

LARISSA DUARTE CHRISTOFOLETTI

**EFEITO DO IMATINIBE EM CÉLULAS PROVENIENTES DO
ESTROMA DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EM
CULTURA PRIMÁRIA E LINHAGEM CELULAR
FIBROBLÁSTICA S17 SOB ESTÍMULO DO FATOR DE
CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF) *IN
VITRO.***

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^ª. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri

**FLORIANÓPOLIS –SC
2010**

A todas as pessoas que me apoiaram e permitiram a realização desse trabalho.

Aos meus pais que com sabedoria e amor me apoiaram e permitiram meus estudos.

Aos meus irmãos, namorado, amigos, família e orientadora todo carinho e compreensão durante meus estudos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cidônia de Lourdes Víturi por todos esses anos de convivência, ensino e carinho, paciência, estímulo e amizade. Seus ensinamentos serão levados por toda a vida.

Aos colegas de laboratório Lucas Maróstica, Prof.^a Patrícia Haas, Pâmela de Brum Soares, Elaine Borsatto, Caroline de Jesus, André pelos ensinamentos técnicos e de amizade em todos os momentos da faculdade.

Aos meus amigos e amigas de toda a vida, minhas amigas e amigos de profissão do Diagnóstico Laboratório, Bia, Sandra, Fran, Mari, Miriam, Fabi e Flávio Hormann que me ajudaram em todos os momentos que precisei estar ausente para a realização desse trabalho.

A Marley Licínio, pela grande ajuda, com os experimentos e horários, e por se uma pessoa de extrema capacidade e de grande coração.

Prof.^a Dr.^a Maria Cláudia Santos Silva e suas alunas especialmente a Juliana Costa pela oportunidade de utilizar o Laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao Laboratório de Biologia Celular BEG- UFSC pela ajuda em algumas etapas do trabalho.

A minha família, meus pais Nereu e Rita que me ensinaram os mais valiosos princípios de dedicação, honestidade e valorização dos estudos que diariamente pratico, irmãos preciosos Túlio e Samuel, tios e tias, primos e primas, pela compreensão de estar longe por alguns momentos em função desse trabalho e a todos por todo carinho e amor que recebo sempre.

Ao meu namorado Lucas Ferraro que sempre me apoiou e por algumas vezes me ajudou em alguns pontos do trabalho e por todos os dias e finais de semanas que não estivemos juntos em função do trabalho, agradeço pelo carinho, compreensão e amor.

Agradeço a todas as pessoas que em algum momento da minha vida desse trabalho passaram e/ou ajudaram a realizá-lo.

Agradeço a Deus pela vida e pelos caminhos que percorri e por todos que irei percorrer com fé.

RESUMO

A mielofibrose primária (MP) é uma desordem mieloproliferativa crônica caracterizada pela hiperplasia e fibrose medular. A fibrose característica dessa desordem está relacionada à liberação de fatores de crescimento hematopoiéticos, dentre eles o fator derivado de plaquetas, que estimula a proliferação de fibroblastos, com conseqüente depósito de fibras colágenas e reticulínicas. O desenvolvimento de fibras de colágeno no lugar do tecido hematopoiético normal é o responsável pela maioria dos sintomas da doença. O exame histopatológico revela o aumento da reticulina fibrilar, do colágeno e dos fibroblastos na medula óssea (MO). O tratamento da doença é paliativo, visando amenizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. Atualmente não existe nenhuma terapia capaz de inibir o processo fibrótico. O objetivo desse trabalho é verificar o efeito do fármaco imatinibe em linhagens de células provenientes do estroma da MO de camundongos e linhagem celular fibroblástica S17 sob estímulo do PDGF *in vitro* na busca de uma terapia eficaz para a MP. Este fármaco foi desenvolvido para o tratamento da leucemia mielóide crônica e atualmente tem sido alvo de estudo para outras doenças. A partir da realização de cultura primária da medula óssea de camundongos (CP) e cultura das células S17 foi avaliada: a viabilidade celular do estroma medular e das células hematopoéticas pelo método de azul de tripan e 3-(4,5-[Dimethylthiazol-2-yl](#))-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole (MTT), a viabilidade celular/apoptose das células S17 pelo método de laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE) e o ciclo celular pelo iodeto de propídio (IP) das células S17. O imatinibe exerceu um efeito inibitório sobre a viabilidade celular em CP a partir da concentração de 2,5 μM em células do estroma e em células hematopoéticas e sob o estímulo do PDGF o efeito inibitório foi a partir de 2,5 μM e 1,0 μM respectivamente. O tipo celular predominantemente afetado pelo imatinibe nas CP foi os fibroblastos. O imatinibe exerceu um efeito inibitório sobre a viabilidade celular em células fibroblásticas S17 a partir da concentração de 2,5 μM sem estímulo e 1,0 μM com estímulo de PDGF. As IC50 calculada para as CP sem estímulo foi 14,2 μM e com estímulo 13,5 μM ; para as células S17 sem estímulo foi 9,1 μM e com estímulo 8,8 μM . Na concentração de 7,5 μM , o efeito inibitório foi de 48% e 55% para células S17 com e sem estímulo de PDGF, respectivamente. Com auxílio da técnica LA/BE confirmou-se os resultados anteriores de viabilidade da célula S17 sob ação do Imatinibe

e mostrou que, em 5,0 μM não houve processo de apoptose, porém em 7,5 μM induziu apoptose. O imatinibe exerceu bloqueio do ciclo celular das células S17 nas fases G0/G1 e G2/M sem estímulo e com estímulo do PDGF. Com estímulo de PDGF houve aumento de células na fase S, sugerindo que o PDGF estimula as células S17 e que o fármaco atua principalmente nos fibroblastos em proliferação.

Palavras-chave: mielofibrose, fator derivado de plaquetas (PDGF), imatinibe.

ABSTRACT

The primary myelofibrosis is a chronic myeloproliferative disorder characterized by hyperplasia and fibrosis. Fibrosis characteristic of this disorder is related to the release of hematopoietic growth factors, among them platelet-derived factor which stimulates the proliferation of fibroblasts, with subsequent deposition of collagen fibers and reticular. The development of collagen fibers in place of normal hematopoietic tissue is responsible for most symptoms of the disease. Histopathology revealed increased fibrillar reticulin, collagen and fibroblasts in bone marrow. The treatment of the disease is palliative, aimed at minimizing the symptoms and improves quality of life of patients. There are no current therapy can inhibit the fibrotic process. Therefore, the purpose of this study is to evaluate the effect of the drug imatinib in cell lines derived from BM stroma of mice and fibroblast cell line S17 *in vitro* stimulation of PDGF in the search for an effective therapy for MP. This drug was developed for the treatment of chronic myelogenous leukemia and currently has been studied for other diseases. Through the completion of primary culture of mouse bone marrow and culture of S17 cells to assess cell viability of bone marrow stroma and hematopoietic cells by the method of trypan blue and MTT cell viability / apoptosis of S17 cells by the method Acridine orange / ethidium bromide and the cell cycle by propidium iodide of S17 cells. The imatinib exerted an inhibitory effect on cell viability in CP at concentrations of 2,5 μM in stromal cells and hematopoietic cells under the stimulus and the inhibitory effect of PDGF was from 2,5 and 1,0 μM respectively. The cell type predominantly affected by imatinib in PCs was fibroblasts. The imatinib exerted an inhibitory effect on cell viability in fibroblast cells from the S17 concentration of 2,5 and 1,0 μM without stimulation and with stimulation of PDGF. The IC₅₀ calculated for CPs without stimulation was 14,2, 13,5 μM with a stimulus; for S17 cells without stimulation was 9.1 μM and stimulus was 8.8 μM . For 7.5 μM , the inhibitory effect was 48 and 55% for S17 cells with and without stimulation of PDGF, respectively. The technique LA/BE confirmed previous results of viability of S17 under the action of imatinib and showed that, at 5,0 μM no apoptosis, but at 7,5 μM exerted apoptose.O induced blockade of cell cycle of S17 cells phases G₀/G₁ and G₂/M without stimulation and with of PDGF. With PDGF stimulation increased the S phase cells, suggesting that PDGF stimulates the S17 cells and that the drug acts mainly in proliferating fibroblasts.

Key words: myelofibrosis, platelet-derived factor (PDGF), imatinibe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estroma medular.....	15
Figura 2. CTH e a interação com microambiente medular.....	20
Figura 3. Moléculas de PDGF e a ligação com seus receptores.....	26
Figura 4: Corte histológico da medula óssea corada pela hematoxilina-eosina	33
Figura 5. Corte histológico da medula óssea.....	34
Figura 6. Fórmula química estrutural do imatinibe.....	43
Figura 7. Ciclo Celular.....	45
Figura 8. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em CP coradas azul de tripan.....	57
Figura 9. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em CP com MTT.....	58
Figura 10. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular das células hematopoéticas azul de tripan.	59
Figura 11. Morfologia das células hematopoéticas com PDGF.....	59
Figura 12. Morfologia da Cultura de CP no microscópio invertido.....	60
Figura 13. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em células S17 pelo método Azul de Tripan.....	61
Figura 14. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em células S17 pelo método do MTT.....	62
Figura15. A viabilidade celular em função da concentração de imatinibe.....	63
Figura 16. Concentração de Fármaco que induz 50% de inibição celular.....	63
Figura 17. Análise citomorfologica das células S17 fibroblásticas de camundongo.....	65
Figura 18. Histogramas formados pela citometria de fluxo nas células S17.....	66

LISTA DE TABELAS**Pág.**

Tabela 1: Principais fatores de Crescimento que agem na Mielofibrose primária.....	24
Tabela 2: Sintomas comuns em pacientes que apresentam Mielofibrose primária.....	29
Tabela 3: Achados físicos comuns em pacientes com Mielofibrose primária.....	30
Tabela 4: Principais alterações hematológicas em pacientes com Mielofibrose primária.....	31
Tabela 5: Efeito do Imatinibe sobre as fases do ciclo celular de células S17.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Bifosfato de adenosina
AIDS	Imunodeficiência adquirida
ANOVA	Análise de Variância de uma via
AIF	Fator indutor de apoptose
ATP	Trifosfato de adenosina
BAD	Proteína de morte celular inibidora da BCL-2
BCL-2	Proteína anti-apoptótica
BCR-ABL	Gene fusionado Abelson - <i>Breackpoint Cluster Regionn</i>
BFU-E	Unidade formadora de <i>burst</i> de eritrócitos
c-Abl	Proteína com função tirosinoquinase
CDKs	Ciclinas e Quinases dependentes de cilcinas
CD34	Molécula de adesão expressa em células-tronco hematopoiéticas e endoteliais
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CFU-G	Unidade formadora de colônia de granulócitos
CFU-GM	Unidade formadora de colônia de granulócitos/macrófagos
c-Kit	Receptor do fator de crescimento da célula-tronco, CD117
CP	Cultura Primária

CO₂	Dióxido de carbono
CTH	Células tronco hematopoéticas
CTM	Células tronco mesenquimais
CTP	Células pluripotentes
DMP	Desordens mielodisplásicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPM	Erro Padrão da Média
ET	Trombocitemia
FGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
FN	Fibronectina
G₀	Estado de quiescência
G₁/G₂	Fases <i>gap</i> do ciclo celular
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Hb	Hemoglobina

IC50	Concentração inibitória de 50%
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IMDM	Meio de cultura Dulbecco Modificado por Iscover's
IFN-α	Interferon-alfa
IP	Iodeto de propídio
IWG-MRT	Grupo internacional para pesquisa e tratamento de Mielofibrose Primária
JAK2	Janus kinase 2
LA/BE	Laranja de acridina/brometo de etídio
LMC	Leucemia mielóide crônica
LN	Laminina
MEC	Matrix extracelular
MH	Microambiente hematopoiético
M	Mitose
MO	Medula óssea
MP	Mielofibrose primária
MPL	Receptor de trombopoetina

MPN	Neoplasmas mieloproliferativos
MTT	3-(4,5- Dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRβ	Receptor para Fator de crescimento derivado de plaquetas β
PDGFRA	Receptor para fator de crescimento derivado de plaquetas A
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
PS	Estreptomicina
PV	Policetemia Vera
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
SE	Soro equino
SPSS	Programa PASW Statistics
STI-571	Imatinibe
STF	Fator de célula tronco
TGF-β	Fator β de crescimento e transformação
TNF	Fator de necrose tumoral
TPOR	Receptor de trombopoetina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1. Medula óssea.....	17
1.2. Mielofibrose Primária	20
1.2.1. Incidência.....	21
1.2.2. Etiologia e patogênese.....	21
1.2.3. Mielofibrose e hiperplasia.....	22
1.2.4. Fatores de crescimento.....	23
1.2.4.1. Fator β de Crescimento e Transformação	24
1.2.4.2. Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	25
1.2.5. Sinais e Sintomas.....	27
1.2.6. Dados laboratoriais.....	30
1.2.6.1. Sangue.....	30
1.2.6.2. Medula óssea na MP.....	31
1.2.7. Critérios para o diagnóstico de mielofibrose primária.....	33
1.2.8. Complicações e evolução da doença.....	34
1.2.9. Prognóstico.....	36
1.2.10. Tratamento.....	37
1.3. Imatinibe.....	41
1.4. Linhagem celular.....	43
1.5. Ciclo celular.....	44
1.6. Apoptose.....	47

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral.....	49
2.2. Objetivos específicos.....	49

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção de células da medula óssea – Cultura Primária	50
3.2. Linhagem celular.....	50
3.3. Meio de cultura IMDM.....	51
3.4. Cultivo celular	51
3.5. Preparação do Imatinibe.....	52
3.6. Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	52
3.7. Quantificação das células viáveis.....	53
3.8. Desenho experimental.....	53
3.9. Método 3-(4,5- Dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole.....	54
3.10. Fluorescência de LA/BE-Laranja de acridina/Brometo de etídio.....	54
3.11. Ciclo celular.....	55

3.12. Análise Estatística dos dados obtidos.....	56
4. Resultados	
4.1. Viabilidade celular da cultura primária pelo Azul de Tripan.....	57
4.2. Viabilidade celular da cultura primária por MTT.....	57
4.3. Viabilidade celular das células hematopoiéticas pelo Azul de Tripan.....	58
4.4. Análise microscópica das células aderentes nas CPs.....	59
4.5. Viabilidade Celular das células 17 pelo Azul de Tripan.....	60
4.6. Viabilidade Celular das células S17 pelo método do MTT.....	61
4.7. Cálculo da IC 50.....	62
4.8. Viabilidade Celular das células S17 pela técnica de Fluorescência.....	64
4.9. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	66
5. Discussão.....	68
6. Conclusões.....	78
7. Referências bibliográficas.....	79
8. Anexos	
Anexo A- Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	87
Anexo B- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CEPON.....	89
Anexo C- Artigo Mielofibrose.....	90

1.INTRODUÇÃO

A medula óssea (MO) é composta por dois sistemas que produzem linhagens de células distintas: o sistema hematopoietico e o tecido estromal que oferece suporte e está associado ao sistema hematopoietico. A interação destas duas linhagens proporciona a formação de microambientes celulares que promovem o processo de diferenciação das células tronco hematopoéticas (CTH). Estes microambientes são regulados pela interação direta das células e por fatores de crescimento e citocinas, que são produzidos por várias células hematopoéticas e não hematopoéticas (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2001).

