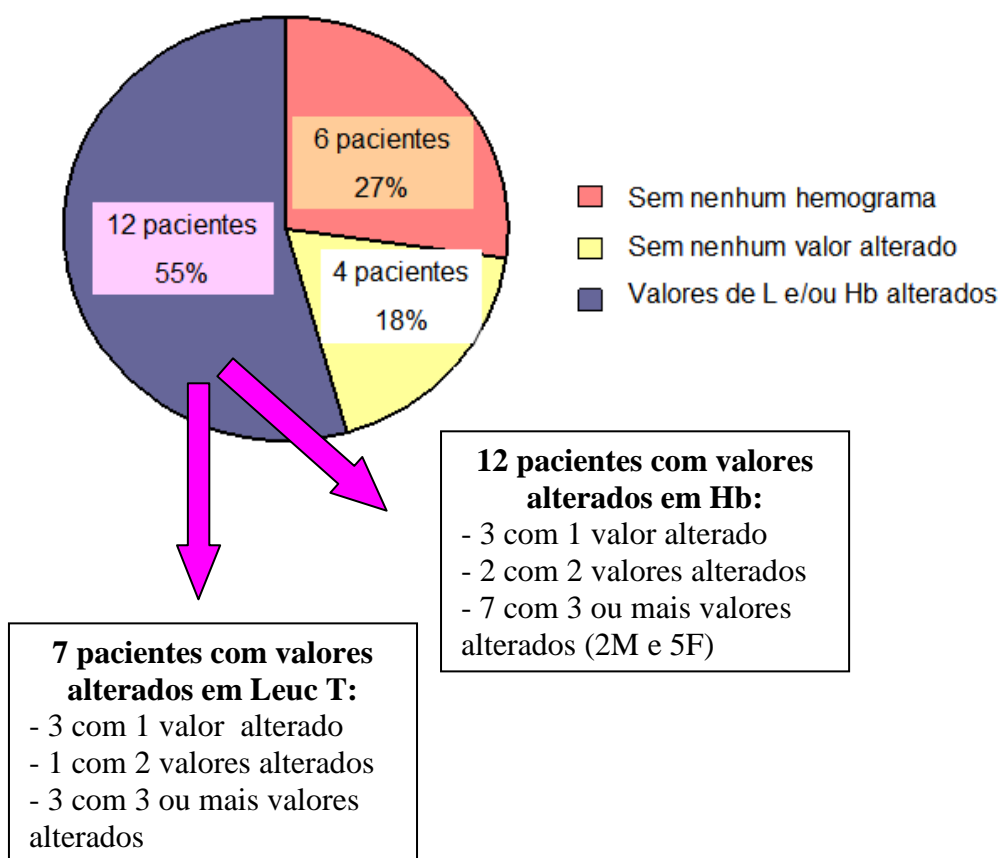
A quantificação de células RAW 264.7 viáveis tratadas com  $2,5\mu\text{M}$ ;  $5,0\mu\text{M}$ ;  $7,5\mu\text{M}$ ;  $10\mu\text{M}$ ;  $15\mu\text{M}$  e  $20\mu\text{M}$ , conforme apresentado na Figura 18, foram de  $139,56\% \pm 3,4\%$ ;  $158,88\% \pm 5,1\%$ ;  $70,65\% \pm 3,8\%$ ;  $20,45\% \pm 4,6\%$ ;  $0\%$  e  $0\%$  em relação o grupo controle ( $100\% \pm 1,1\%$ ), respectivamente. A morfologia das culturas está representada na Figura 19.



**Figura 19. Morfologia da cultura de células RAW 264.7 tratadas com Mesilato de Imatinibe.** As células foram visualizadas em microscópio ótico. (A) Controle; (B) MI  $5\mu\text{M}$ ; (C) MI  $7,5\mu\text{M}$  e (D) MI  $10\mu\text{M}$  em aumento de 40x. Células coradas pela técnica May-Grünwald e Giemsa (E) e sem coloração (F) em aumento de 400x.

#### 4.11 Análise de prontuários

A fim de verificar qual o perfil hematológico (leucócitos totais, neutrófilos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas) de pacientes com patologia não-hematológica que fizeram uso do MI, 22 prontuários médicos de pacientes portadores de GIST foram avaliados, destes, apenas 16 apresentavam hemogramas em um período de 24 meses. A distribuição dos pacientes conforme alterações encontradas nos hemogramas está representada na Figura 20.



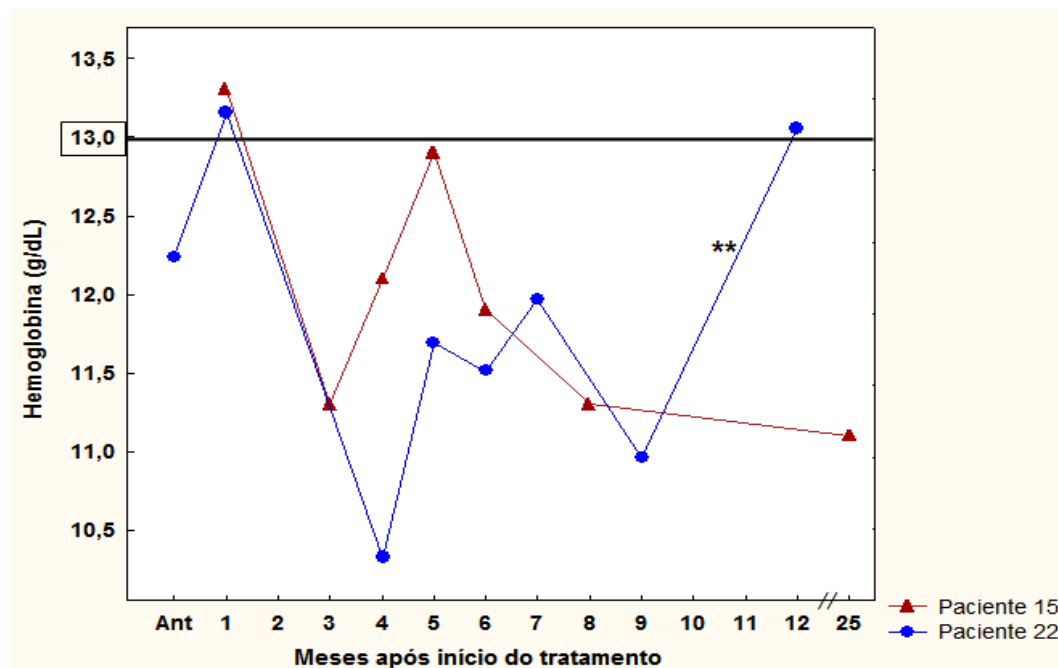
**Figura 20. Distribuição dos pacientes com Tumor Estromal Gastrointestinal (GIST) conforme alterações encontradas em hemogramas.** Hb – hemoglobina Leuc T – leucócitos totais M – paciente do sexo masculino F- paciente do sexo feminino

Os dados dos pacientes que apresentaram 3 ou mais valores alterados (fora dos valores de referência) de hemoglobina no período de 24 meses após início do tratamento estão demonstrados nas Figuras 21 (pacientes do sexo masculino) e 22 (pacientes do sexo feminino). Os dados dos pacientes que apresentaram 3 ou mais valores alterados de leucócitos totais e/ou neutrófilos estão representados na Figura 23. A linha preta indica o limite inferior do Valor de Referência citado por HENRY, 2008 (para leucócitos/neutrófilos) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 2001 (para hemoglobina).

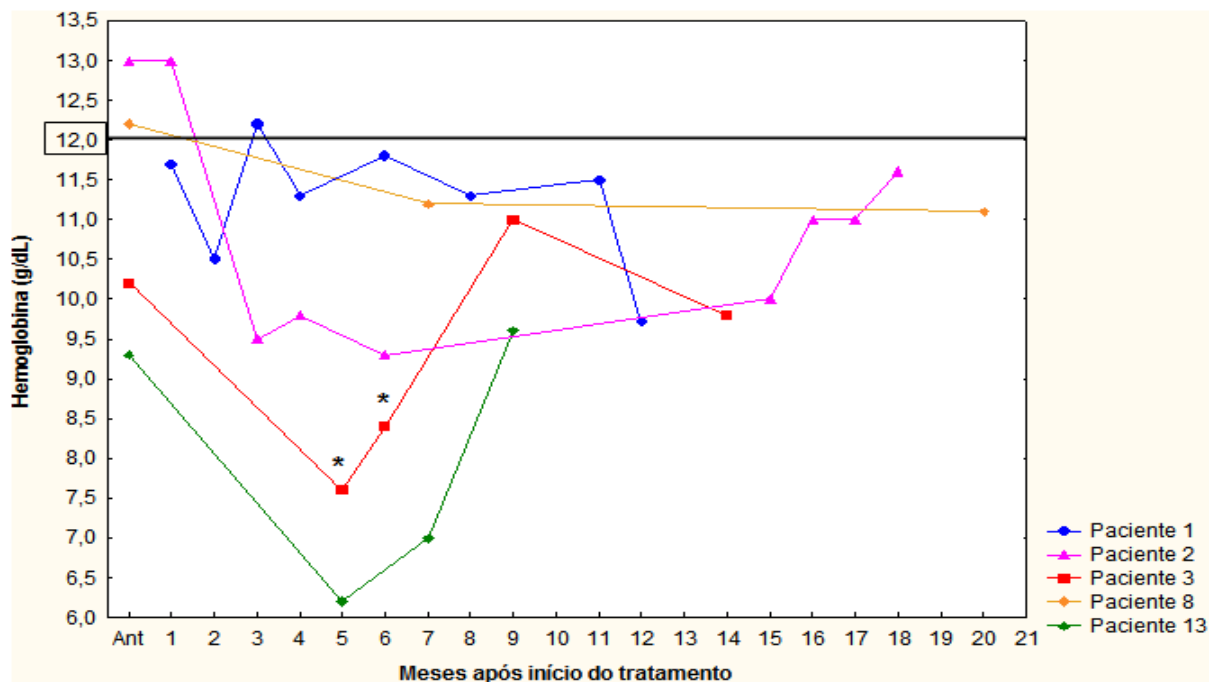


Do total de 22 pacientes, 14 eram do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idades que compreendiam de 38-79 anos em ambos os sexos, sem idade preferencial para ocorrência da patologia. Todos os 22 pacientes utilizaram MI de 400mg/dia.

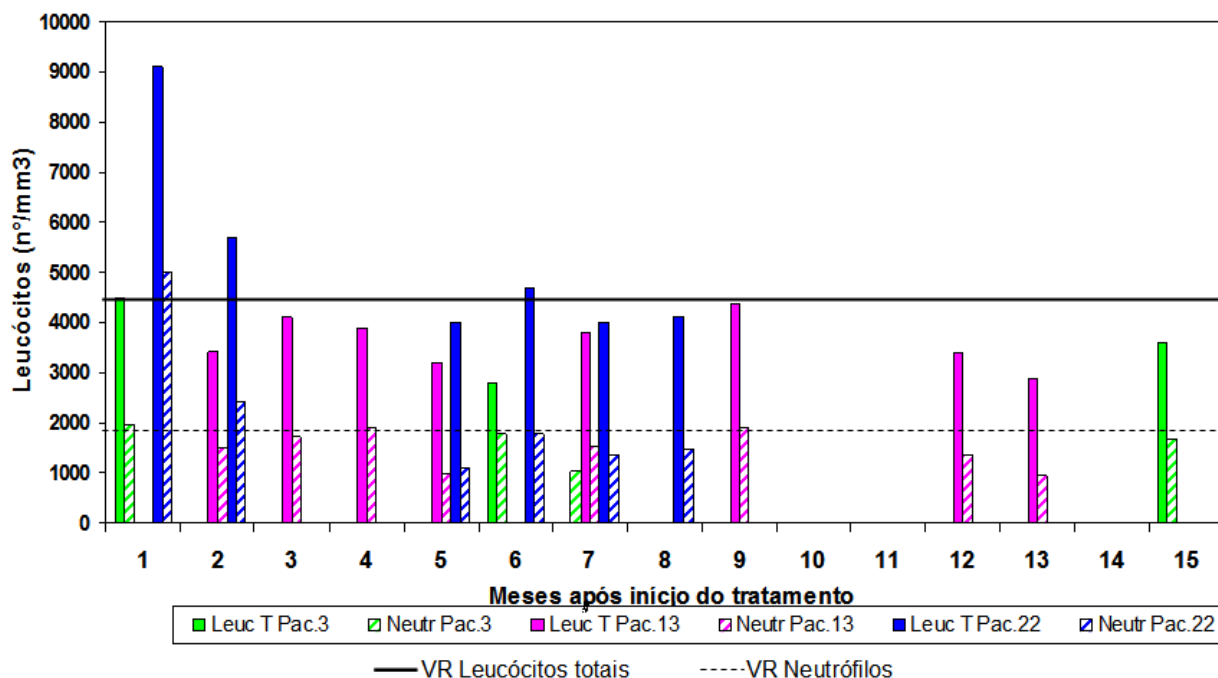
O valor de hematócrito foi proporcional ao valor de hemoglobina em todas as dosagens, portanto, quando ocorreu alteração no valor de hemoglobina, o valor de hematócrito também se alterou. Como o valor de hemoglobina é o índice avaliado pela OMS para definir anemia, optou-se por somente representar este parâmetro. Não houve alteração significativa no número de plaquetas em nenhum paciente.



**Figura 21. Valores de hemoglobina encontrados em pacientes com GIST do sexo masculino tratados com Mesilato de Imatinibe.** A figura apresenta valores de hemoglobina de 2 pacientes que apresentaram pelo menos 3 valores alterados em 24 meses em relação ao limite inferior do valor de referência representado pela linha preta. O valor de hemoglobina anterior ao começo do tratamento é representado por “Ant”. \*\* O paciente fez uso de sulfato ferroso do mês 9 ao 11.



**Figura 22. Valores de hemoglobina encontrados em pacientes com GIST do sexo feminino tratadas com Mesilato de Imatinibe.** A figura apresenta valores de hemoglobina de 5 pacientes que apresentaram pelo menos 3 valores alterados em 24 meses em relação ao limite inferior do valor de referência representado pela linha preta. O valor de hemoglobina anterior ao começo do tratamento é representado por “Ant”. \* A paciente realizou transfusão sanguínea no mês 5 e 6.



**Figura 23. Valores de leucócitos totais e neutrófilos encontrados em pacientes com GIST tratados com Mesilato de Imatinibe.** A figura apresenta valores de leucócitos totais (Leuc T) e neutrófilos (Neutr) de 3 pacientes (Pac) em relação ao limite inferior dos respectivos valores de referência (VR).

## 5. DISCUSSÃO

Os agentes antineoplásicos mais potentes atingem células que estão em processo de divisão celular, e conseqüentemente, os tecidos normais mais acometidos por estes medicamentos são os que têm maiores frações de crescimento, como a medula óssea (MO) (FONSECA et al., 2000). A rápida taxa de renovação celular e diferenciação tornam o sistema hematopoiético um alvo suscetível à toxicidade por xenobióticos. A maior parte das falhas no funcionamento da MO é caracterizada pela inadequada produção de células sanguíneas (PARENT-MASSIN, 2001).

A MO é formada por um estroma composto de muitos tipos celulares e uma matriz extracelular que juntos formam um microambiente ideal que favorece a modulação da quiescência, auto-renovação e comprometimento de CTM, bem como, proliferação, maturação e apoptose de células hematopoiéticas. Entretanto, não é possível correlacionar essas funções com tipos particulares de células do microambiente, que consiste principalmente de macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos formando o estroma medular (HUBIN et al., 2005). Uma vez que a mielotoxicidade pode resultar tanto do efeito direto da droga sobre os progenitores hematopoiéticos quanto do efeito sobre as células do estroma medular ou expressão de citocinas/receptores, a especificidade do antineoplásico é muito importante (PESSINA et al., 2003).

O Mesilato de Imatinibe (MI) foi desenhado e sintetizado após alguns compostos terem sido identificados e testados *in vitro*, mostrando baixa potência e pouca especificidade, inibindo serina/treonina e tirosinoquinases. Após redesenhar a estrutura e introduzir novos radicais, o MI foi finalmente sintetizado, apresentando, então, especificidade para inibição de proteínas tirosinoquinases (O'DWYER et al., 2004).

Os caminhos de sinalização via receptor tirosinoquinases têm um extenso espectro de funções, incluindo a ordem da proliferação e da diferenciação celular, a promoção da sobrevivência da célula e a modulação do metabolismo celular (LODISH et al., 2002).

Informações sobre os efeitos do MI em células da MO normal é escasso e a maioria é obtida de experimentos *in vitro*. O melhor conhecimento dos efeitos em células normais pode ser de grande relevância visto que inibidores de tirosinoquinases estão sendo usados como terapia de primeira linha em pacientes de LMC e GIST, e a maioria estará exposta por muito tempo a esse fármaco (SANCHEZ-GUIJO et al., 2009). A variação no tempo de exposição das células CD34+ ao MI mostrou um efeito maior deste com a exposição prolongada (HOLTZ et al., 2002).

Através de ensaio clonogênicos, células mononucleares da MO de camundongos foram cultivadas com MI e GM-CSF. O MI reduziu o crescimento de colônias CFU-GM de maneira concentração e tempo dependentes (Figura 1), e a  $IC_{50}$  obtida foi  $26,5\mu\text{M}$ . Além da alteração no número de CFU-GM, o efeito do MI também foi nítido na alteração da morfologia das colônias (Figura 3). As colônias predominantes em concentrações próximas a  $IC_{50}$  eram de morfologia difusa, compostas de menor número de células quando comparadas com o controle, que apresentava colônias difusas e compactas na mesma proporção e composta por inúmeras células. Em altas concentrações (acima de  $40\mu\text{M}$ ), a presença de *clusters* (colônia com menos de 50 células) era predominante, desaparecendo completamente em  $60\mu\text{M}$ .

Deininger e colaboradores (1997) reportaram que a hematopoiese normal é moderadamente reduzida quando avaliada através de ensaios clonogênicos após tratamento com MI. A redução na formação de colônias é vista em linhagens eritróides, porém, colônias CFU-GM parecem não ser afetadas em concentrações inferiores a  $10\mu\text{M}$ .

Bartolovic e colaboradores (2004) obtiveram, através do ensaio do MTT de 48 horas, a  $IC_{50}$  do MI ( $0,9 \pm 0,6\mu\text{M}$ ) em células CD34+ de cordão umbilical sob estímulo de citocinas e este não foi significativamente diferente da  $IC_{50}$  obtida em células BCR-ABL+ nestes experimentos, o que torna preocupante o seu efeito em células envolvidas no processo hematopoiético.

A observação de um efeito antiproliferativo de MI em células hematopoiéticas BCR-ABL negativas é sustentada clinicamente por observações em pacientes com desordens mieloproliferativas Ph- que tiveram sucesso no tratamento com MI. Dados sugerem que o MI age primeiramente nos ciclos celulares mais ativos em compartimentos compostos por células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Consistente com esses achados, pesquisadores reportaram uma diminuição concentração-dependente na formação de CFUs a partir de células CD34+ da MO com o tratamento das culturas com MI, enquanto que nenhum efeito supressor significativo na atividade da célula-tronco *in vitro* foi observado quanto à capacidade de formação de células (área cobblestone – formadora de células) (HOLTZ et al., 2002).

Em 2002, Holtz e colaboradores testaram o efeito do MI em células progenitoras primitivas por *Long-term culture-initiating cells* (LTCIC) e células progenitoras comprometidas pelo ensaio de CFCs (células formadoras de colônias) estimuladas com diversas citocinas (GM-CSF, G-CSF, SCF, LIF, MIP-1, IL-6) de pacientes com LMC e doadores saudáveis. A exposição de células progenitoras primitivas de pacientes com LMC



durante 96 horas a 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M de MI suprimiu o crescimento em 43 $\pm$ 12% e 65 $\pm$ 12%, respectivamente. Em células de doadores saudáveis nas mesmas condições houve uma pequena supressão, 7 $\pm$ 13% e 32 $\pm$ 36%, respectivamente. A exposição de células progenitoras comprometidas de pacientes com LMC durante 96 horas a 1 $\mu$ M suprimiu o crescimento em 52 $\pm$ 5%, enquanto que em células normais ocorreu uma supressão de 13 $\pm$ 7%. A exposição a 5 $\mu$ M de MI suprimiu 78 $\pm$ 6% nas células leucêmicas e 37 $\pm$ 13% em células normais, sugerindo que mecanismos não BCR-ABL-dependentes podem contribuir para o aumento da supressão do crescimento de CFC em altas concentrações de MI.

Os resultados dos ensaios clonogênicos deste trabalho foram semelhantes ao encontrados por Holtz nos ensaios de CFCs, que mostrou que o fármaco age de forma concentração-dependente. Os valores encontrados para supressão do crescimento foram diferentes, provavelmente por eles terem utilizado progenitores mais primitivos e superestimulados com citocinas, inclusive com SCF, obtendo uma maior supressão em concentrações inferiores de MI que as testadas neste trabalho.

O MI é um potente inibidor da atividade quinase dos receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ - PDGF e do receptor do SCF. Em ensaios com células, MI inibe seletivamente SCF através de sinalização celular, incluindo autofosforilação dos receptores, formação de inositol fosfato e ativação e proliferação de MAPK. MI apresenta efeito antiproliferativo em precursores sanguíneos normais em resposta a IL-3 e eritropoietina (EPO) ou EPO e G-CSF/GM-CSF visto em ensaio de formação de colônias. Embora SCF não promova por si só a formação de colônias *in vitro*, em sinergia com outros fatores de crescimento estimula a formação de células progenitoras diferenciadas e células progenitoras mais primitivas de multilinhagens (BUCHDUNGER et al., 2000). O MI parece também regular negativamente os receptores de eritropoietina (EPO-R), o que poderia explicar a anemia induzida pelo fármaco (SANCHEZ-GUIJO et al., 2009).