O estroma medular é composto por elementos celulares e uma matrix extracelular (MEC) formada por várias macromoléculas secretadas pelas células estromais que permite a fixação de *stem cells* trazidas da circulação periférica e promove o contato dessas células com os fatores de crescimento hematopoéticos. As células estromais juntamente com os linfócitos produzem também a maior parte dos fatores de crescimento e ou citocinas hematopoéticas, que são glicoproteínas solúveis, que controlam a mitose e a diferenciação das células hematopoéticas (LORENZI, 1999).

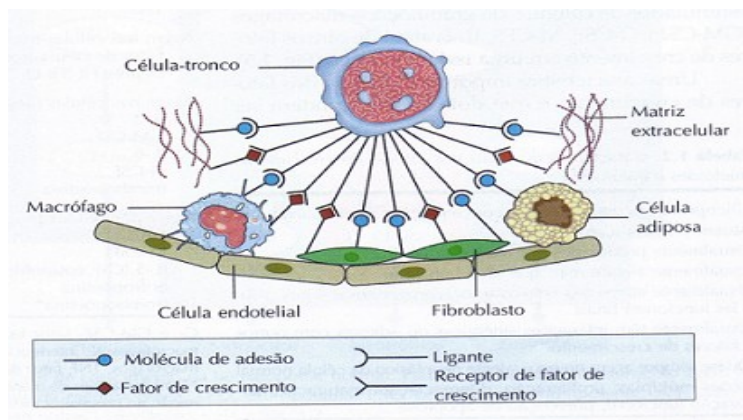


FIGURA 1. Estroma medular.

Composto por elementos celulares, matrix extracelular, fatores de crescimento que interagem e sustentam as *stem cells* trazidas da circulação (HOFFBRAND et al., 2004).

Existem vários fatores de crescimento agindo no ambiente medular sobre as células hematopoiéticas, como o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e indiretamente o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator básico de crescimento de fibroblasto (FGF) e outros (LORENZI, 1999).

Em indivíduos normais a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas são controladas pelo estroma medular. As leucemias são neoplasias malignas, de natureza clonal, das células primordiais hematopoiéticas, que substituem as células normais na medula e podem se difundir para o sangue periférico de forma descontrolada (GIRAUDIER et al., 2002).

Há duas situações do comprometimento do estroma que são de maior importância: quando o transplante de MO não tem resposta e nas mielofibroses.

As mielofibroses podem ser de natureza primária ou secundária à neoplasias. A mielofibrose primária (MP) é uma desordem mieloproliferativa crônica caracterizada pela hiperplasia e fibrose medular (GIRAUDIER et al., 2002). A fibrose característica dessa desordem está relacionada à liberação de fatores de crescimento hematopoiéticos, dentre eles o PDGF, que estimulam a proliferação de fibroblastos, com conseqüente depósito de fibras colágenas e reticulínicas. O desenvolvimento de fibras de colágeno no lugar do tecido hematopoiético normal é o responsável pela maioria dos sintomas da doença (ZAGO et al., 2005). Por outro lado, as mielofibroses secundárias se desenvolvem com a proliferação de células neoplásicas que liberam fatores de crescimento e interagem com células do estroma medular, como ocorre na leucemia mielóide crônica (LMC) provocando alterações na hematopoiese normal, essa indução das células ao um novo comportamento biológico pode alterar inclusive mecanismos de adesão (MARTINS et al., 2003).

Durante a invasão tumoral na MO que pode acontecer inclusive em doenças não hematopoiéticas, a organização e a composição da matrix extracelular parecem sofrer algumas modificações qualitativas e quantitativas ocasionando também uma mielofibrose secundária (MARTINS et al., 2003).

Para MP não existe tratamento e é uma doença considerada de mau prognóstico. As mielofibroses em geral, apresentam um aumento acentuado dos megacariócitos na medula óssea, os quais produzem

PDGF que estimula o estroma, tendo como consequência deposição de colágeno e outras moléculas da Mec. Dudley et al., 2003, observaram o efeito inibidor do mesilato de imatinibe sobre a angiogênese *in vitro*, e Stagno et al., 2004, realizaram a única pesquisa *in vivo* em humanos em apenas dois casos clínicos com MP avançada, e verificou uma resposta laboratorial benéfica, no entanto, os autores sugerem que os mecanismos de ação do fármaco necessitam de maiores investigações. Diante destes dados a comunidade científica levantou algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação da droga. Alguns experimentos evidenciam seu efeito inibitório nos receptores de PDGF e do fator de célula tronco (STF). Provavelmente este fármaco atua em células do estroma de outros órgãos, pois tem sido usado com sucesso em tumor estromal gastrointestinal (GIST) principalmente pela inibição da angiogênese (ZAGO et al., 2005).

Jesus e Vituri (2008), trabalharam com pacientes portadores de LMC, os quais apresentaram alterações significativas no estroma medular, mielofibrose secundária, a ponto de interferirem na resposta terapêutica e terem relação direta com a sobrevivência dos indivíduos. O estudo mostrou que os pacientes de LMC, que apresentam regressão da fibrose de medula óssea, após tratamento com imatinibe têm maior possibilidade de alcançar a resposta citogenética. Esse estudo apresentou a hipótese de que o imatinibe atua no estroma, em especial da medula óssea, abrindo possibilidades para maiores pesquisas relacionadas com processos fibróticos.

1.1. Medula óssea

A medula óssea (MO) é um órgão central onde se localizam as células pluripotentes (CTP) indiferenciadas que têm a capacidade de se multiplicar e diferenciar em diversas células do organismo. As CTP têm a capacidade de dar origem as CTH, as células tronco mesenquimais (CTM) e existem fortes evidências ainda que possam ainda originar células tronco comprometidas para vários órgãos como coração, fígado e cérebro. As CTH se diferenciam e multiplicam na MO e são lançadas na circulação sanguínea. Para dar sustento ao crescimento, proliferação e sobrevivências dessas CTH a medula possui uma rede de tecido conjuntivo e células fibroblásticas entre outras formando o estroma medular (SESHI et al., 2000), que interage com as CTH formando o microambiente da MO. Essa interação com as CTH é modulada por

quiescência mantendo-as em constante controle de proliferação, diferenciação e apoptose (HUBIN et al., 2005).

Assim, o estroma medular é formado por células estromais derivadas da CTM que se encontram fixas e incluem as células reticulares (adventícias e fibroblásticas), adipócitos, células endoteliais e macrófagos e também as células acessórias que não estão fixas, os linfócitos e monócitos (ZAGO et al., 2006).

Os fatores de crescimento hematopoéticos são glicoproteínas que regulam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras hematopoéticas e a função das células maduras. Receptores específicos nas células alvo permitem que os efeitos biológicos dos fatores de crescimento sejam mediados tanto no local onde são produzidos por contato célula a célula ou circular no plasma, ou ligar-se na matrix extracelular aderindo às células tronco e as progenitoras. Os linfócitos T, os monócitos e as células do estroma são as principais fontes de fatores de crescimento, com exceção da eritropoetina, da qual 90% são sintetizados no rim, e da trombopoetina, sintetizada principalmente no fígado. Os antígenos e endotoxinas ativam linfócitos T e macrófagos que liberam interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que então estimulam outras células, incluindo endoteliais, fibroblastos, outras células T e macrófagos que produzem GM-CSF, G-CSF, além de outros fatores de crescimento em uma rede interativa (HOFFBRAND et al., 2004).

As células multipotentes do estroma medular sintetizam moléculas de matrix extracelular como fibronectina (FN), laminina (LN), colágeno e glicosaminoglicanos e estão envolvidas na migração das células da MO, permitindo a formação da camada de aderência do estroma medular e sustento das células tronco hematopoéticas (LAZENNEC et al., 2008).

As interações regulatórias entre o microambiente medular e as células progenitoras hematopoéticas, parecem ser determinadas pelo reconhecimento mútuo e processos de adesão celular. Glicoproteínas de membrana são expressas durante a maturação de células hematopoéticas, como as integrinas, que interagem com os componentes da MEC. Alterações nas propriedades citoadesivas das células progenitoras são capazes de modular diferentes respostas celulares aos sinais de proliferação, células firmemente aderidas são mais sensíveis à exposição de citocinas, mas a perda de adesão é responsável pela liberação das células maduras para a circulação (RICO et al., 2009).

A FN é uma glicoproteína com alto poder de adesão encontrada na matrix extracelular e fluidos do corpo que promovem a adesão de células e regula sua sobrevivência e expressão de fenótipos em diferentes superfícies (RICO et al., 2009).

Essa glicoproteína contém duas regiões distintas que podem interagir independentemente com receptores de superfície. A primeira FN adesiva foi isolada e identificada de fragmentos de proteínas resistentes de 110-120kDa, 75kDa e 37kDa (AKIYAMA et al., 1995). As células hematopoéticas precursoras expressam receptores de FN determinando sua ancoragem a matrix. A expressão de integrinas para FN é perdida no desenvolvimento eritróide durante a fase de exonucleação das células, resultando em perda de adesão celular ao estroma (VITURI et al., 2001).

Os colágenos são uma família de proteínas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares. É o componente em maior quantidade de todas as matrizes extracelulares, sendo o principal produto dos fibroblastos (MARTINS et al., 2003).

Nilson e colaboradores (1998), mapearam a distribuição de proteínas da MEC em fêmur de camundongo. Os autores demonstraram que no endóstio localizavam-se colágenos do tipo I e IV, onde as células tronco hematopoéticas apresentavam maior afinidade. No perióstio detectaram colágeno do tipo III e IV. Nos vasos da medula óssea encontraram apenas o tipo IV e no osso colágenos tipo I e IV.

Colágeno tipo I e VI possuem propriedades adesivas para célula hematopoética, e a natureza do receptor aparentemente não está relacionada com a via integrina, sendo provavelmente um proteoglicano transmembrânico, possivelmente o heparan sulfato (VITURI et al., 2001).

Durante o crescimento neoplásico pode haver o aumento na deposição de colágeno, principalmente dos tipos I e III, o que caracteriza a reação desmoplástica do estroma. Esse fenômeno juntamente com a resposta imune e a angiogênese constitui as principais respostas do hospedeiro em relação à presença de células neoplásicas (MARTINS et al., 2003).

Considerando que células do estroma são essenciais a produção das moléculas da MEC, pequenas modificações quantitativas ou qualitativas dessas células podem resultar em desequilíbrio do sistema como na mielofibrose (VITURI et al., 2001).

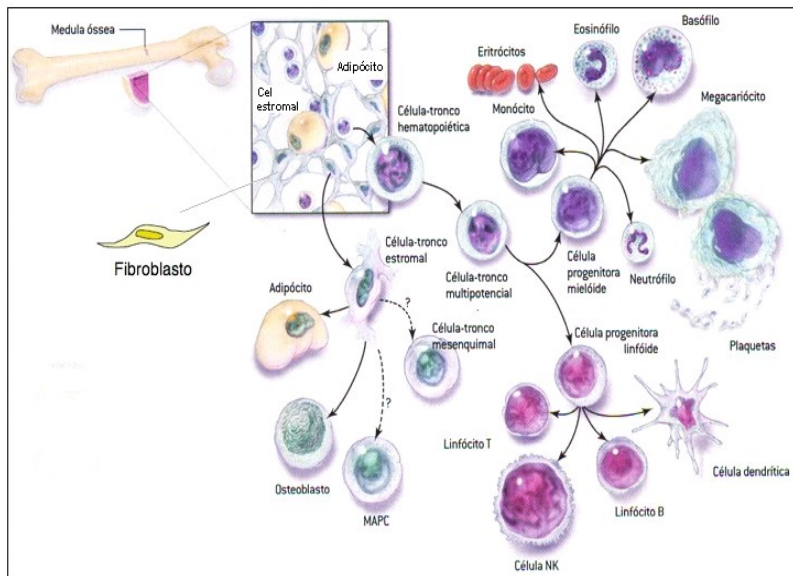


FIGURA 2. Células tronco hematopoéticas e a interação com microambiente medular.

O quadro ampliado mostra um fragmento medular de osso e a interação entre células estromais, células do tecido ósseo e células hematopoéticas.

Fonte e adaptado: <http://www.afh.bio.br/sustenta/Sustenta2.asp>.

1.2. Mielofibrose Primária

A Mielofibrose Primária (MP) também conhecida como metaplasia mielóide agnogênica, mioesclerose, metaplasia mielóide idiopática e osteosclerose, é uma desordem mieloproliferativa crônica de etiologia desconhecida (ZAGO et al., 2005), caracterizada pela hiperplasia e fibrose medular (GIRAUDIER et al., 2002), crescimento de células neoplásicas em locais fora da MO, hematopoiese extramedular, leucoeritroblastos no sangue periférico e alterações no número de plaquetas e granulócitos (CHAMPLIN et al., 1998; STAGNO et al., 2004).

MP é uma desordem mielodisplásica (DMP) em que o aumento de células maduras e células sanguíneas resultam da proliferação de clones de células neoplásicas derivadas de uma *stem cell* hematopoética multipotente que preserva a habilidade de diferenciação e maturação (KUMAR, 2009).

A organização mundial da saúde em 2008 substituiu doenças mieloproliferativas crônicas por neoplasmas mieloproliferativos (MPN) para DMPs que incluem a PV, LMC, ET com mutações no receptor de fatores de crescimento de fibroblastos 1 ou receptor de PDGF A/B e outras (ABDEL-WABAB; KUMAR et al., 2009).