Na MO, CTMs são importantes componentes do nicho de CTH. Embora as CTH sejam as mais bem caracterizadas células-tronco adultas, seu nicho é escassamente entendido. Recentes estudos mostraram a existência de dois tipos de nichos de CTH na MO, um nicho endosteal e um nicho perivascular. Células derivadas de CTMs, como os osteoblastos e fibroblastos, estão principalmente envolvidas com o nicho endosteal, localizado no endósteo da trabécula óssea. Junto com as células especializadas que interagem com as CTH, as CTMs estão diretamente envolvidas com a regulação do processo hematopoiético (MEIRELLES et al., 2008). A atividade imunomodulatória das células do estroma da MO, sustentada por inúmeros estudos, pode ser em parte devida a influência pleiotrópica destas células sobre células da linhagem hematopoiéticas (BIANCO et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado que MI pode afetar severamente as células do estroma medular *in vitro*. Esse efeito parece ser parcialmente independente da sinalização via PDGF-R e c-Kit, e parece estar relacionado com o estado proliferativo das células (MELZER et al., 2004). Esses dados podem ser relevantes e até limitantes para a administração do MI em situações com grande aumento do “turnover” das células do estroma medular, devido à regeneração após intensa quimioterapia/radioterapia (APPEL et al., 2006).

Demonstramos recentemente que há correlação entre a fibrose e vascularização da MO na obtenção da resposta citogenética em pacientes de LMC (JESUS; VITURI, 2008). O MI atua na diminuição da produção de fibras reticulares produzidas pelas células estromais, sugerindo uma atuação principal em fibroblastos. Assim, no presente trabalho, avaliamos os efeitos do MI *in vitro* sobre células da MO de camundongos.

No 4º e 8º dias de cultura, o percentual de proliferação avaliado pela incorporação de BrdU de células do estroma da MO de camundongos (Figura 11) mantidas em cultura com MI não apresentou diferença significativa. Todas as células proliferaram na mesma proporção, sendo que em 10 µM houve uma tendência em aumentar a proliferação. No 14º dia, a proliferação diminuiu gradativamente, e em 7,5 µM a proliferação foi reduzida a aproximadamente 5%. Os resultados corroboram com a literatura, pois a exposição temporal ao MI é importante para a inibição da proliferação. A escolha dos tempos testados (4, 8 e 14 dias) baseou-se no fato que em tempo inferior a 4 dias de cultivo existem poucas células para serem avaliadas, então se estabeleceu um intervalo de 4 dias e de 6 dias na última avaliação, já que, por experiência, não se detecta diferenças entre culturas de 12 e 14 dias (tempo limite de cultivo).

Vittal e colaboradores (2007) estudaram os efeitos do MI na proliferação por incorporação de BrdU de fibroblastos de pulmão fetal humano tratados com MI (1, 5, 10 e 20µM). O MI induziu uma inibição concentração-dependente da proliferação celular com inibição quase completa em 20 µM, demonstrando que o MI é um efetivo e potente inibidor de proliferação fibroblástica.

A fim de avaliar os efeitos sobre a viabilidade de células do estroma realizou-se o método do MTT em 7 e 14 dias de cultivo (Figura 5). Os resultados demonstraram os efeitos concentração e tempo dependentes do MI, que atuou de forma semelhante nos dois dias avaliados, mas com efeitos mais pronunciados no 14º dia em altas concentrações (Figura 6). O percentual de células viáveis no 7º dia aumentou em 5 µM (117%) e 10 µM (157,0%), reduziu em 15 µM (125,4%) e 20 µM (85,3%) e atingiu 0% em 25 µM de MI. No 14º dia, o percentual de células viáveis para 5, 10, 15, 20 e 25 µM de MI foi, respectivamente, 117,96%;

173,1%; 89,6%; 42,66% e 0%. Estes dados foram consistentes com o observado por microscopia ótica e se observou que a morfologia predominante das células aderentes foi alterada. Em células não tratadas e células tratadas com baixa concentração de MI (2,5  $\mu\text{M}$ ) a morfologia foi tipicamente fibroblástica, com células alongadas. Com o aumento da concentração de MI, o número de células fibroblásticas foi reduzido e desapareceram com 10  $\mu\text{M}$ , enquanto que as células de formas arredondadas passaram a predominar e aumentaram em percentual, sendo reduzidas somente em altas concentrações (20-25  $\mu\text{M}$ ). Na análise da viabilidade celular através da microscopia de fluorescência com LA/BE, este efeito na morfologia também foi observado no 7º e 14º dia de cultivo (Figuras 7 e 8). Com a avaliação conjunta dos resultados de MTT e LA/BE, sugere-se que a viabilidade celular aumentou devido o aumento no número de células (arredondadas), indicando um efeito proliferativo do MI neste tipo de célula, que ocorreu principalmente em 10  $\mu\text{M}$ , e não de células fibroblásticas. Conforme os resultados observados pelo BrdU, a proliferação deve ter ocorrido anteriormente ao 8º dia, mas não foi possível identificar o momento exato, visto que no 4º e no 8º dia a proliferação foi constante (embora houvesse tendência em aumentar justamente em 10  $\mu\text{M}$ ) e no 7º dia o MTT já apresentava um aumento no número de células viáveis.

A fluorescência com LA/BE mostrou a presença de corpos apoptóticos após 7 e 14 dias de incubação das células estromais com o MI, principalmente em 20  $\mu\text{M}$ . As modificações das células que sofrem apoptose incluem um decréscimo no volume celular, modificação do citoesqueleto resultando em bolhas na membrana, condensação da cromatina e degradação do DNA em pequenos fragmentos, formando os corpos apoptóticos (GOLDSBY et al., 2002) que podem ser identificados com o uso do corante BE. Como não foi realizada contagem de células nesta metodologia, não podemos afirmar se existe diferença significativa entre o número de células apoptóticas entre os grupos testados nos dias 7 e 14, apenas observou-se o efeito do MI concentração-dependente no aparecimento de células em processo apoptótico.

A avaliação do ciclo celular das células do estroma da MO no 14º dia de cultivo com MI mostrou a ocorrência de bloqueio das células nas fases  $G_0/G_1$  (66,3% no controle para 91,5% em 15  $\mu\text{M}$ ) e consequente diminuição do percentual de células que estavam nas fases S e  $G_2/M$ . Pelos histogramas (Figura 10), pode-se verificar que o número de células marcadas em  $M_4$  (apoptóticas/debris) aumentou em 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , mas não em 15  $\mu\text{M}$ , o que parece controverso aos outros resultados. Isto pode ser explicado pelo fato que as células em apoptose progressivamente perdem a aderência ao plástico da placa/garrafa devido alterações nas propriedades das moléculas de adesão conforme aumenta a concentração de MI, então

soltam e são removidas com o sobrenadante, não sendo mais detectadas em M<sub>4</sub>. No teste com LA/BE, algumas células apoptóticas permaneceram aderidas mesmo em altas concentrações de MI, provavelmente devido à maior adesão das células na lamínula de vidro do que no plástico.

A diminuição de células na fase S do ciclo está de acordo com o resultado apresentado pela proliferação das células através da incorporação de BrdU no 14º dia. Sendo o BrdU incorporado ao núcleo das células que estão na fase S, a progressiva diminuição do percentual de células na fase S do ciclo celular é visto também pela progressiva diminuição de células proliferando, por BrdU.

Fitter e colaboradores (2008) examinaram culturas de células mesenquimais (derivadas de pedaços ósseos de aspirado da MO da crista ilíaca posterior) quanto a sua proliferação usando um corante fluorescente. O corante é distribuído igualmente entre células-filhas após divisão celular. Na ausência de MI, as células sofreram no máximo 5 divisões, sendo que 48,4% passaram por 4 divisões. Células cultivadas com 3,0 µM de MI passaram por no máximo 4 divisões, sendo que 43,96% sofreram 3 divisões. Fitter também examinou o efeito do MI no ciclo celular usando PI. Diferentemente dos nossos resultados, 83% das células acumularam em G<sub>1</sub> tanto na presença como na ausência de 3 µM de MI, enquanto que nossas culturas demonstraram um acúmulo em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> significativamente maior nos grupos tratados. Fitter também não encontrou diferença no percentual de células em sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (apoptóticas), S ou G<sub>2</sub> comparadas ao controle. A diferença entre os resultados pode ser talvez explicada pelas concentrações testadas por Fitter que foram inferiores às nossas.

Gioni e colaboradores (2008) demonstraram o efeito do MI na proliferação de fibroblastos do estroma da mama. Crescentes concentrações de MI (0,1-10 µM) foram adicionadas à cultura e a síntese de DNA foi estimada após 24 horas de incubação pela medida da incorporação de timidina radioativa. MI inibiu a proliferação de fibroblastos de modo concentração-dependente, ocorrendo desde concentrações muito baixas (0,1 µM). A análise do ciclo celular destas revelou uma significativa diminuição das células na fase S e acúmulo de célula em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> concentração-dependente, sem alterações pronunciadas na proporção G<sub>2</sub>/M.

Os genes que codificam proteínas comprometidas com a síntese de DNA e desoxirribonucleotídeos são induzidos quando as células passam pela transição G<sub>1</sub>-S. Uma família pequena de fatores de transcrição E2F é requerida para a transcrição de alguns desses genes e dos que codificam CDK2 e ciclinas A e E (LODISH et al., 2002). Um mecanismo pelo qual o MI reduz a proliferação de células da MO não-clonais pode ser pela regulação

negativa de genes do ciclo celular como E2F4 ou CUL4A (regulador da progressão do ciclo celular durante desenvolvimento mielóide) (SANCHEZ-GUIJO et al., 2009). Neste trabalho não foram avaliados os mecanismos envolvidos no bloqueio do ciclo celular, porém, o bloqueio em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> pode levar à apoptose que foi vista pelo LA/BE e aumento de células em M<sub>4</sub>.

Hubin e colaboradores (2005) cultivaram células estromais MS-5 que apresentam morfologia fibroblástica com prolongamentos. Essas células apresentaram discretos vacúolos lipídicos corados por Oil Red, indicando que as células estromais MS-5, *in vivo*, se diferenciam em adipócitos. Eles acreditam que essa diferenciação ocorra em células estromais na ausência de células hematopoiéticas, visto que a MO de pacientes com hipoplasia induzida por quimioterapia pode formar células adiposas espontaneamente, sugerindo a idéia que a formação de células adiposas seja uma resposta fisiológica ao déficit hematológico. Células reticulares da adventícia humana podem rapidamente acumular gordura e se transformar em adipócitos durante mielossupressão *in vivo* (ALMOHAMAD et al., 2003).

Weffort-Santos e Bittencourt (2004) utilizando um sistema de cultura tipo Dexter no estabelecimento da hematopoiese *in vitro* identificaram, ao final da terceira semana, um pequeno número de células fusiformes com acúmulo de vesículas que se assemelhavam à gordura. Essas células reagiram positivamente à coloração com Oil Red, revelando seu conteúdo de natureza lipídica, semelhante a relatos da literatura (TOUW; LÖWENBERG, 1987). A presença de células adiposas nas culturas tipo Dexter está associada a uma maior sobrevivência do sistema, tendo sido citadas como um indicador positivo com relação ao sucesso da cultura na manutenção de células primordiais (DEXTER; ALLEN, 1983).

Nossas culturas de células do estroma da MO apenas apresentaram adipócitos corados por Oil Red O no grupo controle (Figura 9), mostrando que o MI exerceu algum efeito na diferenciação das células estromais em adipócitos, ou talvez, induziu a apoptose de adipócitos pré-existentes. Os mecanismos não foram esclarecidos neste trabalho. A coloração para adipócitos foi realizada somente em culturas de 14 dias, mas a coloração das células em cultura de 7 dias poderia mostrar um resultado interessante.

Os fibroblastos são heterogêneos fenotipicamente e muitos expressam características de células musculares lisas, ou também chamados de miofibroblastos (POWELL et al., 1999), como revisado anteriormente. Em experimentos com fibroblastos de pulmão fetal humano, MI inibe a regulação da expressão de  $\alpha$ -SMA induzida por TGF- $\beta$ 1 (VITTAL et al., 2007). TGF- $\beta$ 1 é um mediador central de diferenciação e ativação de miofibroblastos *in vivo* e *in vitro* (THANNICKAL et al., 2004). TGF- $\beta$ 1 aumenta o número de CTM humanas que incorporam

SMA entre as fibras de tensão. A contração SMA-dependente de células estromais da MO permite à célula tensionar uma fina rede de colágeno que serve de sustentação para a suspensão celular contida na MO (KINNER et al., 2002).

No presente estudo, a expressão de  $\alpha$ -SMA para marcação de (mio)fibroblastos entre as células do estroma da MO cultivadas por 14 dias com MI demonstrou que este fármaco exerceu um efeito inibitório nesta expressão (Figura 16). Em 2,5  $\mu$ M a expressão foi reduzida para 45,74%; com 5,0  $\mu$ M reduziu para 4,35%; com 7,5  $\mu$ M reduziu para 2,51% e foi quase totalmente inibida a partir de 10  $\mu$ M.

A avaliação dos núcleos corados com DAPI demonstrou a existência de dois padrões que diferem em tamanho, núcleos de pequeno tamanho (DAPI P) e núcleos 3-4 vezes maiores (DAPI G), o que corresponde a populações de duas diferentes linhagens de células. Essas células representadas pelos núcleos corados se comportaram diferentemente de maneira concentração-dependente na presença de MI. O número de células-DAPI G reduziu a 46,03% com 2,5  $\mu$ M de MI, atingiu 23,45% com 5,0  $\mu$ M; 11,06% com 7,5  $\mu$ M e alcançou percentuais inferiores a 10% em concentrações superiores a 10  $\mu$ M [4,42% (10  $\mu$ M); 8,84% (15  $\mu$ M); 1,32% (20  $\mu$ M) e 0% (25  $\mu$ M)]. Em contraste, o número de células-DAPI P aumentou em 2,5  $\mu$ M (113,48%); 5,0  $\mu$ M (125,86%); 7,5  $\mu$ M (129,64%) chegando a quadruplicar em 10  $\mu$ M (408, 82%), reduzindo-se posteriormente a partir de 15  $\mu$ M [15  $\mu$ M (160,42%); 20  $\mu$ M (5,29%) e 25  $\mu$ M (1,83%)].

Os efeitos do MI na expressão de  $\alpha$ -SMA (Figura 16) observados são muito semelhantes aos de células-DAPI G (Figura 15A), visto que, pela sobreposição de imagens observou-se que a maioria das células que expressam SMA possui os núcleos grandes. Além disso, pelas imagens (Figura 17) verificou-se que no 14º dia de cultivo as células BrdU positivas são justamente essas mesmas células SMA positivas de núcleos grandes, ou seja, os (mio)fibroblastos estavam em processo proliferativo na ausência (ou baixíssimas concentrações) de MI. A avaliação da expressão de SMA em células cultivadas durante 7 dias seria interessante, mas devido a algumas limitações, não foi realizada neste trabalho.

O MI inibe o aumento do número de fibroblasto e miofibroblastos intersticiais e reduz a expressão e acúmulo de colágeno tipo III, IV e fibronectina através da inibição de TGF- $\beta$  (WANG et al., 2005). Estudos indicam que TGF- $\beta$  induz ativação de c-Abl regulando a proliferação de fibroblastos. Os macrófagos secretam TGF- $\beta$  que promovem proliferação e crescimento de fibroblastos maduros. A quinase c-Abl pode ser inibida pelo MI levando a redução da fibrose renal sem bloquear a infiltração de macrófagos no interstício renal (WANG et al., 2005).

A deleção de c-Abl em camundongos induz um fenótipo osteopênico caracterizado pela diferenciação prejudicada de osteoblastos, número e função normal de osteoclastos (LI et al., 2000). O'Sullivan e colaboradores (2007) cultivaram células RAW 264.7 de macrófagos murinos tratadas com MI e RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B) por 7 dias e avaliaram a expressão de c-Abl, c-Kit, PDGFRA e PDGFRB por RT-PCR e efeito na formação de osteoclastos. A sinalização por RANKL é essencial para a indução da diferenciação dos osteoclastos, e deve ser estritamente regulada para manter a homeostase óssea. Os resultados de RT-PCR mostraram que células RAW 264.7 não expressam receptores para PDGF- $\alpha$  nem c-Kit, mas expressam receptores para PDGF- $\beta$  e c-Abl. Dados sugerem que MI inibe osteoclastogênese por mecanismos dependentes de células estromais, alterando a produção de citocinas (HOFBAUER et al., 2000), e por ações diretas em precursores de osteoclastos (RAW 264.7) via RANKL e independente de c-fms (receptor para M-CSF) (O'SULLIVAN et al., 2007). Isto pode ser traduzido como “acúmulo” de células macrofágicas (RAW 264.7) que não conseguem se diferenciar em osteoclastos.

O MI inibe a proliferação e promove a apoptose de células estromais e pré-osteoblastos. O efeito antiproliferativo parece ser atribuído a sinalização por PDGF-R. O PDGF potencialmente aumenta a proliferação de células estromais e pré-osteoblastos, e esse efeito é interrompido pelo MI (O'SULLIVAN et al., 2007).

Dewar e colaboradores (2005) cultivaram células CD34+ isoladas da MO em IMDM suplementado com GM-CSF, G-CSF, IL-3 e IL-6 durante 21 dias na presença de 0 – 30 $\mu$ M de MI. Para concentração de 5 $\mu$ M de MI, a quantificação celular por citômetro de fluxo foi 70% menor que o grupo controle e indetectável com 30 $\mu$ M de MI, porém a viabilidade celular avaliada por azul de trypan somente apresentou redução de 80% para 60% em 30  $\mu$ M.

O cultivo de monócitos isolados mostrou que o MI causa uma inibição concentração-dependente significativa no desenvolvimento de macrófagos/monócitos *in vitro*. MI inibe a formação de colônias de monócitos/macrófagos de progenitores de MO normal e diminui a diferenciação de monócitos em macrófagos analisados pela morfologia e formação de pseudópodes após 7 dias de cultivo. A cultura líquida de células CD34+ não demonstrou uma inibição específica na linhagem monocítica, porém suprimiu o crescimento sem diminuir a viabilidade celular (DEWAR et al., 2003).

Contrariamente a Dewar (2003) onde os macrófagos diminuem progressivamente, nossas culturas de células de linhagem macrofágica RAW 264.7 (Figura 18) demonstraram gráfico de crescimento celular com perfil semelhante ao encontrado nas células do estroma da MO de uma forma geral. Embora a RAW 264.7 seja uma linhagem conhecida de macrófagos

leucêmicos, o objetivo de testá-la foi fazer uma “triagem” do efeito do MI em macrófagos de mesma origem (a MO) que estavam disponíveis no laboratório. Mesmo que as condições aplicadas (meio de cultura, tempo de cultivo) em nossas culturas tenham sido diferentes, o crescimento de células com características de macrófagos (cultura do estroma medular) e da linhagem RAW 264.7 demonstrou que houve um aumento no número de células até atingir um pico máximo e decair alcançando 0% de crescimento celular, ou seja, o MI é citotóxico de maneira concentração-dependente. O número de células viáveis aumentou 58,88% em relação ao controle em 5  $\mu$ M de MI para, então, reduzir progressivamente e atingir 0% em 15  $\mu$ M. Estes dados estão de acordo com a morfologia, viabilidade vista por MTT e LA/BE, e número de células DAPI P vistas em células do estroma da MO cultivadas com MI. A diferença das concentrações no ponto máximo de crescimento e morte total entre os dois tipos de cultura pode ser devida ao fato que no estroma total existem outros tipos de células (principalmente fibroblastos) que secretam fatores e interagem com os macrófagos, tornando a sensibilidade do macrófago ao MI diferente de quando cultivado isoladamente.

A proliferação de células com características arredondadas, aqui chamadas de células do tipo macrófago, diminui no ensaio clonogênico CFU-GM e parecem aumentar nas culturas de estroma. O mecanismo pelo qual isso acontece não é totalmente claro, visto que estudos atuais demonstraram que MI inibe c-Kit, mas não inibe c-fms. Entretanto, estudos sobre a origem dos macrófagos residentes em diversos tecidos têm mostrado que a proliferação local tem um papel considerável na renovação e manutenção de muitos tipos de macrófagos, enquanto que o recrutamento de precursores circulantes tem pequeno ou nenhum papel em alguns casos (GORDON; TAYLOR, 2005). Baseado na hipótese de que possa haver uma proliferação local de macrófagos nos tecidos, acredita-se que nos experimentos deste trabalho isso possa ter ocorrido nas culturas de estroma em algumas concentrações de MI quando se observou o aumento de células morfológicamente semelhantes a macrófagos até 10-15  $\mu$ M em detrimento das células com características fibroblásticas, justificando a diminuição do crescimento de CFU-GM nos ensaios clonogênicos independente do aumento de células visto em LA/BE, MTT, DAPI.

Diante destes resultados, podemos concluir que o MI exerceu efeito mielossupressor através da inibição da proliferação de fibroblastos, provavelmente através da ativação do processo de apoptose (e talvez outros que não foram estudados), aumentou a proliferação de células com características morfológicas de macrófagos atingindo um limite onde as células começaram a reduzir até morte total, além de exercer efeito inibitório em células adiposas. As



células apresentaram características morfológicas de macrófagos, mas algumas limitações não permitiram que fossem feitas marcações e técnicas que pudessem identificá-los com certeza.

Estes resultados juntamente com o efeito na redução concentração-dependente do crescimento de células progenitoras hematopoiéticas, mostram a importância da avaliação do potencial mielossupressor do Mesilato de Imatinibe, pois o fármaco talvez possa interferir na atividade da MO saudável de pacientes em tratamento, como reportado em diversos estudos.

O grau de toxicidade que leva à mielossupressão é avaliado principalmente pelos valores de neutrófilos, plaquetas e hemoglobina. Valores críticos: neutropenia – Grau 3 = neutrófilos  $< 1 \times 10^9/L$  e Grau 4 = neutrófilos  $< 0,5 \times 10^9/L$ ; trombocitopenia - Grau 3 = plaquetas  $< 50 \times 10^9/L$  e Grau 4 = plaquetas  $< 10 \times 10^9/L$  e anemia - Grau 3 = Hb  $< 8g/dL$  e Grau 4 = Hb  $< 6,5g/dL$  (MARIN et al., 2001).