O grupo internacional para pesquisa e tratamento de MP (IWG-MRT) propôs em 2007 que o termo MP fosse usado para pacientes com mielofibrose sem diagnósticos antecedentes de PV ou ET. Pacientes que já desenvolveram essas duas doenças previamente são classificados como “mielofibrose pós-PV” e “mielofibrose pós-ET” (ABDEL-WABAB, 2009).

Uma anormalidade molecular comum nas DMP é ativação de tirosinas quinases devido a mutações em pontos de ganho de função ou rearranjos de cromossomos. O primeiro alelo das DMP a ser identificado e caracterizado foi a fusão do oncogene BCR-ABL na LMC, consequência do rearranjo dos cromossomos 9;21, produzindo a proteína ativa quinase ABL. Outros oncogenes tirosinas quinases resultantes de translocação cromossomal tem sido identificadas nas DMP, incluindo o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR β) em pacientes com leucemia mielomonocítica e deleções interciais que originam da fusão do FIP1L1-PDGFR α (receptor para o fator de crescimento derivado de plaquetas A) em leucemia eosinofílica crônica (KUMAR et al., 2009).

Recentemente, estudos tem identificado a origem de mutações em Janus quinase 2 (JAK2) ou receptor de trombopoietina (TPOR) em PV, ET e MP que provocam a ativação da sinalização de JAK2, sendo alvo de terapias atrativas de intervenções para DMP (KUMAR et al., 2009).

A MP é uma síndrome na qual as evidências morfológicas de proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno na MO acompanham-se de metaplasia mielóide em órgãos como o fígado, baço e os linfonodos. Esses órgãos, que normalmente realizam eritropoiese no feto, mas não no adulto, tornam-se locais ativos da hematopoiese extramedular. Geralmente o grau da hematopoiese extramedular tende a acompanhar a extensão da fibrose da MO (KUMAR et al., 2009). Em muitos pacientes os osteoclastos também estão estimulados, formando ossos novos na cavidade medular e resultando em osteoesclerose (RAPAPORT, 1990).

O desenvolvimento de fibras de colágeno no lugar do tecido hematopoiético normal é o responsável pela maioria dos sintomas da doença (GIRAUDIER et al., 2002). A fibrose colágena, típica da

mielofibrose, apresenta um perfil bastante característico no que se refere aos tipos de colágeno. Inicialmente há predominância de colágeno tipo III, sendo, mais tarde, substituído pelo tipo I (ZAGO et al., 2005).

1.2.1. Incidência

A MP é uma desordem observada principalmente em pacientes de meia-idade e idosos. Embora alguns relatos tenham citado a ocorrência da doença em crianças ou até mesmo em bebês, pelo menos 60% dos casos ocorrem em indivíduos com idade entre 50 e 70 anos de idade, sendo mais comumente em caucasianos que em outras raças (ATHENS, 1998; BERK, 1993; HARISSON, 2004) e mais comuns em homens do que em mulheres, embora a associação ao sexo nunca tenha sido reportada especificamente (ABDEL-WABAB et al., 2009).

A frequência de evolução de MP aumenta com a duração da doença, resultando em uma maior probabilidade de aumento de morte pela evolução de 8% no período de 10 anos (KUMAR et al., 2009).

Há aproximadamente 0,5 casos por 100.000 habitantes/ano relatado e foi observado sobrevida mediana de 52% em três anos (ZAGO et al., 2005).

1.2.2. Etiologia e patogênese

As síndromes mieloproliferativas crônicas são distúrbios clonais que provêm da transformação neoplásica de uma única célula hematopoiética precursora comum. Tais distúrbios são evidenciados pela análise das isoenzimas, da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e por estudos citogenéticos. Estes revelam a expressão apenas da isoenzima A ou B da G6PD ou a presença de alterações cromossômicas nas células precursoras eritrocitárias, granulocíticas e megacariocíticas. Em contraste, nas proliferações policlonais ou benignas, ambas as isoenzimas A e B são expressas, e os marcadores cromossômicos estão ausentes (COTRAN et al., 1991), evidenciando que a fibrose da medula se origina da ativação e proliferação de fibroblastos policlonais (LORENZI, 1999). Em 2005, grupos de pesquisa reportaram que a maioria dos pacientes com a desordem possuíam a mutação no gene de codificação citoplasmático JAK2 ou no gene codificador do receptor de trombopoetina (MPL) (ABDEL-WABAB et al., 2009).

A proliferação desordenada dos fibroblastos que ocorre nas síndromes mielodisplásicas induz a uma alteração no estroma da medula

óssea e microambiente hematopoiético (MH). O estroma medular é formado por fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e macrófagos, os quais produzem uma complexa MEC; e citocinas, que formam o microambiente. A MEC é formada por proteínas fibrosas e polissacarídeos, como glicosaminoglicanos e proteoglicanos. As proteínas fibrosas podem ser divididas em estruturais, como colágeno e elastina, além das adesivas, como FN, LN e trombospondina, que podem controlar eventos como adesão, migração e proliferação da célula sanguínea (LORENZI, 1999).

Células de adesão envolvem um complexo fenômeno físico-químico, na qual participam diferentes moléculas biológicas, proteínas da matrix extracelular, de membrana e do citoesqueleto, que interagem transcrevendo fatores e regulando a expressão de genes. A adesão de células ocorre via proteínas da matrix extracelular FN, LN e vitronectina (RICO et al., 2009).

1.2.3. Mielofibrose e hiperplasia

A hiperplasia de megacariócitos, típica dos estados mieloproliferativos em geral, está diretamente envolvida com a proliferação dos fibroblastos, e conseqüente fibrose medular. Nas síndromes mieloproliferativas, a hiperplasia dos megacariócitos leva a uma megacariocitopose ineficiente, com conseqüente morte intramedular de megacariócitos e liberação dos fatores de crescimento. Estes, por sua vez, atuam estimulando a proliferação dos fibroblastos e a produção de colágeno, que, associada à inibição da atividade da colagenase, leva à fibrose medular (VERRASTRO et al., 1996). Dentre os fatores de crescimento que podem estimular a proliferação dos fibroblastos pode-se citar o PDGF, o fator β de crescimento e transformação (TGF- β) e o fator de crescimento EGF (ZAGO et al., 2005).

Nestas síndromes a fibrose medular é precedida por uma fase hiper celular de duração variável e, portanto nesta fase o diagnóstico se torna difícil. As alterações no sangue periférico se devem ao distúrbio anatômico da MO e, parcialmente, a hematopoiese extramedular. A MO apresenta hiperplasia sinusoidal e hipervascularidade, devido à elevada produção de fatores de crescimento o riginados da proliferação celular própria desta entidade, particularmente dos megacariócitos (ZAGO et al., 2005).

1.2.4. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são glicoproteínas secretadas por células que atuam na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. Esses fatores são classificados de acordo com o tipo de receptor de membrana celular em: família das citocinas e família dos receptores de tirosina quinase resumidos na Tabela 1 (LORENZI, 1999).

Tabela 1: Principais Fatores de Crescimento que agem na MP

FATOR DE CRESCIMENTO	ORIGEM	ALVO	RECEPTOR
PDGF PM:30.000	plaquetas células endoteliais macrófagos	fibroblastos células musculares lisa celulass gliais	tirosina quinase
EGF PM:6.045	Glandula de Brunner glandula submaxilar	queratinócitos células endoteliais fibroblastos	tirosina quinase
TGF- β PM:25.000	plaquetas	queratinócitos hepatócitos fibroblastos	3 receptores alta afinidade
FGF Pm:16.400	cérebro retina macrófago rim próstata	células endoteliais fibroblastos condrócitos células epiteliais queratinócitos	alta afinidade sem endocitose do complexo FGF-FGF-R

As citocinas da família de receptores de citocinas possuem um domínio extracelular de suas cadeias protéicas com dois módulos de 100 aminoácidos cada, que determinam uma estrutura secundária padrão. São dessa família o GM-CSF, G-CSF, eritropoietina, trombopoetina, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, interferons α , β e γ e TGF β (ZAGO et al.,

2005; VERRASTRO et al., 1996; LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

Receptores tirosina quinases podem fosforilar tirosinas em si, ou em outras proteínas citoplasmáticas, como no caso dos fatores de crescimento PDGF, EGF, FGF (LORENZI, 1999).

1.2.4.1. Fator β de Crescimento e Transformação

O TGF- β é sintetizado pelos megacariócitos, agindo no aumento da síntese e no acúmulo de proteínas da MEC e regulando a atividade dos genes envolvidos na síntese da mesma (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

Esse fator é responsável pelo aumento de fibronectina, tenascina, proteoglicanos e colágenos do tipo I, III e IV, observados nos estágios mais avançados da doença (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999; REILLY, 1997). Além disso, tem poder angiogênico (REILLY, 1997) e bloqueia a degradação da MEC pelo decréscimo da síntese de proteases colagenase-like e aumento da expressão de inibidores de proteases (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

Na mielofibrose, os níveis de TGF- β estão elevados, pois o mesmo favorece a proliferação de fibroblastos sob condições fisiológicas e patológicas (SANT'ANA, 2001). Entretanto, Lê Bousse-Kerdilès, Martyré, (1999) mostrou que a expressão de receptor TGF- β tipo II está diminuída nas células progenitoras e moléculas de adesão expressa em células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (CD34) na mielofibrose quando comparada a células normais. Apesar de se observar o aumento do número de precursores hematopoiéticos circulantes como CFU-GEMM, BFU-E e CFU-GM, demonstrou-se que a liberação anormal de TGF- β pela medula age nos estágios anteriores da hematopoiese regulando o ciclo das células progenitoras primitivas (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

1.2.4.2. Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

O PDGF é uma molécula dímera feita de um sistema de PDGF e receptor de PDGF que ativa tirosina quinase pela indução durante a ligação do receptor dímero e autofosforilação (HELDIN, 2004). Ele é uma glicoproteína dividida em duas frações protéicas ativas, que diferem entre si pelo conteúdo de carboidratos ligados covalentemente.

As duas frações apresentam atividade mitogênica, composição aminoácido e reatividade imunológica iguais (SANT'ANA, 2001).

O PDGF possui isoformas (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC e PDGF-DD), que têm como função originar dois tipos de receptores tirosina quinase, o receptor PDGF- α (PDGFR- α) e o PDGFR- β , que possuem massas moleculares de 170 e 180kDa, respectivamente, sendo que a forma PDGF-A se liga somente ao receptor $\alpha\alpha$, a forma PDGF-B se liga aos receptores $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ e $\beta\beta$ e o PDGF-AB se liga aos receptores $\alpha\alpha$ e $\alpha\beta$ sugerindo a presença do PDGF-B em quantidade e variedade de doenças. Cada receptor contém cinco domínios de imonuglobulina-like extracelular e domínios de tirosina quinase intracelular. A estrutura dos receptores PDGF é similar ao receptor do fator-1 estimulador de colônia e Receptor do fator de crescimento da célula-tronco, CD117 (c-kit). O PDGFR- α se liga a todas as isoformas exceto PDGF-DD, no entanto PDGFR- β se liga aos homodímeros PDGF-BB e PDGF-DD preferencialmente (MCGARY, et al., 2002; UUTELA, et al., 2004; BUCHDUNGER, et al., 2000).

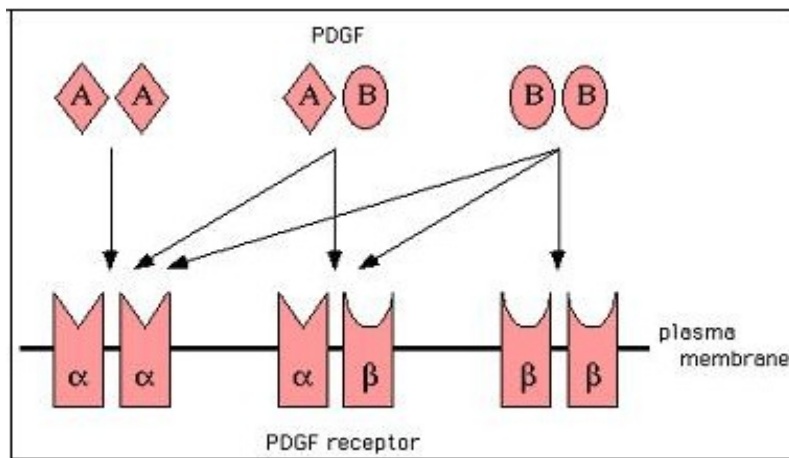


FIGURA 3. Moléculas de Fator de crescimento derivado de plaquetas e ligação com os receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas.

Fonte: <http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/account/receptor/pdgr.html>

O PDGF pode ser encontrado nos alfa-grânulos das plaquetas, sendo liberado no processo de coagulação, adesão plaquetária e em episódios de lesão a vasos sanguíneos. Sua função é estimular células

alvo específicas através da união a receptores de superfície celular que, por sua vez, mediarão uma cascata de eventos que levariam à síntese de Ácido desoxirribonucléico (DNA) e proliferação celular (MCGARY, et al., 2002).

O PDGF estimula o crescimento e a divisão de células fibroblásticas, atua também como fator quimiostático para fibroblastos, neutrófilos e monócitos, sendo responsável pela proliferação de fibroblastos na MP (REILLY, 1997). Assim o PDGF é um potente mitógeno para células de origem mesenquimal como fibroblastos, células musculares lisas e outras, sendo capaz de estimular a proliferação, quimiotaxia e sobrevivência das células normais e células alteradas como as do câncer, arteriosclerose e doença fibrótica (MCGARY, et al., 2002).

O PDGF também pode ser secretado por células endoteliais, aproximando células do músculo liso e promovendo a estabilização do tecido, dando suporte para o crescimento das células. Alguns estudos demonstram que esse fator age com grande intensidade envolvendo as células musculares lisas na angiogênese (DUDLEY, et al, 2003).

O PDGF além de promover o crescimento das células, também pode promover um efeito protetor inibindo a apoptose celular. Em fibroblastos e neurônios, a ativação de um receptor insulina quinase – o P13K, durante a construção do PDGF, promove a ligação entre o receptor PDGF e a fosforilação de Akt serina/tirosina kinase. Essa ativação se liga a fosforilação de BCL-2 (membro da família BAD), o qual inibe a interação de BAD com BCL_{XL}, um ativador normal de apoptose em algumas células, assim o PDGF atua na proliferação excessiva de células e na inibição da morte celular, promovendo o excesso de células como os fibroblastos na MP (MCGARY, et al., 2002).

Os receptores de PDGF são normalmente encontrados em tecidos ósseo conectivo e da glia, sendo escassos no tecido epitelial (BUCHDUNGER, et al., 2000).