Graus 3 e 4 são comuns e potencialmente sérias complicações do tratamento com MI. A frequência de mielossupressão depende do estágio da doença (DRUKER et al., 2001). A avaliação de pacientes com LMC com riscos intermediário e alto segundo o escore Sokal mostrou a ocorrência de efeitos adversos hematológicos de grau 3/4, melhorando quando a dosagem foi reduzida. Neutropenia ocorreu em 27,3% dos pacientes com risco intermediário e neutropenia, trombocitopenia e anemia ocorreram em 46,2%; 23,1% e 15,4%, respectivamente, em pacientes de alto risco (KOBAYASHI et al., 2009). Os efeitos colaterais do MI são, portanto, dose-dependentes, reversíveis e afetam todas as linhagens hematopoiéticas, embora em graus variáveis (APPEL et al., 2006).

Um estudo realizado no Brasil com 98 pacientes com LMC avaliou a toxicidade hematológica do MI de acordo com a fase da doença. Na fase crônica, 4%; 25% e 24% dos pacientes apresentaram neutropenia, trombocitopenia e anemia graus 1 e 2, respectivamente. Na fase acelerada, 0%; 12% e 38% dos pacientes apresentaram neutropenia, trombocitopenia e anemia graus 1 e 2, respectivamente. Na fase blástica, 0%, 13% e 20% dos pacientes apresentaram neutropenia, trombocitopenia e anemia graus 1 e 2, respectivamente. No caso de neutropenia, trombocitopenia e anemia graus 3 e 4, 17%; 11% e 0% dos pacientes em fase crônica apresentaram tais manifestações, respectivamente. Na fase acelerada, os valores sobem para 51%; 17% e 22%. E finalmente na fase blástica, 67%, 60% e 60% dos pacientes apresentam, respectivamente, neutropenia, trombocitopenia e anemia graus 3 e 4 (FUNKE et al., 2005).

Demetri e colaboradores (2002) demonstraram que a mielotoxicidade é menos frequente em pacientes com GIST, sugerindo que a mielossupressão associada com MI em cânceres hematológicos deve ser relacionado também à patofisiologia da MO leucêmica, mais

especificamente, o estroma medular. Anemia leve e neutropenia de leve a moderada são as alterações hematológicas mais comumente reportadas. Em pacientes com GIST tratados com MI por aproximadamente 9 meses, 7% desenvolveram neutropenias (5% de graus 3 e 4), e 9% desenvolveram anemia (2% de graus 3 e 4) (GUILHOT, 2004), sustentando a hipótese que efeitos colaterais hematológicos do MI estão parcialmente relacionados com a inibição direta da hematopoiese, talvez pela inibição das vias SCF/c-Kit (APPEL et al., 2006).

Para investigar se o efeito inibitório do crescimento em células CD34+ normais pelo MI é devido à inibição das vias SCF/c-Kit, experimentos usando células CD34+ de doadores saudáveis na ausência de SCF ou pela adição de anticorpos monoclonais anti-c-Kit foram testadas. Em ambos os casos, o grau de inibição da expansão foram similares, mas o efeito inibitório do MI é muito mais pronunciado, sustentando a hipótese de que a inibição de células CD34+ normais pelo MI é causada também por outros fatores adicionais que não os sinalizados por c-Kit. O receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) seria um potencial alvo para o efeito inibitório do MI. Embora ele não seja expresso em células CD34+ recém coletadas, uma superregulação do receptor foi observada após 3 dias de cultura. Além disso, o PDGF-R pode potencialmente manifestar este efeito na expansão das células-tronco hematopoiéticas por mecanismos secundários, como por exemplo, mediados por outras células da MO que expressam este receptor (BARTOLOVIC et al., 2004).

Apesar da relativa boa tolerabilidade de MI, muitos pacientes requerem uma diminuição da dosagem ou cessação temporária do tratamento devido a graves efeitos adversos. Efeitos adversos hematológicos são os que mais ocorrem devido à diminuição da reserva hematopoiética (KOBAYASHI et al., 2009).

Diante de inúmeros relatos de mielossupressão em pacientes de GIST, a análise de prontuários médicos de pacientes de GIST tratados com 400 mg de MI se tornou relevante. Os resultados demonstraram que 27% do total de 22 prontuários médicos não continham nem solicitação nem resultados de hemogramas posteriores ao início do tratamento, um número bastante elevado frente ao conhecido potencial de mielossupressão do MI. Em 18% dos pacientes os hemogramas eram normais, sem nenhum valor de Hb ou L alterados. Os 55% restantes apresentaram algum valor de hemoglobina e/ou leucócitos totais e neutrófilos alterados em relação aos valores de referência. Visto que 27% não possuíam hemograma nenhum, o percentual de pacientes com valores de Hb e/ou L alterados poderia ser superior, pois não se sabe se esses pacientes apresentariam hemogramas alterados ou não.

Em 75% (12 pacientes) dos pacientes com hemogramas avaliados (16 pacientes) apresentaram alguma alteração no valor de hemoglobina em relação aos VR utilizados.

43,75% dos pacientes apresentaram 3 ou mais valores de Hb alterados em 24 meses de tratamento. Um menor número de pacientes (7 pacientes) apresentou alteração na série leucocitária, sendo que 18,75% tiveram 3 ou mais valores de leucócitos totais e/ou neutrófilos alterados em 24 meses de tratamento.

Os valores de Hb variaram bastante, e a maioria dos dados estava muito abaixo do VR, sendo que 2 pacientes necessitaram de transfusão sanguínea. Não havia relatos de nenhuma outra incidência como perda sanguínea, emagrecimento ou desequilíbrio nutricional evidente, nem problemas intrínsecos na produção de eritrócitos que pudesse justificar valores tão baixos de Hb. Seria interessante em outro estudo avaliar o efeito do MI em ensaios clonogênicos estimulados com eritropoietina no crescimento de unidades formadoras de colônias de eritrócitos (CFU-E) e unidades formadoras de *burst* de eritrócitos (BFU-E).

Os valores da série leucocitária não apresentaram variações tão pronunciadas, porém, valores como 2800 leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (paciente 3) e 957 neutrófilos/mm<sup>3</sup> (paciente 13) foram observados, seguindo o limite inferior do VR de 4500 leucócitos totais/mm<sup>3</sup> e 1800 neutrófilos totais/mm<sup>3</sup>.

A série plaquetária não apresentou alterações durante o tratamento e as alterações encontradas nas séries leucocitárias e eritrocitárias independeram da faixa etária dos pacientes.

Avaliando os resultados conjuntamente, podemos inferir que o MI é um fármaco com potencial mielossupressor sobre diversas células presentes na MO saudável envolvidas na hematopoiese. Este trabalho fornece base para estudos de mecanismos envolvidos no processo de mielossupressão baseado nas dosagens de MI empregadas e poderá contribuir para a estratégia de novos fármacos cada vez mais seletivos administrados a um crescente número de neoplasias não-hematológicas.

## 6. CONCLUSÕES

1. O Mesilato de Imatinibe exerceu efeito mielossupressor sobre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos/Macrófagos (CFU-GM) obtidas da medula óssea de camundongos a partir de 1,25 $\mu$ M; apresentando uma IC<sub>50</sub> de 26,5 $\mu$ M e inibição total em 60 $\mu$ M.
2. O Mesilato de Imatinibe demonstrou inibir a proliferação de células do estroma da medula óssea de camundongos a partir de 2,5 $\mu$ M no 14º dia de cultivo. No 4º e 8º dias de cultivo, de forma não justificada neste trabalho, o imatinibe apresentou uma tendência em estimular a proliferação com 10 $\mu$ M.
3. O Mesilato de Imatinibe causou citotoxicidade concentração e tempo dependentes sobre células do estroma da medula óssea de camundongos com morte total em 25 $\mu$ M no 7º e 14º dias de cultivo.
4. Células do estroma da medula óssea de camundongos tratadas com Mesilato de Imatinibe apresentaram maior percentual de células viáveis em 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 15 $\mu$ M no 7º dia e, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M no 14º dia de cultivo.
5. O Mesilato de Imatinibe alterou a morfologia das células de estroma da medula óssea em cultura, possivelmente através da alteração do tipo celular predominante, justificando o aumento do número de células viáveis em 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M.
6. O Mesilato de Imatinibe demonstrou 100% de efeito inibitório sobre células adiposas obtidas em cultivo de 14 dias de células do estroma da medula óssea de camundongos, efeito que poderia comprometer a manutenção do microambiente da MO a longo prazo.
7. O Mesilato de Imatinibe exerceu bloqueio do ciclo celular nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de células do estroma da medula óssea de camundongos cultivadas com 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 15 $\mu$ M e consequente diminuição da proliferação (fase S), confirmando o comprometimento da proliferação avaliada pelo BrdU.
8. O Mesilato de Imatinibe demonstrou importante inibição na expressão de  $\alpha$ -SMA de maneira concentração-dependente e atingiu inibição total em 20 $\mu$ M após 14 dias de cultivo de células do estroma da medula óssea de camundongos, demonstrando um efeito preferencial nos fibroblastos da MO.

O MI atua sobre progenitores hematopoiéticos e células do estroma da MO. O fármaco apresenta efeito inibidor mais efetivo sobre fibroblastos e adipócitos, e parece estimular a

proliferação de células do tipo macrófago. O efeito demonstrado *in vitro* provavelmente reflete possíveis alterações na arquitetura da MO *in vivo*.

Diante destes resultados, levanta-se o alerta quanto aos possíveis efeitos nas células sanguíneas e estromais com o uso prolongado do MI.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, R.; DONELLY, S.C.; PENG, T.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites. **The Journal of Immunology**, 166: 7556–7562, 2001.

ALMOHAMAD, K.; THIRY, A.; HUBIN, F., et al. Marrow stromal cell recovery after radiation-induced aplasia in mice. **Int J Radiat Biol**, v.79, p. 259–267, 2003.

APPEL, S.; BALABANOV, S.; BROSSART, P. Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. **Stem Cells**, v. 23, p. 1082-1088, 2006.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G<sub>1</sub>- and S- phase checkpoints in response to DNA damage. **Curr Opin Cell Biol**, 13:738, 2001.

BARTOLOVIC, K.; BALABANOV, S.; HARTMANN, U. et al. Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. **Blood**, v.103, p. 523-529, 2004.

BERGANTINI, A.P.; CASTRO, F. A.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 27(2), p. 120-125, 2005.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: **Willians Hematology**, p.1085-1100, 2001.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G.. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. **Stem Cells**, 19:180-192, 2001.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, 2(4): 313–319, 2008.

BLANKE, C.D.; DEMETRI, G.D., et al., Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. **J Clin Oncol**, v. 26, p. 620–625, 2008.

BONASSA, E.M.A. Classificação dos Antineoplásicos. In: **Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 9-12, 2000.

BONASSA, E.M.A. Toxicidade Hematológica. In: **Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 75-83, 2000.

BRADLEY & METCALF, T.R. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 40, p. 287–300, 1966.