Existem ainda outros fatores de crescimento:

A calmodulina que estão presentes nas plaquetas, sendo que seus níveis anormais podem refletir na morte intramedular das plaquetas e megacariócitos, refletindo o grau de proliferação dos fibroblastos e a ativação da mielofibrose (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÉ, 1999).

O FGF- β por sua vez está envolvido na proliferação de fibroblastos e na angiogênese, além de potencializar a proliferação de

megacariócitos e seus progenitores (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

O EGF está presente nos grânulos das plaquetas, sendo que alguns estudos mostram que ele coopera com o PDGF e TGF- β no estímulo para fibroblastos crescerem na MO (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

O Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina multifuncional, que contribui na angiogênese, permitindo o extravasamento de proteínas do plasma para o espaço extravascular, alterando a MEC e favorecendo a angiogênese e o crescimento de fibroblastos (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

1.2.5. Sinais e Sintomas

O início dos sintomas da MP é geralmente silencioso, durante vários anos, com progressão lenta da doença em muitos casos, sendo que um quarto dos casos ainda é assintomático por ocasião do diagnóstico (BERK, 1993). Em geral a doença é descoberta durante exames para outro problema não relacionado (RAPAPORT, 1990).

Os achado físico mais comuns da MP podem ser observados na Tabela 2, entre os quais o aumento da circunferência abdominal pode ser associado a hepatoesplenomegalia, um achado físico bastante comum em pacientes que apresentam a doença (BERK, 1993). Já a presença e o grau da fadiga, freqüentemente refletem o grau da anemia (ATHENS, 1998; JAMRA, LORENZI, 1983, ABDEL-WABAB, 2009).

A esplenomegalia acontece devido à hematopoiese extramedular (ABDEL-WABAB, 2009). Geralmente o paciente está afebril, mas alguns desenvolvem febre mais tardiamente na doença (RAPAPORT, 1990).

Pode haver gota e cólica renal como queixa inicial, espelhando uma hiperuricemia (ATHENS, 1998). Dessa forma, a dor óssea, geralmente migratória e a artrite gotosa fazem com que o paciente procure assistência médica (BERK, 1993).

A osteosclerose é comum, atingindo de 30% a 70% dos portadores da MP (WANG et al., 2004) e, decorrente desta, pode ocorrer surdez em uma pequena minoria dos casos (BERK, 1993). Em certos indivíduos há relato de extrema fraqueza, dores abdominais e infecção (ATHENS, 1998; VERRASTRO et al., 1996; LORENZI, 1999).

Tabela 2: Sinais e Sintomas comuns em pacientes que apresentam MP.

Sinais e Sintomas	Referências
Anemia	(BERK, 1993; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Aumento da circunferência abdominal	(BERK, 1993)
Fadiga	(RAPAPORT, 1990;ATHENS, 1998; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Perda de peso	(RAPAPORT, 1990;ATHENS, 1998; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Palidez	(JAMRA; LORENZI, 1983; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996; LORENZI, 1999)
Dores musculares	(JAMRA; LORENZI, 1983; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996; LORENZI, 1999)
Dores ósseas	(BERK, 1993)
Sudorese noturna	(RAPAPORT, 1990;RUNGE; GREGANTE, 2005)
Edema periférico	(RUNGE; GREGANTE, 2005)

Os achados físicos mais comuns em pacientes com MP podem ser observados na Tabela 3:

Tabela 3: Achados físicos comuns em pacientes com MP.

Achados físicos	Referência bibliográfica
Esplenomegalia	(ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Hepatomegalia	(BERK, 1993)
Tumor no hipocôndrio esquerdo	(JAMRA; LORENZI, 1983)

O único achado significativo na maioria dos pacientes é uma esplenomegalia (ATHENS, 1998; BERK, 1993; RAPAPORT, 1990). A

ausência de um baço palpável é de rara ocorrência, mas tal situação não exclui o diagnóstico de MP (ATHENS, 1998).

Hepatomegalia é detectada em torno de 50% dos pacientes, muitas vezes com discretas alterações nas provas hepáticas, em especial a elevação dos níveis de fosfatase alcalina (BERK, 1993). Em alguns pacientes, foram descritas petéquias e equimoses, causadas pela trombocitopenia e pela disfunção plaquetária (BERK, 1993; ATHENS, 1998). A queixa de aparecimento de um tumor no hipocôndrio esquerdo existe em todos os casos (JAMRA, LORENZI, 1983).

Adenomegalias significativas só ocorrem em 10% dos casos, embora seja freqüente demonstrar-se hematopoiese extramedular nos linfonodos pela histologia (BERK, 1993). Tumores extramedulares do tecido hematopoiético, geralmente com fibrose intensa, podem surgir em qualquer local, porém são mais comuns na mama, pele, pulmões, mediastino, rins, intestinos e nas glândulas supra-renais (BERK, 1993).

A ascite pode ser um achado tardio (RAPAPORT, 1990). Alguns pacientes apresentam subicterícia ou icterícia discreta, que pode estar ligada à lesão hepática, porém, mais freqüentemente, é relacionada a um grau maior ou menor de hiper-hemólise, fato que pode levar tais doentes a serem submetidos à esplenectomia, com presença de uma anemia hemolítica (JAMRA, LORENZI, 1983; VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999).

1.2.6. Dados laboratoriais

1.2.6.1. Sangue

As alterações no sangue são altamente variáveis. A Tabela 4 resume as principais alterações hematológicas encontradas em pacientes com MP:

Tabela 4: Principais alterações hematológicas em pacientes com MP.

Componente	Alterações	Referências
sanguíneo		Bibliográficas
Hemoglobina	9-13 mg/dl (leve anemia)	(BERK, 1993)
Morfologia das hemácias	Eritrócitos em forma de lágrima, ovais e nucleados; aniso e poiquilocitose acentuadas	(RAPAPORT, 1990; ATHENS,

		1998; BERK, 1993)
Granulócitos	Leucometria variável; presença de leucócitos imaturos	(BERK, 1993)
Plaquetas	Plaquetometria geralmente aumentada; presença de megatrombócitos e fragmentos de megacariócitos	(ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Fosfatase alcalina	Variável	(BERK, 1993)

A mais comum anormalidade nos exames laboratoriais é a anemia, com 50% dos pacientes apresentando Hb<10 mg/dL (ABDEL-WABAB et al., 2009). A princípio, as hemácias são normocíticas e normocrômicas com discreta poiquilocitose. Observa-se policromasia e uma discreta reticulocitose de 2 a 5 %. O achado de alguns normoblastos e, algumas vezes, precursores eritróides ainda mais jovens é muito comum. A anisocitose, a poiquilocitose, a policromasia, o pontilhado basofílico e a normoblastose são mais graves à medida que a doença progride, portanto esses achados e o crescimento do baço podem ser suficientemente característicos para indicarem um diagnóstico (BERK, 1993). Células fragmentadas e células em alvo também podem ser observadas (ATHENS, 1998).

As leucometrias são grandemente variáveis estando aumentadas em aproximadamente 50 % dos pacientes, normal em cerca de um terço dos pacientes, e baixa nos 15 % restantes. Mais tipicamente, a contagem de leucócitos fica na faixa de 15.000 a 30.000/mm³, porém foram observados até 70.000/mm³ (BERK, 1993).

A contagem de eosinófilos e basófilos está freqüentemente aumentada, mesmo nos pacientes com leucopenia (ATHENS, 1998; RAPAPORT, 1990). O número de linfócitos comumente está normal. A sensível variação na leucometria global reflete a variação em neutrófilos e podem ser observados neutrófilos hipersegmentados. É típico um certo grau de imaturidade do granulócito no sangue periférico incluindo a presença de até 10 % de formas jovens. Entretanto essa condição não sugere necessariamente a evolução para leucemia aguda, sobretudo

quando também existem números proporcionais de promielócitos, mielócitos e metamielócitos. A anomalia de Pelger-Huet adquirida é um outro aspecto típico no sangue periférico. A concentração de fosfatase alcalina do leucócito é variável, porém com frequência normal ou aumentada (BERK, 1993). A reação da fosfatase alcalina serve para diferenciar a MP da LMC, visto que a fibrose medular pode ser encontrada em todas essas situações englobadas sob a denominação de síndromes mieloproliferativas (VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999).

O número de plaquetas está aumentado por ocasião do diagnóstico em aproximadamente 50% dos pacientes. A produção de plaquetas está aumentada mesmo nos pacientes com trombocitopenia, estando associada a um grande aumento na reserva esplênica. A plaquetometria tende a cair pouco a pouco com o passar do tempo, sendo comum a trombocitopenia na fase final da doença. Graus extremos de trombocitose podem constituir-se na principal característica da doença em alguns pacientes, um achado que enfatiza a dificuldade na diferenciação entre trombocitemia primária e mielofibrose. Do ponto de vista morfológico, os megatrombócitos e os fragmentos megacariocíticos são extremamente comuns (BERK, 1993; ATHENS, 1998).

1.2.6.2. Medula óssea na Mielofibrose Primária

Descrevem-se três fases no quadro anatômico da medula na MP: na primeira fase há hiperplasticidade medular (Figura 4-A); na fase seguinte, a MO mostra áreas de fibrose e áreas com precursores hematopoiéticos (Figura 4-B); enquanto a terceira fase caracteriza-se por mielofibrose franca, com resíduos de tecido hematopoiético escassos, de permeio a fibras colágenas (VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999)

As tentativas de aspirar a MO tem como resultado quase invariável uma punção seca, mesmo quando a medula está em grande celularidade. Por isso, geralmente é preciso fazer a biópsia da MO, seja percutânea ou cirúrgica, para confirmar o diagnóstico (BERK, 1993).

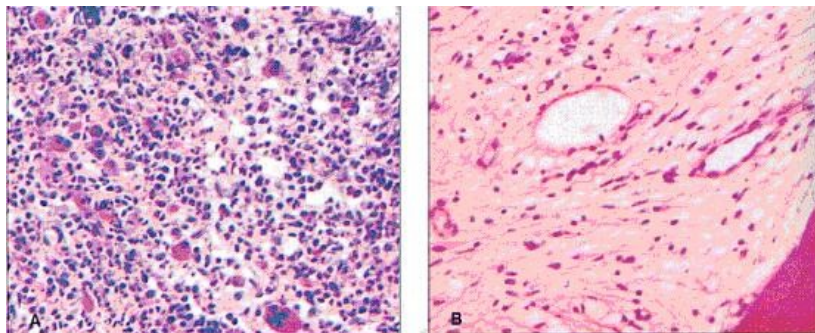


FIGURA 4. Corte histológico da medula óssea corada pela hematoxilina-eosina (A) - Fase hiper celular; (B) - Fase fibrótica

Fonte: LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia – Procedência e Clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA, 1999.

Esfregaços bem-sucedidos de aspirados de medula de pacientes com MP podem não exibir qualquer anormalidade, mas com mais frequência está aumentada a proporção de precursores dos neutrófilos e de megacariócitos. São observados micro e macromegacariócitos, bem como, uma assincronia nuclear citoplasmática e inclusões nucleares fibrilares, apresentando ligações cruzadas (ATHENS, 1998).

Há necessidade de uma biópsia medular para a elucidação da fibrose. Em praticamente todos os pacientes, graus variáveis de fibrose são detectados. Observa-se também o aumento da reticulina fibrilar, do colágeno e dos fibroblastos (RAPAPORT, 1990). São observados também grupos de megacariócitos, com muitos megacariócitos atípicos, sinusóides dilatados da MO, com maiores quantidades de mastócitos nas biópsias, particularmente em áreas adjacentes à fibrose e podem ser encontradas ilhotas residuais esparsas de medula celular (RAPAPORT, 1990; VERRASTRO, et al, 1996; ATHENS, 1998; LORENZI, 1999; RUNGE, GREGANTE, 2005).

Via de regra, em pacientes com MP é possível mostrar um aumento nas fibras de reticulina através da impregnação com prata (coloração de Gomori) nas áreas nas quais talvez não se consiga evidenciar colágeno, enquanto isso, a coloração com hematoxilina-eosina (HE) permite observar a celularidade da medula (BERK, 1993; BRADBURY, RAE, 1996, ABDEL-WABAB, 2009).

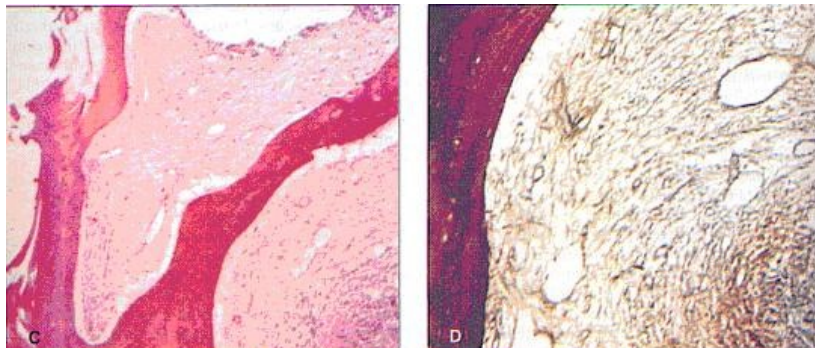


FIGURA 5. Corte histológico da medula óssea:(C)- Fase Fibrótica, corada com hematoxilina-eosina; (D)- Fibras reticulíneas coradas com a coloração de Gomori.

Fonte: LORENZI, T. F. Manual de Hematologia – Procedência e Clínica 2ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA, 1999.

1.2.7. Critérios para o diagnóstico de mielofibrose primária

Os critérios para o diagnóstico de mielofibrose com metaplasia mielóide incluem:

Critérios necessários:

- Fibrose da MO difusa e ausência do cromossomo Filadélfia ou rearranjo BCR-ABL nas células sanguíneas periféricas (KUMAR, et al, 2009);
- Hematopoiese extramedular incluindo células circulação de células imaturas mielóides e eritróides e aumento de fibras reticulinas na MO sem causa conhecida (KUMAR et al., 2009).
- A Organização Mundial da Saúde - WHO determinou testes de JAK2 ou pesquisas de mutações MPL positivos para DMP (VANUCCHI, GUGLIELMELLI, TEFFERI, 2009).

Critérios opcionais:

- Esplenomegalia de qualquer grau, anisopoiquilocitose com eritrócitos em gota ou lágrima, células mielóides imaturas, eritroblastos, agrupamentos de megacarioblastos e megacariócitos anômalos nas seções da MO, metaplasia mielóide (RUNGE, GREGANTE, 2005).

O diagnóstico da mielofibrose com metaplasia mielóide pode ser feito se as seguintes combinações estiverem presentes: dois critérios necessários, mais quaisquer dois critérios opcionais quando a esplenomegalia estiver presente, ou dois critérios necessários mais quaisquer quatro critérios opcionais, quando a esplenomegalia estiver ausente (RUNGE, GREGANTE, 2005).

Testes de JAK2 ou mutações MPL para DMPs foram determinados no diagnóstico de DMP, devido a detecção de uma dessas mutações ser identificada na DMPs (VANUCCHI, GUGLIELMELLI, TEFFERI, 2009).

1.2.8. Complicações e evolução da doença

A evolução da MP caracteriza-se por esplenomegalia progressiva e hepatomegalia um pouco menor. Geralmente, a esplenomegalia acompanha-se de anemia e trombocitopenia progressiva (BERK, 1993).

A anemia pode ser tão severa que o paciente só consegue sobreviver à custa de repetidas transfusões. Embora a anemia se deva primeiramente à insuficiência na produção de hemácias, em alguns pacientes o seqüestro esplênico contribui significativamente para a sua gravidade (RAPAPORT, 1990).

A trombocitopenia pode levar a um sangramento anormal. Entretanto, pacientes que não apresentam nenhum distúrbio no número de plaquetas também podem sangrar anormalmente, devido a defeitos qualitativos da função plaquetária. Se for necessária uma cirurgia, devem ser administrados concentrados de plaquetas para controlar o sangramento pós-operatório (RAPAPORT, 1990).

A evolução da PV para mielofibrose pode ocorrer, mas com maior freqüência ela se transforma em leucemia de tipo aguda, com blastos mielóides ou com grande componente de megacarioblastos (LORENZI, 1999).

Além da mielofibrose de evolução crônica, existe uma forma de mielofibrose aguda que não tem esplenomegalia tão marcante. Tal forma aguda evolui de modo rápido, com anemia acentuada, estado geral muito comprometido e freqüentes hemorragias. A MO é hipocelular, fibrosada e esclerosada (osteomieloesclerose), com blastos atípicos. Essa doença corresponde à leucemia aguda rara, de tipo megacariocítico, a LMA-M₇ da classificação FAB (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999).

As complicações da doença podem incluir hipertensão portal, infarto do baço e de outros locais da hematopoiese, causando linfadenopatia, derrames pleurais, ascite (superfícies serosas), processos de pneumonia, hematúria e compressão da medula espinhal e raízes nervosas (espaços paraespinhal e epidural) (RUNGE, GREGANTE, 2005).

A hipertensão portal é determinada pela grande esplenomegalia, o que leva ao aumento do fluxo sanguíneo para o baço, e pela maior resistência ao fluxo dentro do fígado, causada pela hematopoiese extramedular. Outras complicações que se pode citar são a trombose da veia hepática com a síndrome de Budd-Chiari (BERK, 1993) e a leucemia aguda (RAPAPORT, 1990).

O edema das extremidades inferiores é comum. Este pode ser produzido pelo baço e fígado aumentados, com uma subsequente compressão da veia cava inferior (ATHENS, 1998).

A inanição e infecção recorrentes também são frequentes. A esplenomegalia maciça e, às vezes, a hepatomegalia maciça interfere na saciedade do paciente. Isto, mais o hipermetabolismo que acompanha a metaplasia mielóide extensa, leva a uma perda muscular e a uma diminuição da resistência à infecção (RAPAPORT, 1990).

Freqüentemente a perda de peso torna-se um aspecto perturbador da mielofibrose, particularmente nos estágios avançados da doença. Embora freqüentemente tal perda se faça acompanhada de anorexia, comumente ela parece estar em desproporção com o grau de anorexia. A ruptura espontânea do baço, embora rara, tem ocorrido. Há relatos que a ruptura deste vem acontecendo após a prática de uma biópsia por agulha nesse órgão (ATHENS, 1998).

1.2.9. Prognóstico

O prognóstico da MP permanece pobre quando comparado com outras desordens mieloproliferativas, e não obteve mudança significativa durante os últimos 20 anos. Muitos relatos mostraram que o curso clínico e o prognóstico são extremamente variáveis, com tempo de vida que varia de 1,4 a 5,2 anos a partir do diagnóstico (ÖZEN et al, 1997, ABDEL-WABAB et al, 2009), embora possa variar de acordo com cada caso, chegando a atingir de 1 a 30 anos (REILLY, 1997).

O prognóstico da MP depende da fase em que se apresenta a doença, a qual implica maior ou menor quantidade de fibrose instalada (LORENZI, 1999).

O quadro histopatológico medular pode revelar hiper celularidade, especialmente de megacariócitos, fibrose discreta ou fibrose difusa colágena. Os achados anatômicos e hematológicos dependem da propensão da doença e, por sua vez, orientam o prognóstico (LORENZI, 1999).

São considerados fatores de mau prognóstico a hemoglobina abaixo de 10g/dl e leucócitos abaixo de 4.000 ou acima de 30.000/mm³ (ABDEL-WABAB et al., 2009)

A ausência desses três fatores (escore 0) se relaciona com baixo risco; a presença de um fator (escore 1) traduz risco intermediário, e de dois fatores (escore 2) indica alto risco (sistema Lille de escore) com o tempo de vida estimado para 93, 26 e 13 meses respectivamente (KERBAUY et al., 2006, ABDEL-WABAB et al., 2009).

O prognóstico é ruim para pacientes com risco intermediário e alto, com nenhum tratamento disponível que possa mudar o curso da doença (SNYDER et al, 2006).

Tamanho aumentado do baço e do fígado, febres, suores noturnos, perda de peso, cariótipo anormal, idade avançada, altas taxas de precursores mielóides imaturos no sangue, aumento de reticulina e colágeno, hematopoiese intrasinusoidal e trombocitopenia também são considerados importantes fatores de um mau prognóstico (CERVANTES, 2001; ÖZEN et al., 1997).

Mortalidade por MP se dá por anemia progressiva e desconforto abdominal decorrente da esplenomegalia (ELLIOTT, TEFFERI, 1999). As principais causas de morte são infecção, hemorragia, falha progressiva da medula, complicações decorrentes da hipertensão portal, insuficiência cardíaca, mortalidade pós-esplenectomia e transformação em leucemia aguda (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005). Esta pode ocorrer em aproximadamente 15% dos pacientes e é comumente mieloblástica ou mielo-monoblástica, podendo envolver também a linhagem megacariocítica, eritrocítica e linfóide (REILLY, 1997). Foi observada a morte atribuível também à insuficiência renal, insuficiência hepática ou trombose (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005).

Sugerem um bom prognóstico quando o baço e fígado de tamanhos normais e um bom estado histológico da MO (CERVANTES, 2001).

1.2.11. Tratamento

Não se chegou a um consenso sobre o tratamento ideal da MP. Não existe até agora qualquer tratamento eficaz que iniba o processo fibrótico (BERK, 1993). Além disso, nenhuma das formas terapêuticas convencionais mostrou-se capaz de prolongar a sobrevida, e nem apresentou um efeito benéfico consistente sobre o processo patogênico básico subjacente a mielofibrose (ATHENS, 1998). Assim o tratamento é paliativo e direcionado às complicações específicas, visando amenizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005).

As formas mais agressivas de tratamento, visando alteração da proliferação hematopoiética clonal anormal que, presumivelmente, está causando a fibrose medular, são racionais, mas até o presente têm deixado de beneficiar a maioria dos pacientes (ATHENS, 1998).

Visto que os pacientes com MP exibem variabilidade na evolução do progresso de sua doença e uma faixa de sobrevida variável, muitos pacientes não necessitam de terapia por períodos prolongados. Geralmente, os pacientes assintomáticos apenas devem ser observados (ATHENS, 1998). A maioria dos hematologistas não realiza qualquer tratamento específico no tratamento assintomático, a exceção do emprego de 200 a 400 mg/dia de alopurinol para evitar as complicações da hiperuricemia (BERK, 1993).

Alopurinol deve ser usado para manutenção dos níveis séricos de ácido úrico dentro dos limites normais, para assim dessa forma, evitar a nefropatia por uratos e cálculos renais, e também como profilaxia contra ataques de gota secundária (RAPAPORT, 1990, ATHENS, 1998;).

O tratamento convencional da anemia consiste em transfusões, para manter a hemoglobina em níveis razoáveis, e de uma suplementação com folato (VERRASTRO, et al, 1996; ATHENS, 1998; LORENZI, 1999). A eritropoietina pode ser usada em pacientes com um certo grau de anemia, com algum resultado (VERRASTRO, et al, 1996). Entretanto, no caso de anemia severa utiliza-se terapia com andrógenos e corticosteróides na tentativa de aumentar a eritropoiese efetiva (ATHENS, 1998; BERK, 1993; RUNGE, GREGANTE, 2005), mas são de valor questionável e podem provocar um aumento esplênico posterior e retenção de fluidos (RAPAPORT, 1990). Foi relatado que a terapia androgênica melhora a função medular em aproximadamente 40% dos pacientes (REILLY, 1997). Alguns hematologistas argumentam que os pacientes que não respondem a um androgênio

podem acabar respondendo a outro (BERK, 1993). Os esteróides das adrenais não têm efeitos comprovadamente benéficos em casos de mielofibrose (ATHENS, 1998). Quando há componente de hiperhemólise, pode ser utilizada a prednisona, associada ou não à vitamina B12 e ácido fólico (VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999).

A anemia hemolítica quase nunca responde aos corticosteróides, exceto nos pacientes com componente auto-imune comprovado; entretanto, essas drogas podem aumentar o risco de infecção nos pacientes granulocitopênicos (BERK, 1993).

Como a MP é uma doença crônica, as subseqüentes transfusões podem levar a um aumento nas concentrações séricas de ferro, devendo ser implantada uma terapia de quelação do ferro (REILLY, 1997).

A falta de uma terapia realmente eficaz para a MP, juntamente com os efeitos causados pela esplenomegalia, sugere a redução do tecido esplênico como a terapia para essa desordem. A redução direta do tecido esplênico pode ser realizada pelo uso de agentes citotóxicos, por irradiação ou pela remoção do órgão. As respostas aos agentes citotóxicos são variáveis e podem resultar em uma mielossupressão significativa (MESA et al., 2000).

Pequenas doses de radiação são usadas para reduzir o tamanho do baço e costumam proporcionar alívio aos sintomas dolorosos decorrentes da esplenomegalia (RAPAPORT, 1990; VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999), sendo que a resposta ao tratamento dura por aproximadamente 4 a 6 meses (REILLY, 1997).

A radioterapia é usada com maior frequência em pacientes com indicação para esplenectomia sem hipertensão portal, que são candidatos a uma cirurgia de alto risco. Todas as dosagens recomendadas provêm de estudos observacionais anteriores, que fornecem informações, embora limitadas, sobre as dosagens em que possam se esperar efeitos benéficos ou tóxicos. Porém, com base nas informações disponíveis, não se pode prescrever nenhuma dosagem ou esquema de radiação apropriado para todos os pacientes, devendo a terapia ser individualizada (ELLIOTT, et al, 1999).

Em todos os casos relatados, a toxicidade da radiação do baço se limitou a mielossupressão (ELLIOTT, et al, 1999), embora também já tenham sido relatado leucopenia e trombocitopenia graves (BERK, 1993).

O papel da esplenectomia nos pacientes com MP é controverso. Deve-se reservá-la para pessoas com anemia severa, hemólise

importante, trombocitopenia suficiente para causar sangramento, hipertensão porta, grande desconforto secundário a sintomas compressivos, infarto ou esplenomegalia sintomática, já que é um procedimento de alto risco (BERK, 1993; VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999; RUNGE, GREGANTE, 2005). Este procedimento está associado a uma taxa de mortalidade de 9% (MESA et al., 2000). Porém, a esplenomegalia na MP está associada a maior mortalidade quando comparada a outras desordens hematológicas. Além disso, a esplenectomia é contra-indicada em pacientes com riscos à anestesia e com coagulação intravascular disseminada oculta (ELLIOTT, et al, 1999).

Podem ocorrer trombocitose com trombose e/ou hemorragia, ou ambos, no pós-operatório, que podem exigir uma mielosupressão agressiva (BERK, 1993). O pós-operatório também deixa o paciente mais susceptível à infecção (RAPAPORT, 1990). Depois da esplenectomia, o fígado pode aumentar em aproximadamente 10% dos pacientes (RAPAPORT, 1990), bem como aumenta a probabilidade de se desenvolver uma leucemia aguda (CERVANTES, 2001).

Embora controversa, a esplenectomia pode fornecer um benefício paliativo durável aos pacientes com mielofibrose que se submeteram ao processo devido à hipertensão portal (ELLIOTT, et al, 1999; MESA et al., 2000).

Como mencionado anteriormente, a quimioterapia é defendida por alguns autores, tendo como base o raciocínio de que a MP é uma desordem da proliferação clonal das CTH (ATHENS, 1998; VERRASTRO, et al, 1996; LORENZI, 1999). A hidroxúria é o agente quimioterápico mais usado e pode diminuir o tamanho do fígado e do baço, diminuir ou eliminar sintomas constitucionais, reduzir o número de plaquetas e, em alguns casos, levar a um aumento na concentração de hemoglobina. O efeito da terapia dura aproximadamente 4 a 5 meses, sendo de grande toxicidade, o que levando ao encerramento da terapia (REILLY, 1997).

Bussulfam, outro anti-tumoral, atua na diminuição do tamanho do baço e rebaixa a leucometria e plaquetometria, mas raramente alivia a anemia (ATHENS, 1998; VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999). Embora largamente usado nesse quadro, os riscos mutagênicos potenciais do bussulfam são uma causa de preocupação. Outros agentes como radiofostato e a 6-tioguanina têm efeitos similares aos apresentados pelo bussulfam. Apesar desses agentes possuírem efeitos benéficos na redução do baço e/ou um aumento na concentração

de hemoglobina, podem determinar supressão de eritropoiese e da trombopoiese (BERK, 1993).

Tem-se pesquisado o efeito dos intérferons como agentes anti-tumorais, porém os mesmos não têm se mostrado de muita utilidade no tratamento da MP (VERRASTRO, et al, 1996; ATHENS, 1998), a exemplo do Interferon α (IFN- α) que vem apresentando poucos resultados nessa patologia (LORENZI, 1999). Se o paciente for submetido a uma terapia anti-tumoral, as doses deverão ser menores que as usadas no tratamento da LMC, porque uma pancitopenia severa é facilmente induzida em pacientes com MP (ATHENS, 1998).