BRANDFORD, S.; RUDZKI, Z.; WALSH, S., et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**, v. 102, p. 276-83, 2003.

BRAVE, M.; GOODMAN, J.; KAMINSKAS, E. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. **Clin Câncer Res.**, v.14(2), p. 352-9, 2008.

BRECCIA, M., CANNELLA, L.; NANNI, M., et al. Nilotinib can override dasatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients with secondary resistance to imatinib first-line therapy. **Acta Haematol.**, v.118(3), p.162-4, 2007.

BUCHDUNGER, E.; CIOFFI, C.L.; LAW, N. et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 295:139-145, 2000.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, A.G.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, p. 2396-2402, 2001.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, 9(5):641-650, 1991.

CARTER, T.A.; WODICKA, L.M.; SHAH, N.P. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT and EGF receptor kinases. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102:11011-16, 2005.

CASALI, P. G.; GARRETT, C. R.; BLACKSTEIN, M. E. et al. Updated results from a phase III trial of sunitinib in GIST patients (pts) for whom imatinib (IM) therapy has failed due to resistance or intolerance. **Journal of Clinical Oncology**, ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition); v.24, n° 18S, (June 20 Supplement), 2006.

CHU, S., HELEN, X.; NEIL, P.S.; DAVID, S.S.; STEPHEN, J. F.; CHARLES, L.S.; RAVI, B. Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment. **Blood**, v. 105, p. 2093-2098, 2005.

CLAUSEN, J.; STOCKSHLÄDER, M.; FEHSE, N. et al. Blood-derived macrophage layers in the presence of hydrocortisone support myeloid progenitors in long-term cultures of CD34c cord blood and bone marrow cells. **Ann Hematol**, 79:59–65, 2000.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. **A célula: uma abordagem molecular**. Porto Alegre: Editora Artmed, 584-586, 2007.

DALEY, W.P.; PETERS, S.B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, v. 121(3):255-264, 2008.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum**, 44:1928 –1942, 2001.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, 28:875–884, 2000.

DEININGER, M.W.; GOLDMAN, J.M.; LYDON, N.; MELO, J.V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. **Blood**, v. 90: 3691–3698, 1997.

DEININGER, M.W.N.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V.. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96 (10), p. 3343-3352, 2000.

DELDAR, A. Drug-induced blood disorders: Review of pathogenetic mechanisms and utilisation of bone marrow cell culture technology as an investigative approach. **Curr. Topics Vet. Res.**, v.1, p. 83–101, 1994.

DELDAR, A., STEVENS, C. E. Development and application of in vitro models of Hematopoiesis to drug development. **Toxicol. Path.**, v. 21, p. 231–240, 1993.

DELDAR, A.; LEWIS, H.; BLOOM, J.; WEISS, L. Reproducible cloning assays for in vitro growth of canine hematopoietic progenitor cells and their potential applications in investigative hematotoxicity. **Am J Vet Res**, v. 49, n. 8, p.1393-40, 1988.

DELUCIA, R.; FILHO, R. M. O. Fármacos antineoplásicos In: **Farmacologia Integrada**, Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 502-525, 2004.

DEMETRI, G.; MARGARET VON MEHREN, M.D., et al., Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. **N Engl J Med**, v. 347 (7), p. 472-480, 2002.

DEWAR, A.; CAMBARERI, A.C.; ZANNETTINO, A.C.; MILLER, B.; DOHERTY, T.; HUGUES, T.; LYONS, A.B.. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. **Blood**, v. 105 (8), p. 3127-3132, 2005.

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

DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D. The regulation of growth and development of normal and leukaemics cells. **J Pathol** (141):415-433, 1983.

DIODOVICH, C.; BIANCHI, M. G.; BOWE, G.; ACQUATI, F.; TARAMELLI, R.; PARENT-MASSIN, D.; GRIBALDO, L. Response of human cord blood cells to styrene exposure: evaluation of its effects on apoptosis and gene expression by genomic technology. **Toxicology**, v. 200, p. 45-57, 2004.

DOBBIN, J.A.; GADELHA, M. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. **Rev Bras Cancerol**, v. 48(3), p. 429-438, 2002.

DOMINICI, M. ; LE BLANC, K. ; MUELLER, I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8:315–317, 2006.

DRUKER, B.J.; SAWYERS, C.L.; KANTARJIAN, H.; RESTA, D.J.; REESE, S.F.; FORD, J.M. et al. Activity of a specific inhibitor of the BCRABL tyrosine kinase in the blast crisis of



chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. **N Engl J Med**, v. 344, p. 1038-1042, 2001.

EKHOLM, S.V.; REED, S.I. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. **Curr Opin Cell Biol**, 12:676, 2000.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, 109:235–242, 2000.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H.M.. Chronic Myelogenous Leucemia: Biology and Therapy. **American College of Physicians–American Society of Internal Medicine**, v. 131 (3), p. 207-217, 1999.

FAUSEL, C. Target chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. **JMCP**, v.13, p. S8-12, 2007.

FITTER, S.; DEWAR, A.L., KOSTAKIS, P. et al. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. **Blood**, 111(5): 2538-2547, 2008.

FONSECA, S.M.; MACHADO, R.C.L.; PAIVA, D.R.S et al. **Manual de Quimioterapia Antineoplásica**. Rio de Janeiro: Editora Reichmann & Affonso, p. 8-13, 2000.

FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLAZOVA, U.F.; RUDAKOWA, S.F.; RUADKOW, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol** , v. 2, p. 83-92, 1974.

FRYE, R.F.; FITZGERALD, S.M.; LAGATTUTA, T.F et al. Effect of St John's wort on imatinib mesylate pharmacokinetics. **Clin Pharmacol Ther**, 76: 323-9, 2004.

FUNKE, V.; MEDEIRO, C.R.; LIMA, D.H.; SETÚBAL, D.C. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: A study of 98 cases. **Rev. bras. hematol. hemoter.** , 27(3):159-165, 2005.

GENG, Y.; ISHIKAWA, Y.; VATNER, D.E. et al. Apoptosis of Cardiac Myocytes in Gsa Transgenic Mice. **Circ Res.**, 84:34-42, 1999.

GIONI, V.; KARAMPINAS, T.; VOUTSINAS, G. et al. Imatinib Mesylate Inhibits Proliferation and Exerts an Antifibrotic Effect in Human Breast Stroma Fibroblasts. **Mol Cancer Res**, 6(5) 706-714, 2008.

GIORGI, U.; VERWEIJ, J. Imatinib and gastrointestinal stromal tumors: Where do we go from here? **Mol Cancer Ther.**, v. 4(3), p. 495-500, 2005.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. Células e órgãos do sistema imune. In: **Kuby Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 2, p. 27-42, 2002.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.. Câncer e o sistema imune. In: **Kuby Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 22, p. 539-560, 2002.

GOLEMOVIC, M.; VERSTOVSEK, S.; GILES, F., et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. **Clin Cancer Res.**, v. 11;4941-7, 2005.

GOMES, A.L.; GOUVEIA, A.; CAPELINHA, A.F.; LA CRUZ, D.; REIS, R.M. Molecular alterations of KIT and PDGFRA in GISTs: evaluation of a Portuguese series. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, p. 203-208, 2008.

GONG, J.; ARDELT, B.; TRAIKANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z. Unscheduled Expression of Cyclin B1 and Cyclin E in Several Leukemic and Solid Tumor Cell Lines. **Cancer Research**, 54:4285-4288, 1994.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Review**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GRIBALDO, L. Haematotoxicology: scientific basis and regulatory aspects. **Altern Lab Anim.**, v. 30, Suppl 2, p.111-113, 2002.

GRIBALDO, L.; BUEREN, J.; DELDAR, P.; HOKLAND, P.; MEREDITH, C.; MONETA, D.; MOSESSO, P.; PARCHMENT, R.; PARENT-MASSIN, D.; PESSINA, A.; SAN ROMAN, J.; SCHOETERS, G. The use of in vitro systems for evaluating haematotoxicity. ECVAM Workshop Report 14. **ATLA**, v.24, p. 211, 1996.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3), p. 335-343, 2007.

GRONTHOS, S. ; MANKANI, M. ; BRAHIM, J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci**, 97:13625–13630, 2000.

GUILHOT, F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. **The Oncologist**. v.9, p. 271-281, 2004.

HENRY, J.B. Exame básico do sangue. In: **Diagnósticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Barueri: Editora Manole, cap. 24, p. 559-604, 2008.

HINZ, B.; CELETTA, G.; TOMASEK, J.J. et al. Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, 2730–2741, 2001.

HINZ, B.; PHAN, H.; THANNICKAL, V.J. et al. The Myofibroblast One Function, Multiple Origins. **The American Journal of Pathology**, 170(6):1807-1816, 2007.

HOCHHAUS, A. Dasatinib for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia after imatinib failure. **Expert Opin Pharmacother.**, v.18:3257-64, 2007.

HOFBAUER, L.C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C.R.; LACEY, D.L., et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. **J Bone Miner**, v.15:2–12, 2000.

HOFFBRAND, A.V.; PETIT, J.E.; MOSS, P.A.. Genética das Doenças Hematológicas Malignas. In: **Fundamentos em Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 153-169, 2004.

HOLTZ, M.; SOLVAK, M.; ZHANG, F.; FORMAN, S.; BHATIA, R. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. **Blood**, v. 99 (10), p. 3792-3800, 2002.

HONCZARENKO, M. ; LE, Y. ; SWIERKOWSKI, M. et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. **Stem cells**, v. 24:1030 –1041, 2006.

HUBIN, F.; HUMBLET, C.; BELAID, Z. et al. Murine Bone Marrow Stromal Cells Sustain In Vivo the Survival of Hematopoietic Stem Cells and the Granulopoietic Differentiation of More Mature Progenitors. **Stem Cells**, 23:1626-1633, 2005.

HUNG, S.C.; CHEN, N.J.; HSIEH, S.L.; LI, H.; LO, W.H. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. **Stem Cells**, v. 20, p. 249-258, 2002.

IN'T ANKER, P.S.; SCHERION, S.A.; KLEIJBURG, K.C. et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v.102, p.1548 – 1549, 2003.

JABBOUR, E.; CORTES, J.; GHANEM, H., et al. Target therapy in chronic myeloid leukemia. **Expert Rev. Anticancer Ther.**,v. 8(1):99-110, 2008.

JAVASON, E.H.; COLTER, D.C.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J. Rat marrow stroma cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. **Stem Cells**, v.19, p. 219-225, 2001.

JESUS, C.R.; VITURI, C.L. Avaliação de parâmetros laboratoriais e clínicos de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica submetidos ao tratamento com mesilato de imatinibe e sua relação com alterações observadas no estroma da medula óssea. Resumo de Tese. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, 30(4):342-343, 2008.

JOENSUU, H. Imatinib efficacy in gastrointestinal stromal tumors. **Oncologia Disease**, p. 41-43, 2006.

KANTARJIAN, H.; GILES, F.; WUNDERLE, L., et al. Nilotinib in imatinibresistant CML and Philadelphia-chromosome positive ALL. **New Engl J Med.**, p.2542-51, 2006.

KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N Engl J Med**, v. 346(9), p. 645-652, 2002.

KINNER, B.; ZALESKAS, J.M.; SPECTOR, M. Regulation of Smooth Muscle Actin Expression and Contraction in Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Experimental Cell Research**, 278:72–83, 2002.

KOBAYASHI, S.; KIMURA, F.; KOBAYASHI, A. et al. Efficacy of low-dose imatinib in chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients. **Ann Hematol**, 88(4), 2009.

KRESSE, H.; SCHONHERR, E. **J. Cell. Physiol.**, v. 189, 266–274, 2001.

KURAMATO, A.C.K.; SILVA, B.B.; ULBRICH, A. et al. Desenvolvimento de abordagens moleculares para o estudo da transformação maligna por BCR-ABL: da genômica a novos quimioterápicos. In: **1º Prêmio Saúde Oncologia da América Latina**. São Paulo, 2006.

KUZNETSOV, S.A.; KREBSBACH, P.H.; SATOMURA, K. et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. **J Bone Miner Res**, 12:1335–1345, 1997.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H.; GRONTHOS, S. et al. Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol**, 153:1133–1140, 2001.

LAZENNEC, G.; JORGENSEN, C. Concise Review: Adult Multipotent Stromal Cells and Cancer: Risk or Benefit? **Stem Cells**, 26:1387–1394, 2008.

LE COUTRE, P.; GILES, F.; APPERLEY, J., et al. Nilotinib is safe and effective in accelerated phase chronic myelogenous leukemia (CML-AP) patients with imatinib resistance and intolerance. **Blood** (ASH annual meeting abstract), 110:471, 2007.

LI, B.; BOAS, S.; SANTOS, K.; SCHIEREN, I., et al. 2000 Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. **Nat Genet**, v. 24:304–308, 2000.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Câncer. In: **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 24, p. 1054-1082, 2002.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Controle do ciclo celular em células de mamíferos. In: **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 13, p. 524-533, 2002.

LORENZI, T.F. Hemopoese - Origem das Células do Sangue. In: **Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica**, Rio de Janeiro: Editora MEDSI, p. 7-21, 1999.

LYDON, N.B.; DRUKER, B.J. Lessons learned from the development of imatinib. **Leukemia Research**, 28S1, S29-38, 2004.

MA, L.; HUANG, Y.; CHENG, L.; LEI, J.; WANG, Q. Inducing effects of macrophage stimulating protein on the expansion of early hematopoietic progenitor cells in liquid culture. **Chin Med J** 2007;120(13):1192-1197, 2007.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; HAYNESWORTH, S.E. et al. Human marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. **J Hematother Stem Cell Res**, v. 9: 841–848, 2000.

MALERBA, I.; CASATI, S.; DIODOVICH, C.; PARENT-MASSIN, D.; GRIBALDO, L. Inhibition of CFU-E/BFU-E and CFU-GM colony growth by cyclophosphamide, 5-fluorouracil and taxol: development of a high-throughput in vitro method. **Toxicol In Vitro**, v. 18(3), p. 293-300, 2004.

MANLEY, P.; COWAN-JACOB, S.W.; MESTRAN, J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia. **Biochem Biophys Acta.**, v. 1754:3-13, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 37:14-16, 2007.

MARIN, D.; BUA, M.; MARKTEL, S.; CHASE, A.; UDOM, C., et al. The combination of cytogenetic response after 6 months treatment with STI571 and the presence of cytopenias in patients with CML in chronic phase resistant to or intolerant of interferon- $\alpha$  defines four different prognostic groups [abstract]. **Blood**, v. 98, Suppl 11, p. 846, 2001.

MARIN, D.; MARKTEL, S.; GOLDMAN, J.; APPERLEY, J.; OLAVARRIA, E. The use of imatinib (STI571) in chronic myeloid leukemia: some practical considerations. **Haematologica**, v. 87, p. 979-988, 2002.

MARTIN, H.C.; GRANT, W.; JOHN, R.J. et al. Approval Summary for Imatinib Mesylate Capsules in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. **Clin Cancer Res**, 8: 935-42, 2002.

MARTINEZ, F.O. ; GORDON, S. ; LOCATI, M. ; MANTOVANI, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **J. Immunol.**, v. 177, 7303-7311, 2006.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, 298-306, 2004.

MAURO, M.J. ; O'DWYER, M.; HEINRICH, M.C.; DRUKER, B.J. STI571: A Paradigm of New Agents for Cancer Therapeutics. **J Clin Oncol**, 20:325-334, 2002.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 26:2287-2299, 2008.

MELZER, D.; NEUMANN, U.; EBELL, W. et al. Imatinib mesylate (STI571) considerably affects normal human bone marrow stromal cell growth in vitro. **Blood**, 104a, 2004.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-53, 1983.

MUNGER, J.S.; HARPEL, J. G.; GLEIZES, P. E.; MAZZIERI, R., et al. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1376-1382, 1997.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. [www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/gleevec](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/gleevec) - acessado em 11.03.2004.

NEVES, R.G. A coloração de lipídios pelo Sudão. Importância na classificação histopatológica da hanseníase. **Hansen. Int.** 2(2):135-152, 1977.

NILI, N.; CHEEMA, A. N.; GIORDANO, F. J., et al. Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 869–878, 2003.

O'DWYER, M.E.; MAURO, M.J.; et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with Imatinib mesylate. **Blood**, v.103, n.2, p.451-55, 2004.

O'SULLIVAN, S.; NAOT, D.; CALLON, K. et al. Imatinib Promotes Osteoblast Differentiation by Inhibiting PDGFR Signaling and Inhibits Osteoclastogenesis by Both Direct and Stromal Cell-Dependent Mechanisms. **Journal of bone and mineral research**, 22(11):1680 – 1689, 2007.

OWEN, M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. **Bone and Mineral Research.**, 3: 1-25, 1985.

PARENT-MASSIN, D.. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 87-94, 2001.

PARENT-MASSIN, D.; THOUVENOT, D. In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rat progenitors. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 30 (4), p 203-207, 1993.

PESSINA, A.; ALBELLA, A.; BUEREN, J. et al. Method development for a prevalidation study of in vitro GM-CFU assay of predicting myelotoxicity. **Elsevier 31A**, 679-691, 2000.

PESSINA, A.; ALBELLA, B.; BAYO, M.; BUEREN, L. et al. Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. **Toxicol Sci**, v. 75 (2), p.355-367, 2003.

PESSINA, A.; PICCIRILLO, M.; MINEO, E.; CATALANI, P.; GRIBALDO, L.; MARAFANTE, E.; NERI, M.G.; RAIMONDI, A. Role of SR-4987 stromal cells in the modulation of doxorubicin toxicity to in vitro granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM). **Life Sci.**, 65(5), p. 513-523, 1999.

PESSINA, A. The granulocyte macrophage colony-forming unit assay. In: **Animal Cell Culture Techniques**, p. 217–230, 1998.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143-147, 1999.

PIVORIUNAS, A.; BERNOTIENE, E.; UNGURYTE, A. et al. Isolation and differentiation of mesenchymal stem-like cells from human umbilical cord vein endothelium and subendothelium. **Biologija**, nº 2, p. 99-103, 2006.

POWELL, D.W.; MIFFLIN, R.C.; VALENTICH, J.D.; CROWE, S.E.; SAADA, J.I.; WEST, A.B. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **Am J Physiol Cell Physiol** 277:1-19, 1999.

PREECE, A. **A manual for Histologic Technicians**, Boston: Little, Brown and Co, 1972.  
PUTTINI, M.; COLUCCIA, A.M.; BOSCHELLI, F., et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Scr-Abl inhibitor, against imatinib resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. **Cancer Res.**, v. 66, p. 11314-22, 2006.

QUEIROZ, M. L. S.; VALADARES, M. C. ; BINCOLETTA, C.. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, in press, 2004.

QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R.; MULLER, A. H. Adjuvant effect of Pluchea quitoc extract on the resistance of tumor-bearing mice by modulation of the host hematopoietic response. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, v. 23, n. 2, p. 215-28, 2001.

RANDOLPH, T.R. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. **Clin Lab Sci.**, v.18(1), p. 38-48, 2005.

RASMUSSEN, I., RINGDEN, O.; SUNDBERG, B., et al. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. **Transplantation**, v.76, p. 1208–1213, 2003.

RATAJCZAK, M.Z. Phenotypic and functional characterizations of hematopoietic stem cells. **Current Opinion in Hematology**, 15: 293-300, 2008.

RAUT, C.P.; POSNER, M.; DESAI, J.; MORGAN, J.A.; DEMETRI, G.D.; BERTAGNOLLI, M. Surgical management of advanced gastrointestinal stromal tumors after treatment with targeted systemic therapy using kinase inhibitors. **J Clin Oncol.**, v. 24, p. 2325-31, 2006.

RINGDÉN, O., LE BLANC, K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: State of the art and new perspectives. **APMIS**, v. 113, p. 813– 830, 2005.

ROBERTS, J.M.; SHERR, C.J. Bared essentials of CDK2 and cyclin E. **Nat Genet**, 35:9, 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo 6ª edição Ed. Manole 147-160, 2003.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, p. 105-110, 2003.

SANCHEZ-GUIJO, F.M.; HERNANDEZ, J.M.; LUMBRERAS, E. et al. Effects of imatinib mesylate on normal bone marrow cells from chronic myeloid leukemia patients in complete cytogenetic response. **Leukemia Research**, 33:170–173, 2009.

SANTRA, M.; REED, C.C.; IOZZO, R. V. Decorin Binds to a Narrow Region of the Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor, Partially Overlapping but Distinct from the EGF-binding Epitope. **J. Biol. Chem.**, v. 277, 35671–35681, 2002.

SAVAGE, D.G.; ANTMAN, K.H. Imatinib mesylate – a new oral targeted therapy. **N Eng J Med**, 346:683-693, 2002.

SCIOT, R.. DEBIEC-RYCHTER, M. GIST under imatinib therapy. **Semin Diagn Pathol.**, v. 23(2), p. 84-90, 2006.

SHER, C.J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, 2:103, 2002.

SOUZA, C.A. Leucemia Mielóide Crônica – Novas drogas em desenvolvimento. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 30(Supl. 1): 32-36, 2008.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, 23:901–44, 2005.

TEFFERI, A.; DEWALD, G.W.; LITZOW, M.L., et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc.**, v. 80(3):390-402, 2005.

TEFFERI, A.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. **Cancer**, v. 115:3842–7, 2009.

TESTA, N.G.; MOLINEUX, G. **Haemopoiesis: A practical Approach**. New York: Oxford. University Press Inc., 1993.

THANNICKAL, V.; TOEWS, G.B.; WHITE, E.S. et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. **Annu Rev Med** 55:19.11–19.23, 2004.

TOUW, I.; LÖWENBERG. No stimulate effect of adipocytes on hematopoiesis in long-term bone marrow cultures. **Blood** (61): 770-774, 1987.

USMAN, M.; SYED, N.V.; KAKEPOTO, G.N., et al. Hematological and nonhematological toxicities of imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumor. **Indian J Pharmacol**, v.39, p.192-195, 2007.