O transplante de células tronco é uma opção nos pacientes jovens, no entanto a maioria cursa a doença em idade avançada (RUNGE, GREGANTE, 2005, ABDEL-WABAB et al., 2009).

Harrison, 2004 cita que é possível curar alguns pacientes com o transplante, mas devido a altos riscos de mortalidade relacionado ao procedimento, essa técnica era realizada somente em pacientes jovens com um pobre prognóstico. No entanto o transplante de células hematopoiéticas alogênicas está sendo aplicado em pacientes idosos com MP obtendo-se resultados satisfatórios/estimulantes. É um tratamento com potencial curativo para os pacientes com doador na família, em geral, mas também para pacientes sem doadores relacionados (SNYDER et al, 2006).

Por ser uma terapia com potencial curativo, os pacientes candidatos ao transplante devem ser submetidos antes de desenvolverem maiores riscos. A hora ideal para o transplante permanece indeterminada, porém os estudos sugerem que os melhores resultados são obtidos no início da doença (KERBAUY et al, 2006).

A talidomida também vem sendo usada como uma alternativa no tratamento da mielofibrose (BORGES, FRÖEHLICH, 2003, LICHTMAN et al, 2006). Seu exato mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas as hipóteses incluem uma diminuição dos níveis do TNF, a inibição da interleucina 12 e produção e co-estimulação de linfócitos CD8-18. Estudos mostram que a talidomida tem propriedades antiangiogênicas, provavelmente por bloquear a ação de potentes fatores angiogênicos como o FGF- β e o VEGF (BORGES, FRÖEHLICH, 2003).

Várias outras abordagens sugeridas para o tratamento da MP incluem o uso de inibidores da síntese de colágeno (inibidores da monoaminoxigenase e colchicina) e os análogos da vitamina D (1,25-dihidróxi-vitamina D e 1,25-dihidróxicolecalciferol). Diz-se que este

último diminui a proliferação dos megacariócitos e, presumivelmente, a conseqüente liberação dos fatores fibroproliferativos derivados de plaquetas e megacariócitos (BERK, 1993). Drogas inibidoras da proliferação do tecido colágeno estão sendo empregadas em caráter experimental (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996).

Devido aos grupos de estudo de tratamentos da mielofibrose serem pequenos, não é possível demonstrar vantagens na sobrevida em nenhum tipo de tratamento empregado (ÖZEN et al., 1997).

1.3. Imatinibe

O imatinibe (STI-571) comercializado como Glivec; Novartis – Suíça é quimicamente conhecido como 4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phenyl]benzamide metanesulfonate (Figura 6) e é um derivado de 2-fenilaminopirimidina designado inibidor tirosina quinase que atua nos receptores do PDGF β , c-kit e c-Abl, v-Abl, Bcr-Abl, receptor de fator estimulador de colônia de macrófago atingindo as suas vias de sinalização e se liga seletivamente ao sítio de ativação do ATP dessas kinases bloqueando suas atividades (DUDLEY et al., 2003; APPEL et al., 2005). Estudos farmacocinéticos revelam que o imatinibe tem o tempo de meia vida em 18,2 horas e sua dose oral diária em geral é de 400mg (APPEL et al., 2005).

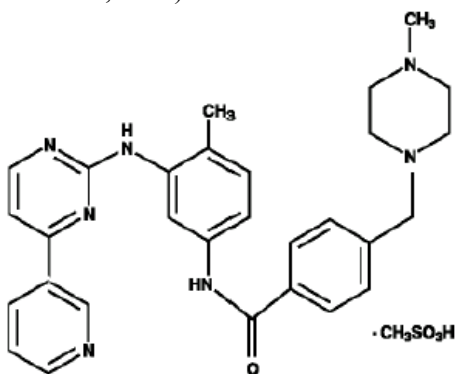


Figura 6. Fórmula química estrutural do imatinibe

Fonte: <http://pharmavision2000.com/prod/veenat.htm>

Inicialmente foi desenhado para o tratamento da LMC, com o mecanismo de ação de inibir a tirosina quinase quimera resultante da translocação do cromossoma 9,22, a proteína BCR-ABL, presente na

maioria dos casos desta doença (PEGGS, MACKINNIN, 2003; BEYER, DISTLER, DISTLER, 2010).

A MO de pacientes portadores de LMC, apresenta aumento de granulócitos e de megacariócitos, geralmente demonstrando fibrose (GILES et al., 2002). Desta forma a vascularização da medula também sofre alterações estruturais e quantitativas. Atualmente a medicação que oferece a melhor resposta para estes pacientes é o imatinibe. Nos últimos anos, houve um avanço nas pesquisas sobre a chave molecular das leucemias, como o sucesso do imatinibe, no tratamento da LMC. No entanto pouca atenção foi direcionada em torno do estroma medular que forma o MH, da mesma forma poucos são os estudos que avaliam a atuação deste fármaco nas interações célula-célula e célula-substrato (PEGGS, MACKINNIN, 2003).

Na clínica, imatinibe e desaimatinibe são usados na LMC para eventos genéticos de Ph(+) e BCR-ABL e, mostra que estes fármacos podem ser de grande impacto em outras doenças malignas aumentando a possibilidade de melhorar a clínica de pacientes com DMP (BEYER, DISTLER, DISTLER, 2010). Além da descoberta e sucesso terapêutico de imatinibe em LMC e DMP eosinofílica com rearranjos de PDGF-R, o imatinibe tem mostrado ser uma terapia contra kinases ativas associadas a malignidade (KUMAR et al., 2009).

Assim, mutações kinases tem em comum mecanismos patogênicos em DMP e o sucesso terapêutico de imatinibe como inibidor de tirosina kinase na LMC, pode representar que o uso desse fármaco pode ser alvo de terapias para essas desordens (VANUCCHI, GUGLIELMELLI, TEFFERI, 2009).

Rumpel et al., 2003, observaram que o imatinibe provoca resposta no estroma e vascularização medular, sugerindo uma resposta prévia à remissão leucêmica. Beham-Schmid e colaboradores (2002) também demonstraram uma regressão na fibrose medular após tratamento com imatinibe, sugerindo a possibilidade da expansão desse tratamento para doenças com fibrose da medula óssea por outras causas.

Jesus e Vituri (2008), demonstraram que pacientes LMC apresentavam um grau de fibrose elevado na primeira biópsia (59,09%); e que após o tratamento com imatinibe, grande parte (72,73%) teve suas amostras normais e a resposta citogenética apresentou um alto grau de correlação tanto com a fibrose como com a vascularização ($p < 0,05$), demonstrando que, quanto maior o grau de fibrose, e maior número de vasos, menor a possibilidade de a resposta citogenética ser alcançada.

Beyer e colaboradores (2010), demonstraram que o imatinibe em relevantes concentrações inibe a síntese de colágeno em 90% no tipo 1 a 1 e 1 a 2 e fibronectina-1 em pacientes com esclerose dermal. Previne ainda a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, reduz a síntese e acúmulo de matrix extracelular em pele lesionada e não só previne como reduz o desenvolvimento de fibrose em modelos experimentais de esclerose sistêmica.

1.4. Linhagem celular

A linhagem celular são células geneticamente idênticas, todas descendentes de uma única célula ancestral comum através de mitose em eucariotos. A linhagem celular proveniente da MO de camundongos - S17 do tipo fibroblásticas pode ser estudada para avaliar algumas patologias causadas pela disfunção produtiva e proliferativa do estroma medular e assim, verificar o efeito de fármacos como o imatinibe sobre essas células específicas, uma vez que os fibroblastos estão envolvidos em algumas doenças como LMC e mielofibrose. As células fibroblásticas S17 a microscopia se apresentam fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante (TAGAMI et al., 2003).

1.5. Ciclo celular

O ciclo celular é responsável por uma série de eventos que promovem o crescimento, proliferação e divisão celular. Eventos que preparam e realizam a divisão celular são os mecanismos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento promovendo que as células somáticas dupliquem o material genético e o distribuam igualmente para 2 células-filhas. Esse processo contínuo é dividido em 2 fases principais: INTÉRFASE e MITOSE (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

O ciclo celular é composto de 4 estágios. Na fase G1 (gap 1 = interfase), a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A replicação ocorre na fase S (síntese) e permite que a célula duplique seus cromossomos. Então inicia a fase G2 (gap 2), em que a célula prepara-se para a fase M (mitose) em que a célula-mãe, aumentada, divide-se ao meio, para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos. As células-filhas imediatamente entram em fase G1 e podem reiniciar o ciclo celular (Figura 7) (RIVOIRE, et al, 2001).

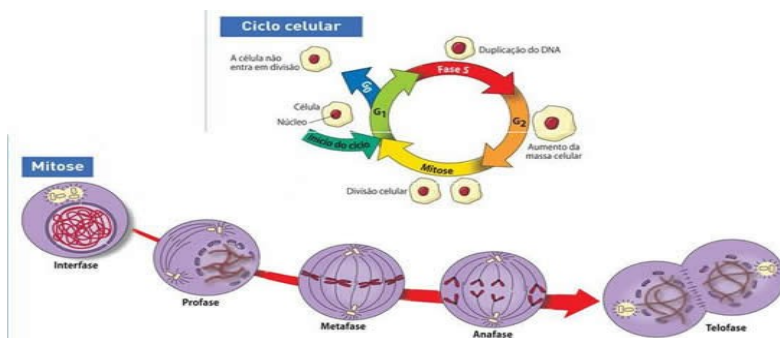


FIGURA 7. Ciclo Celular

S – síntese - intervalo de tempo em que ocorre a duplicação do DNA. G1- período que antecede S e G2 período que sucede o S. Mitose (M) – prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo6.php>

Nas fases G1 e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Existem sinais químicos que controlam o ciclo e provêm de fora/dentro da célula os sinais externos como os fatores de crescimento e hormônios. Estes são produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular. Existem os genes supressores tumorais, que detêm a replicação celular quando há dano no DNA e as interleucinas, dentre outras substâncias, que também afetam a replicação celular, entretanto seus mecanismos são obscuros. Outro mecanismo regulador é a apoptose, que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade da célula tornar-se alterada, podendo levar ao câncer. Fatores de crescimento liberados ligam-se a receptores de membrana das células alvo formando um complexo receptor-ligante que ativa produção de sinalizadores intracelulares que ativam a cascata de fosforilação intracelular, induzindo a expressão de genes específicos (ALMEIDA, et al, 2004; SCHWARTZ e SHAH, 2005).

O ciclo pode durar algumas horas (células com divisão rápida, ex: derme e mucosa intestinal) ou meses. Alguns tipos de células (neurônios e hemácias) não se dividem e permanecem paradas durante G1 e no estado de quiescência (fase G0). Outras entram em G0 e após dano

externo ao órgão voltam a G1 e continuam o ciclo celular (ex: células hepáticas) (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

Mutações no gene codificador da pRb provocam a permanência da divisão celular ativa e sucessiva gerando as neoplasias malignas. O ciclo celular é regulado para parar em pontos específicos onde são feitos reparos e proteínas endógenas, os quais funcionam como pontos de controle e garantem ocorrência adequada dos eventos relacionados ao ciclo. Existem 3 *checkpoints* onde ocorrem essa regulação (SCHWARTZ e SHAH, 2005):

- G1 antes da célula entrar na fase S: Atua ao término de G1 bloqueando a atividade quinase do complexo ciclinaE/Cdk2, causando parada no ciclo celular (SCHWARTZ e SHAH, 2005).
- G2 antes da célula entrar em mitose: Monitora ligação dos cromossomos aos microtúbulos no fuso mitótico, garante segregação idêntica do material genético entre células-filhas e preserva a integridade do genoma em nível cromossômico (SCHWARTZ e SHAH, 2005).
- *Checkpoint* do fuso mitótico: Célula diplóide inicia mitose com 46 cromossomos e o conteúdo de DNA de $4C$ e no final da mitose células-filhas devem ter 46 cromossomos e o conteúdo de DNA de $2C$ (SCHWARTZ e SHAH, 2005).
- Existem dois tipos de reguladores negativos no ciclo celular: **CKIs** (Inibidores de Cdk) são proteínas que interagem com Cdks, bloqueando sua atividade de quinase. Ex: p53, CKI p27 e o **complexo ubiquitina de degradação de proteína**: degrada ciclinas e outras proteínas para promover a progressão do ciclo celular (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

As células progridem no ciclo por mecanismos de regulação relacionados: crescimento, multiplicação, diferenciação celular e condição de latência. Falhas nos mecanismos regulatórios celulares pode causar: Apoptose (morte celular programada) e desenvolvimento tumoral. As células podem sofrer danos e morrerem, mas existem duas formas de morte celular:

- NECROSE
- MORTE CELULAR PROGRAMADA: Apoptose, Atrofia e Diferenciação (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

1.6. Apoptose

Descrita em 1972 e denominada morte programada da célula, é uma forma de morte celular destinada a eliminar células indesejáveis, do hospedeiro, através da ativação de uma série coordenada e programada de eventos executados por um conjunto exclusivo de produtos gênicos (JEGATHESAN et al., 2004).

O termo apoptose é derivado do grego *apóptosis*, que se refere à queda de folhas das árvores no outono, esse termo foi adotado pela primeira vez em na década de 70 por Kerr e colaboradores e só na década de 90 começou a ser mais profundamente estudado (PAROLIN e REASON, 2001).

A apoptose acontece durante o desenvolvimento, como mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos, como mecanismo de defesa, como nas reações imunes, quando as células são lesadas por uma doença (corpúsculos de Councilman) ou agentes nocivos (calor, radiação, hipóxica, drogas anti-neoplásicas citotóxicas) e no envelhecimento (SARASTEIA, PULKKIC, 2000).

Difere da necrose por não sofre autólise, a apoptose ocorre por fragmentação e seus fragmentos são endocitados por células vizinhas, sem o desencadeamento de quimiotaxia, nem ativação de células fagocitárias (SARASTEIA, PULKKIC, 2000)

A ativação de apoptose acontece por duas vias principais: a via intrínseca e a via extrínseca. A primeira é dependente da mitocôndria, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF), difosfato de adenosina (ADP) e proteínas de choque térmico. A segunda é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana plasmática como o Fas e o TNF. Em ambas as vias ocorrem ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (GESKE, GERSCHENSON, 2001).

A apoptose atinge as células individualmente, razão pela qual ela não é facilmente reconhecida nos exames microscópicos rotineiros. A células em apoptose se encolhem e o citoplasma fica denso, a cromatina se torna condensada e disposta em grumos juntos a carioteca. O núcleo se fragmenta ao mesmo tempo em que a membrana plasmática emite projeções e forma brotamentos que contem fragmentos do núcleo. O brotamento termina com a fragmentação da célula em múltiplos brotos, que passam a constituir os corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos ou células fagocitárias vizinhas, sem

desencadear uma resposta inflamatória (SARASTEA, PULKKIC, 2000).

A apoptose é uma morte celular freqüente em estados fisiológicos ou patológicos. Em estado fisiológico é um mecanismo importante de remodelação de órgãos durante a embriogênese e na vida pós-natal, participa do controle de proliferação e diferenciação celular, permitindo que as células sejam eliminadas em causar danos ao organismo depois de terem cumprido sua função. Em estados patológicos é desencadeada por agentes como vírus, substâncias químicas, agressão imunitária e radiação e apresenta papel crucial na patogenia de desordens como a Imunodeficiência adquirida (AIDS), doenças virais, isquemia, doenças autoimunes e neurodegenerativas, rejeição a transplantes de órgãos e medulas, disfunções medulares e resposta tumoral a quimioterapia e radioterapia (GESKE, GERSCHENSON, 2001).

Assim a detecção e quantificação da apoptose apresenta valor clínico significativo para diagnóstico e avaliação clínica de algumas patologias bem como na investigação da atividade de drogas anti-neoplásicas (GESKE, GERSCHENSON, 2001).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Verificar o efeito do imatinibe em células provenientes do estroma da medula óssea de camundongos em cultura primária e linhagem celular fibroblástica S17 sob estímulo do PDGF *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos:

- Verificar a viabilidade e/ou proliferação de células do estroma da medula óssea de camundongos com e sem o estímulo de PDGF cultivadas na presença de imatinibe.
- Avaliar a viabilidade e/ou proliferação de células hematopoiéticas sob estroma estimulado com PDGF na presença de imatinibe.
- Análise morfológica de células do estroma da medula óssea de camundongos com e sem o estímulo de PDGF cultivadas na presença de imatinibe.
- Verificar a viabilidade e/ou proliferação de linhagem celular fibroblástica S17 com e sem o estímulo de PDGF cultivadas na presença de imatinibe.
- Avaliar o potencial apoptótico do imatinibe sobre linhagem celular fibroblástica S17 com e sem o estímulo de PDGF.
- Avaliar os efeitos do imatinibe sobre o ciclo celular em linhagem fibroblástica S17 com e sem estímulo de PDGF.

3. Materiais e Metodologias

3.1. Obtenção de células da medula óssea – Cultura Primária

Para obtenção de células da medula óssea para cultura primária do estroma, doravante denominada de CP, e, de células hematopoiéticas, foram utilizados camundongos Swiss de dois meses de idade obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. O projeto para uso de camundongos na pesquisa com o mesilato de imatinibe foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) sob o número de protocolo PP00127 em 13 de agosto de 2007.

Após deslocamento cervical o fêmur dos animais foi retirado com auxílio de pinças e tesoura, tirando o máximo de pele e tecidos circundantes para que não contaminassem a amostra. Dentro do fluxo laminar, os fêmures foram dissecados com gazes e as epífises foram cortadas. A MO foi obtida através da lavagem da cavidade femural com o meio de cultivo celular, com auxílio de seringa e agulha e as células viáveis foram contadas em hemocítômetro.

3.2. Linhagem celular

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a S17 American Type Culture Collection (ATCC CR104), células fibroblásticas da MO de camundongo (S17), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e doadas pelo Prof. Dr. Marcio Álvares da Silva Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Santa Catarina.

As células S17 foram mantidas em nitrogênio líquido, as alíquotas, quando descongelada, foram mantidas em cultivo conforme orientação do ATCC e todos os experimentos foram realizados com células obtidas de no máximo 3 expansões.

3.3. Meio de cultura Iscove's Dubelco Modificado

Para o cultivo de CP foi utilizado o meio de cultura IMDM (Iscove's Dubelco's Modificado) (Sigma Aldrich – Alemanha) dissolvido em água de Mili-Q, contendo 5×10^{-7} M de hidrocortisona, 10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina (PS), 7,5% p/v de bicarbonato de sódio (Gibcco- Inglaterra) e 10% (v/v) de soro eqüino (SE), pH ajustado para 7,2 e esterilizado por filtração a

vácuo utilizando membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm de diâmetro. Para o cultivo de S17 foi utilizado o mesmo meio, apenas mudando soro para o 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) e sem adição de hidrocortisona.

Os meios preparados foram estocados em freezer -10°C e as alíquotas em uso permanecem sob refrigeração 4-8°C por até 5 dias.

3.4.Cultivo celular

Para as células da MO em cultivo primário e para as células S17 foram utilizadas as seguintes concentrações:

- 2×10^7 células para cultivo em garrafas de 25 cm²;
- 2×10^6 células para cultivo em placas de 24 poços
- $2,5 \times 10^5$ células para cultivo em placas de 6 poços;
- 2×10^5 células para cultivo em placas de 96 poços.

O cultivo foi mantido em estufa com 5% de Dióxido de carbono (CO₂) a 37°C.

Para CP, após 7 dias de cultivo a metade do meio foi retirado, suplementado-e com a mesma quantidade, sendo mantido por mais 7 dias para atingir a confluência das células aderentes. Após esse período foi realizada a remoção das células em suspensão (células hematopoiéticas) e a seguir a remoção das aderentes (células de estroma) com a adição 5 mL de Tripsina (0,25 % Gibcco-Inglaterra). Após a adição da tripsina as células aderentes foram mantidas em banho maria a 37°C por 15 minutos, posteriormente adicionou-se 1 mL de SFB para inativar a enzima e centrifugou-se por 10 minutos em 1.000 rpm e as células foram quantificadas em hemocítmetro (TESTA & MOLINEUX, 1993), ou avaliadas quanto a viabilidade por azul de tripan ou 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole (MTT). As células hematopoiéticas foram avaliadas apenas quanto a viabilidade por azul de tripan.

Para a células S17, o cultivo foi mantido até atingir a confluência por aproximadamente 7 dias. Após esse período foi realizada a remoção das células aderentes para realização dos experimentos e/ou expansão celular. A camada de células aderentes foi quantificada em hemocítmetro, avaliada por azul de tripan, MTT, laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE) e iodeto de propídio (IP) (ciclo celular).

3.5. Preparação do Imatinibe

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

Soluções estoques de 10 μM imatinibe foram preparadas a partir da trituração de um comprimido de 400 mg do princípio ativo dissolvido em 68 mL de solução de DMSO/ H₂O tipo Mili-Q (1:1), foram filtrados utilizando filtro com poros de 0,22 μm de diâmetro, alíquotados em eppendorf de 1 mL e congelados para posterior utilização. A concentração final de DMSO quando o imatinibe foi inserido nas culturas ficou em média entre 0,1% e 0,37%, portanto não exerceu efeito inibitório sobre o crescimento de células em estudo (BARTOLOVIC et al, 2004). No dia do tratamento com o fármaco, foram feitas diluições com o meio IMDM para se obter as diferentes concentrações testadas.

O efeito do imatinibe foi avaliado em concentrações de 2,5 a 50 μM .

3.6. Preparo do Fator de Crescimento derivado de plaquetas

O PDGF foi preparado conforme instruções da bula do fabricante (Sigma). Para verificar a concentração do PDGF que fornecesse a maior atividade foi realizado uma curva com 2, 4, 8 e 10 μL de PDGF e 2×10^6 células da CP.

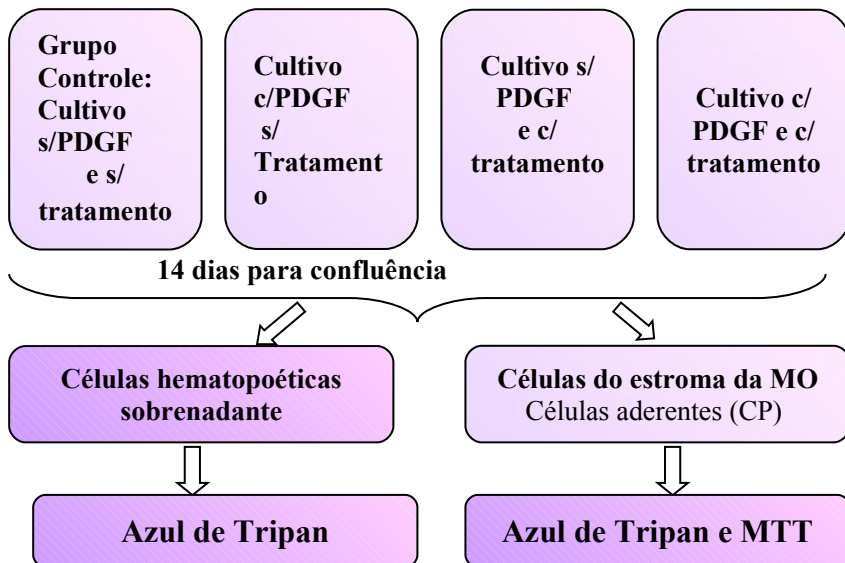
3.7. Quantificação das células viáveis

As células obtidas diretamente da MO e as células S17 foram avaliadas quanto a sua viabilidade pelo método de exclusão por meio do corante Azul de Tripán em hemocítômetro, utilizando a proporção 1:1 de suspensão células com o corante.

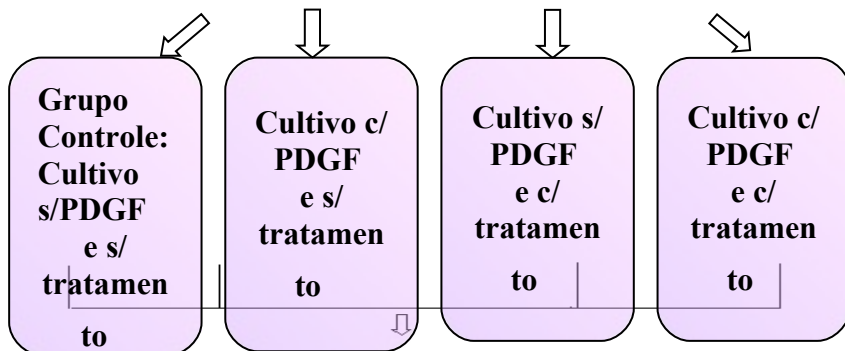
As células viáveis se mantinham incolores e redondas, já as inviáveis foram coradas de azul e perdiam a forma redonda ficando sem contorno definido.

3.8. Desenho experimental

1. Cultivo celular da MO



2. Cultivo da S17 - 7 dias para confluência



Azul de tripan

MTT

LA/BE

IP

3.9. Método 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole

Esta técnica realiza ensaios quantitativos para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica presente no ambiente biológico estudado (MOSMANN, 1983). Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana púrpura, produto formado pela redução do Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), no nosso caso as células da MO. Após a diluição com DMSO, a placa deve ser lida no aparelho Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) em 540 nm e os resultados analisados.

O procedimento utilizado foi uma placa de 96 poços com 10^5 células de MO ou S17/poço que foi dividida em branco (sem células, apenas com meio), grupo controle, células e meio, células com imatinibe 5, 7,5 e 10 μM e células com imatinibe 5, 7,5 e 10 μM e PDGF 10 μl . O MTT foi diluído 0,02 g em 20 ml de PBS estéril e esterilizados por filtração. Após foram aliquotados em Eppendorfs® esterilizados e congelados até o momento da utilização. A placa foi incubada em estufa de CO_2 durante 7 dias para S17 e 14 dias para CP. Após esse tempo o sobrenadante foi retirado, às células que permaneceram aderidas no fundo da placa foi adicionado 100 μl de meio novo e 10 μl de MTT sendo a placa incubada em estufa de CO_2 durante 4 horas. Após esse tempo o meio foi retirado juntamente com o MTT que não reagiu, permanecendo um precipitado roxo no fundo da placa, a seguir adicionou-se 100 μl de meio novo e 50 μl de DMSO.

Os resultados obtidos devem ser comparados ao grupo controle que representa 100% de viabilidade. Para a reprodução dos resultados e eficácia do método para o objetivo do trabalho as células suspensas foram retiradas e desprezadas sendo realizado o teste diretamente nas células aderidas na placa.

3.10. Fluorescência de LA/BE - Laranja de acridina/Brometo de etídio

Esta técnica foi utilizada para visualização de células apoptóticas. O laranja de acridina (LA) é permeável à membrana e o brometo de etídio (BE) é impermeável, nas concentrações de 10 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

As células S17 foram cultivadas em placas de 24 poços sob lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (Glasscyto®) por sete dias, e os poços divididos em grupo controle, células estimuladas pelo PDGF 10 µl, células tratadas com imatinibe em 7,5 e 5,0 µM e células tratadas com imatinibe 7,5 e 5,0 µM e com 10 µl de PDGF.

Após 7 dias, retirava-se as lamínulas das placas colocando-as sobre uma lâmina de microscopia. O reagente foi preparado no momento do experimento, homogenizando-se em partes iguais 10/10 µg/mL de LA/BE e aplicando-se sobre a lamínula do experimento. Incubou-se por 10 minutos no escuro e após esse tempo observava-se ao microscópio de fluorescência, sendo as células fotografadas.

3.11. Citometria de fluxo

Para realizar o protocolo experimental com as células S17 foi utilizado a solução de IP com RNASE (Immunostep, Salamanca, Espanha). Essa técnica consiste na coloração dos ácidos nucléicos com IP, após a digestão do RNA.

O IP emite diferentes intensidades de fluorescência dependentes da fase do ciclo celular 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 25 cm² e incubadas durante 7 dias.

Após esse período, as células foram tripsinizadas, sendo as suspensões com 10⁶cel/mL com 2 mL 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 uma vez contendo SBF.

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 1500 rpm durante 10 minutos.

Adicionou-se ao *pellet* celular 500 µL de solução de IP contendo RNase. A suspensão permaneceu 15 minutos em temperatura ambiente antes da análise no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) através do programa 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 obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

Esta metodologia teve apoio da Dra Profa. Maria Cláudia Santos da Silva do Centro de Ciências da Saúde Departamento de Análises Clínicas Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias do Hospital Universitário de Florianópolis.