VALADARES, M. C.; KLEIN, S. I.; ZYNGIER, S.; QUEIROZ, M. L. Growth and differentiation of bone marrow hematopoietic cells in mice bearing Ehrlich ascite tumor and treated with Dicyclopentadienildichlorotitanium (IV). **Int J Immunopharmacol.**, v. 20 (10), p. 573-81, 1998.

VALADARES, M. O uso de cultura clonal de precursores hematopoiéticos na investigação do potencial mielossupressivo de novas substâncias. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, 44-51, 2004.



VITTAL, R.; ZHANG, H.; HAN, M.K. et al. Effects of the Protein Kinase Inhibitor, Imatinib Mesylate, on Epithelial/Mesenchymal Phenotypes: Implications for Treatment of Fibrotic Diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 321, No. 1 321:35–44, 2007.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, 116:639-648, 2004.  
WANG, L.; VARGAS, H.; FRENCH, S.W.. Cellular Origin of Gastrointestinal Stromal Tumors: a Study of 27 Cases. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124(10), p. 1471-1475, 2000.

WANG, S.; WILKES, M.C.; LEOF, E.B.; HIRSCHBERG, R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. **The FASEB Journal**, Research Communication, 19: 2-11, 2005.

WEFFORT-SANTOS, A. M.; BITENCOURT, M.A. Cultura de células primordiais de medula óssea tipo Dexter : um procedimento laboratorial que mimetiza a hematopoese. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 36 (3), p. 167-172, 2004.

WILLIAMS, J.T.; SOUTHERLAND, S.S.; SOUZA, J. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple meso-dermal phenotypes. **Am Surg**, 65:22–26, 1999.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.M. Células-Tronco Mesenquimais. In: **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 35-44, 2006.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.M. Células-Tronco: origens e propriedades. In: **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 3-12, 2006.

ZALCBERG, J.R.; VERWEIJ, J.; CASALI, P.G., et al. Outcome of patients with advanced gastro-intestinal stromal tumours crossing over to a daily imatinib dose of 800 mg after progression on 400 mg. **Eur J Cancer**., v. 41(12), p.1751-7, 2005.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 7:211–228, 2001.

## 8. ANEXOS

### ANEXO A

<b>Resultado de Solicitação de Protocolo</b>	
<b>Protocolo</b>	PP00127
<b>Título</b>	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPRESSOR DOS FÁRMACOS CITARABINA, DAUNORRUBICINA E MESILATO DE IMATINIB.
<b>Data de Entrada</b>	20/06/2007
<b>Resultado:</b>	Aprovado
<b>Data/Prazo</b>	08/08/2007
<b>Considerações</b>	<p>Ofício nº 105/CEUA/PRPe/2007</p> <p>Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA</p> <p>Ao(à): Prof(a) Dr(a) Cidônia de Lourdes Vituri, Departamento de Análises Clínicas - CCS</p> <p>Prezado(a) Professor(a),</p> <p>Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o CEUA deliberou o seguinte:</p> <p>- APROVADO, por 1 (hum) ano, para a utilização de 408 camundongos (<i>Mus musculus</i>).</p> <p>Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.</p> <p>Atenciosamente,</p> <p>Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi Presidente-interino/CEUA/PRPe/UFSC</p> <p><b>Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)</b> <b>Data 13/11/2008</b></p> <p>Data 13/08/2007</p>

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

*CERTIFICADO* N° 174

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**APROVADO**

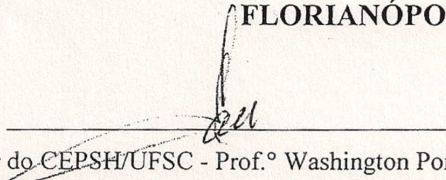
**PROCESSO: 202/08 FR- 205510**

**TÍTULO: Avaliação do potencial mielossupressor do MESILATO DE IMATINIBE.**

**AUTORES: Cidônia de Lourdes Vituri e Pâmela de Brum Soares**

**DPTO.: CCS**

**FLORIANÓPOLIS, 25 de agosto de 2008.**

  
Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza



## ANEXO C



ESTADO DE SANTA CATARINA  
SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE  
CENTRO DE PESQUISAS ONCOLÓGICAS-CEPON  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP

### Parecer nº 012/2008

Registro CEP:004/2008

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPRESSOR DO MESILATO DE IMATINIBE

Pesquisador Responsável: Cidônia de Lourdes Vituri

Instituição : Centro de Pesquisas Oncológicas: CEPON

Grupo e Área Temática: Grupo III

**Objetivo geral:** Avaliar o potencial mielossupressor do Mesilato de Imatinibe sobre as células do estroma medular obtidas de camundongos saudáveis.

**Objetivos específicos:**

- 1-Avaliar o efeito mielossupressor de diferentes concentrações de mesilato de imatinibe através de culturas clonais de células progenitoras hematopoiéticas normais de camundongos estimuladas por citocinas GM-CSF e Eritropoietina.
- 2- Avaliar o efeito mielossupressor do mesilato de imatinibe através de cultura de células normais do estroma medular de camundongos, onde serão avaliados os seguintes parâmetros: a contagem de células totais, citoquímica para células adiposas, viabilidade celular.
- 3-Determinar a Concentração Inibitória de 50% (IC50) e Concentração Inibitória de 90% (IC90) do Mesilato de Imatinibe em células da medula óssea (estromais e hematopoiéticas).
- 4-Verificar a ocorrência de neutropenia, plaquetopenia e anemia em pacientes sem doenças hematológicas, como os portadores de GIST, que utilizam o mesilato de imatinibe, através da análise de parâmetros definidos no hemograma.
- 5- Verificar a ocorrência de neutropenia, plaquetopenia e anemia em pacientes com diagnóstico de LMC que utilizam o mesilato de imatinibe, através da análise de parâmetros definidos no hemograma.
- 6- Correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a clínica dos pacientes.

**Sumário do Projeto:** A mielossupressão constitui-se no efeito colateral mais importante e comum relacionado com o tratamento quimioterápico. A avaliação do potencial mielossupressor de fármacos auxilia a melhor compreensão dos efeitos não desejáveis em pacientes que fazem uso contínuo desses fármacos que supostamente atuam apenas para inibir o defeito molecular da doença. Considerando que o Mesilato de imatinibe é uma formulação para o uso em pacientes com LMC e GIST, os dados estatísticos de efeitos adversos possibilitam compreender a necessidade de investigação dos possíveis mecanismos pelos quais eles ocorrem.

**Desenho do estudo:** Serão utilizados camundongos saudáveis Swiss machos entre 1,5 e 2 meses de idade ( Biotério da UFSC) aceito pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) sob o nº 356/CEUA3 23080 012139/2005-7UFSC.

O estudo experimental será realizado no Laboratório de Citologia Clínica da UFSC com a estrutura necessária para o projeto proposto.

No modelo experimental será realizado um ensaio clonogênico onde os progenitores hematopoiéticos serão semeados, serão incubados conforme metodologia apropriada. Serão analisadas concentrações inibitórias de proliferação celular segundo PARENT-MASSIN,2001; PESSINA et al.; 2001).

A cultura de células estromais coletadas a partir de medula óssea de fêmures de camundongos, também deverão se desenvolver segundo protocolo específico ( ROMANOV et al.;2003) com o objetivo de quantificar e qualificar o conteúdo celular estromal. Também será realizado o estudo de viabilidade celular destas células pelo ensaio de MTT reconhecendo através de leitor Elisa células mortas deste estudo.

A análise dos prontuários com diagnóstico de GIST e LMC serão coletados no CEPON/SC através de uma planilha específica para coleta dos dados. Para o GIST serão coletados dados



de 36 pacientes ( 2002 até 2008). Em relação a LMC serão coletados dados até 30 pacientes que preencham os critérios de inclusão. Dados a serem coletados: número de leucócitos totais, neutrófilos, plaquetas, eritrócitos valor de hematócrito e hemoglobina, também dados referentes ao sexo, idade, tempo de duração do tratamento, dosagens de imatinibe administradas e a fase da doença que se encontra.

Os critérios de inclusão e exclusão estão bem esclarecidos no estudo.

Não haverá contato com os pacientes, somente a utilização de seus prontuários. A obtenção do TCLE ocorrerá pela abordagem de um profissional no ato do fornecimento do medicamento para pacientes ativos no tratamento com mesilato de imatinibe.

O sujeito será instruído sobre a pesquisa pelo TCLE, no qual esclarece o objetivo, a participação, e seus possíveis benefícios e riscos, garantia da privacidade de sua identidade, sigilo dos dados coletados, sendo ele livre para assinar ou não a participação neste projeto, podendo desistir a qualquer momento sem nenhuma consequência para sua pessoa. O paciente não terá que prestar nenhuma informação adicional, não precisando também de coleta para nenhum tipo de amostra.

A análise de dados dos prontuários será feita conforme a dosagem de administração da droga. Serão estabelecidas comparações entre o valor médio obtido de um mesmo parâmetro do total de pacientes conforme as diferentes dosagens de mesilato de imatinibe administrada, tanto para GIST e LMC.

A análise estatística será realizada pelo programa STATISTICA 6,0 ( Média, desvio padrão, e p dos resultados). , Análise de variância (ANOVA), teste paramétrico de Tukey com  $p < 0,05$  ( significativo).

Cronograma prevê início para abril de 2008 e término dezembro de 2008.

A pesquisadora é Pâmela de Brum Soares, farmacêutica, pós-graduada do Mestrado em Farmácia - UFSC. Possui currículo para efetuar tal projeto ( especialização anterior no mesmo tema).

Comentários: - O estudo proposto possui relevância científica.

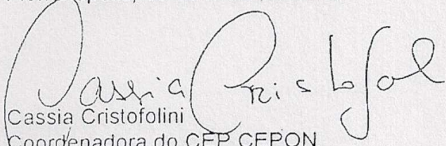
- Os sujeitos serão esclarecidos quanto sua vulnerabilidade e proteção. Seus riscos e benefícios estão bem argumentados pelos pesquisadores.
- Os pacientes estarão corretamente instruídos pelo TCLE, estando identificados os responsáveis pela pesquisa e pelo atendimento, é mostra ao sujeito as garantias de seus direitos como: informação, privacidade, recusa, desistência. No entanto ficou indefinido qual profissional fará a abordagem do sujeito da pesquisa e obterá o TCLE por ocasião do fornecimento do medicamento, entendemos que isto deverá ser feito pelo profissional farmacêutico que instruído pelo pesquisador terá condições de esclarecer dúvidas sobre o TCLE. Também no TCLE o contato com o CEP deverá substituir os dados da Coordenação de Pesquisa Científica
- Os critérios de exclusão e inclusão estão bem explicitados.

Recomendação: Apresentar, antes do início da pesquisa, documento assinado pelo profissional farmacêutico do CEPON aceitando a incumbência da obtenção do TCLE e corrigir o TCLE com contato do CEP.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do CEPON, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela Aprovação com Recomendação do projeto: " AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPRESSOR DO MESILATO DE IMATINIBE", nos termos em que está proposto.

Situação: Projeto Aprovado com Recomendação

Florianópolis, 09 de maio de 2008

  
Cassia Cristofolini  
Coordenadora do CEP CEPON