3.12. Análise Estatística dos dados obtidos

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 PASW Statistics (*SPSS*) 18.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Viabilidade celular da Cultura Primária pelo Azul de tripan

A CP foi incubada por 14 dias com e sem PDGF em variadas concentrações de imatinibe. O método de azul de tripan mostrou que nas concentrações de 100 e 50 μM de imatinibe não houve crescimento celular (0% de viabilidade) e nas concentrações de 1,0, 2,5, 5, 7,5, 10 e 20 μM de imatinibe (Figura 8-A) houve e 100, 91, 70, 70, 65 e 35% de viabilidade celular respectivamente. Com o estímulo de PGDF (Figura 8-B) houve 160, 120, 75, 65, 57 e 43% de viabilidade celular respectivamente. A IC50 se encontra entre 7,5 e 10 μM .

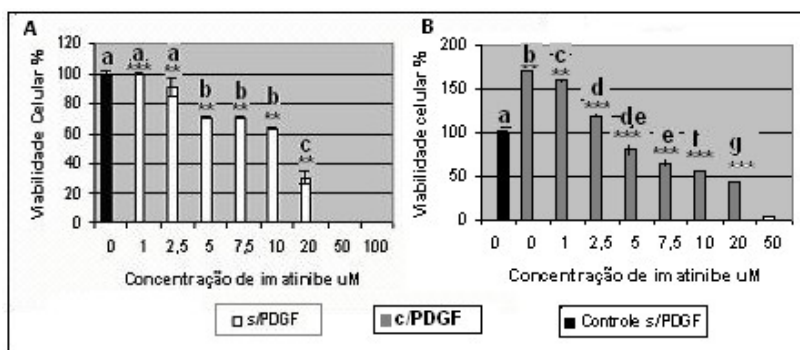


FIGURA 8. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em Cultura Primária coradas pelo azul de tripan.

2×10^6 células em placas de 24 poços foram cultivadas por 14 dias. O grupo controle corresponde a 100% de viabilidade celular (Cultivo sem Fator de crescimento derivado de plaquetas e sem tratamento). Cada ponto representa a média \pm 1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$ 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 ($p > 0,05$).

4.2. Viabilidade celular da cultura primária por MTT:

As CP foram incubadas por 14 dias com e sem PDGF em variadas concentrações de imatinibe. O método do MTT mostrou que na concentração de 50 μM de imatinibe não houve crescimento celular (0%

de viabilidade) e nas concentrações de 5, 7,5, 10 e 20 μM de imatinibe (Figura 9-A) houve 75, 73, 63 e 33% de viabilidade celular respectivamente. Com o estímulo de PDGF (Figura 9-B) houve 70, 62, 55 e 5 % de viabilidade celular respectivamente.

Observa-se que o PDGF proporcionou um evidente estímulo no crescimento celular (Figura 9-B) com 160% de viabilidade celular em relação ao controle (sem PDGF), e que a diminuição da viabilidade ocasionada pelo imatinibe nas CPs estimuladas (Figura 9-B) foi significativamente mais acentuada do que nas CPs sem estímulo (Figura 9-A). A IC50 se encontra entre 7,5 e 10 μM .

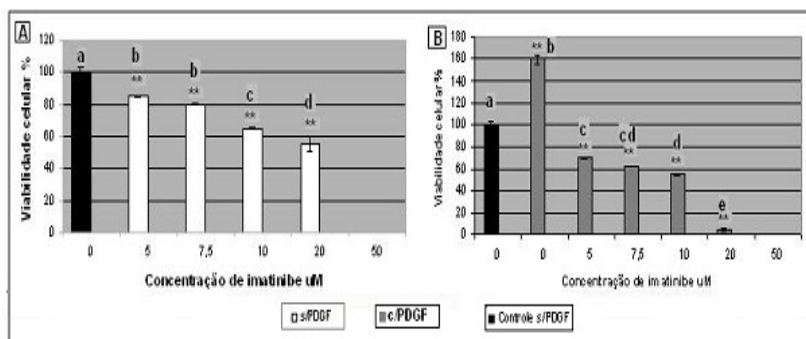


FIGURA 9. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em cultura primária com MTT.

2×10^5 células em placas de 96 poços foram cultivadas por 14 dias. O grupo controle corresponde a 100% de viabilidade celular (Cultivo sem fator de crescimento derivado de plaquetas e sem tratamento). Cada ponto representa a média \pm 1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,01$ 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 ($p > 0,05$).

4.3. Viabilidade celular das células hematopoiéticas pelo Azul de Tripán

Nas culturas primárias de MO, incubadas por 14 dias com e sem PDGF em variadas concentrações de imatinibe, formou-se um tapete ao fundo da placa constituído por células aderentes (células do estroma, CP), enquanto que as células hematopoéticas cresceram sobre as mesmas no sobrenadante da cultura. As células hematopoéticas foram

retiradas junto com o sobrenadante e avaliadas quanto à viabilidade celular com azul de tripan. O fármaco foi utilizado nas concentrações de 1, 2,5, 5,0 7,5, 10, 15 e 20 μM . Os resultados sem PDGF (Figura 10-A) foram 95, 78, 63, 56, 44, 19 e 0% de viabilidade celular respectivamente e com 10 μL de PDGF (Figura 10-B) foram 120, 70, 54, 44, 30, 7 e 0% de viabilidade celular respectivamente.

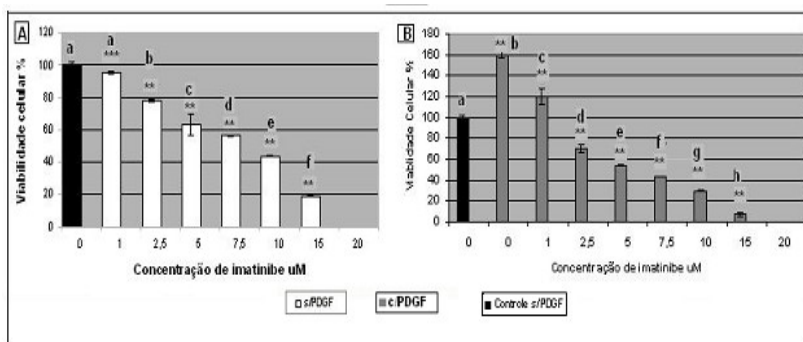


FIGURA 10. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular das células hematopoéticas azul de tripan.

Foram cultivadas 2×10^6 células em placas de 24 poços por 14 dias. O grupo controle corresponde a 100% de viabilidade celular (Cultivo sem fator de crescimento derivado de plaquetas e sem tratamento). Cada ponto representa a média \pm 1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$ 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 ($p > 0,05$).

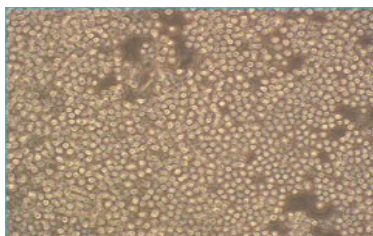


FIGURA 11. Morfologia das células hematopoéticas com fator de crescimento derivado de plaquetas.

4.4. Análise microscópica das células aderentes nas Culturas Primárias

As características morfológicas das células aderentes nas CP cultivadas por 14 dias estão apresentadas na Figura 12. Observou-se que nas células aderentes das CP do grupo controle (Figura 12-A) há uma predominância de fibroblastos alongados e em forma de fibras. Já na cultura das CPs estimuladas com PDGF(12-B) há uma predominância de fibroblastos mas em quantidade bem aumentada em relação ao grupo controle. Nas culturas tratadas com imatinibe a 10 μM (Figura 12-C) o número de fibroblastos diminuiu começando a sobressair células redondas e com núcleos menores. Nas culturas estimuladas e tratadas com 10 μM de imatinibe o número de fibroblastos diminuiu acentuadamente predominando as células redondas sugestivas de macrófagos (Figura 12-D).

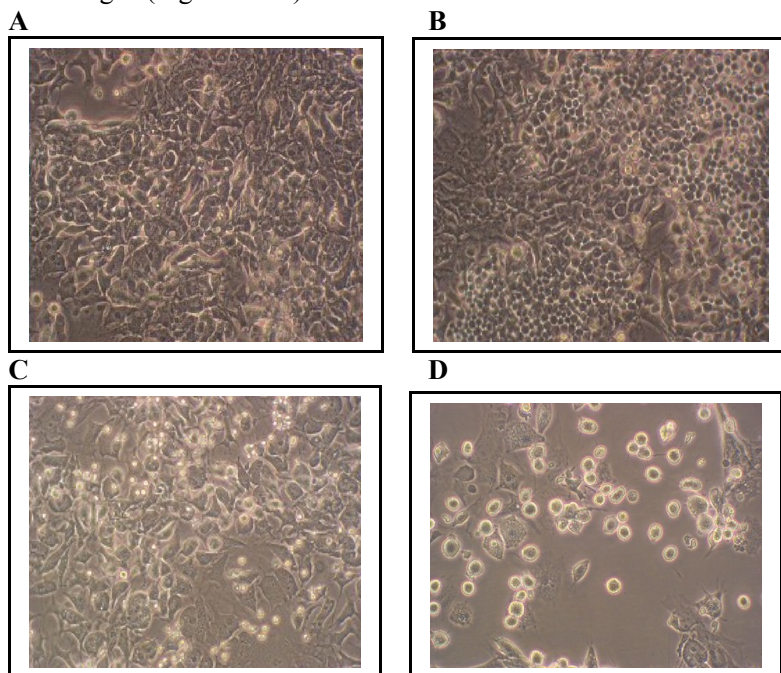


FIGURA 12. Morfologia das Cultura de Cultura primária no microscópio invertido

(A) Cultura primária s/ estímulo e s/ imatinibe (grupo controle). (B) Cultura primária c/ fator de crescimento derivado de plaquetas (C) Cultura primária c/ imatinibe na dosagem 10 μM (D) Cultura primária c/ fator de crescimento derivado de plaquetas e c/ imatinibe na dosagem 10 μM .

4.5. Viabilidade Celular das células S17 pelo Azul de Tripan:

As células S17 foram incubadas por 7 dias com e sem PDGF em variadas concentrações de imatinibe. O método de azul de tripan mostrou que nas concentrações de 100, 50 e 20 μM de imatinibe não houve crescimento celular (0% de viabilidade) e nas concentrações de 1, 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 15 μM de imatinibe houve 100, 70, 69, 55, 33 e 28% de viabilidade celular respectivamente (Figura 13-A) e com o estímulo de PDGF (Figura 13-B) houve 98, 62, 59, 48, 30 e 23% de viabilidade celular respectivamente. Houve um crescimento de 120% de células S17 sem imatinibe em relação ao controle. A IC50 se encontra em torno de 7,5 μM .

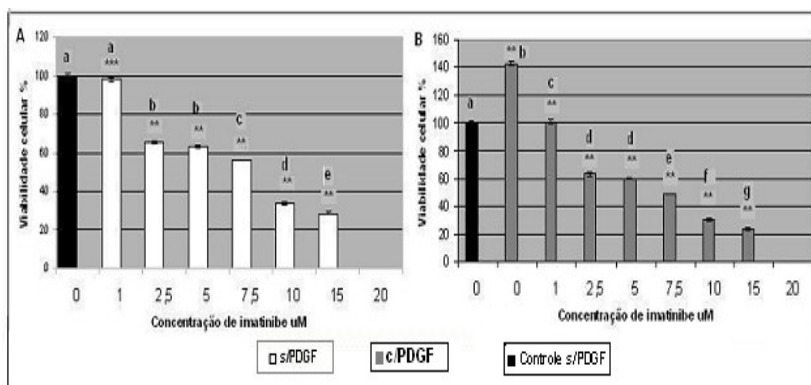


FIGURA 13. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em células S17 pelo método Azul de Tripan.

Foram cultivadas 2×10^6 células em placas de 24 poços por 7 dias. O grupo controle corresponde a 100% de viabilidade celular (Cultivo sem fator de crescimento derivado de plaquetas e sem tratamento). Cada ponto representa a média \pm 1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,01$ 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 ($p > 0,05$).

4.6. Viabilidade Celular das células S17 pelo método do MTT:

As células S17 foram incubadas por 7 dias com e sem PDGF em variadas concentrações de imatinibe. A viabilidade celular pelo MTT mostrou na concentração de 50 e 20 μM não houve crescimento celular (0 % de viabilidade) e nas concentrações de 5, 7,5 e 10 μM houve 74, 56 e 36% de viabilidade respectivamente (Figura 14-A) e com o estímulo de PDGF (Figura 14-B) houve 69, 52 e 30% de viabilidade respectivamente.

Observa-se que o PDGF proporcionou um evidente estímulo no crescimento celular (Figura 14-B), e que a diminuição da viabilidade ocasionada pelo imatinibe nas células S17 estimuladas foi significativamente mais acentuada do que nas células S17 sem estímulo.

O fator de crescimento parece interagir com o fármaco provocando diminuindo a viabilidade celular em relação as células sem esse estímulo.

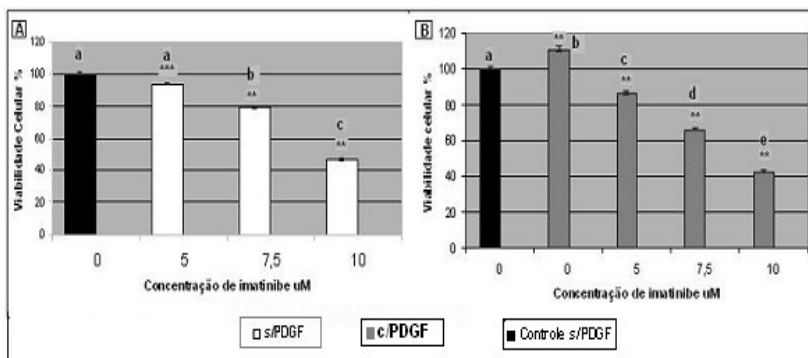


FIGURA 14. Efeito do imatinibe sobre a viabilidade celular em células S17 pelo método do MTT.

Foram cultivadas 2×10^6 células em placas de 24 poços por 7 dias. O grupo controle corresponde a 100% de viabilidade celular (Cultivo sem PDGF e sem tratamento). Cada ponto representa a média \pm 1 E.P.M. obtida de pelo menos 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições em triplicata. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,01$ 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 ($p > 0,05$).

4.7. Cálculo da IC 50

Na Figura 15 foi demonstrado a curva de viabilidade celular para todas as células e condições de experimento que serviram de base para o cálculo de IC50 (concentração de fármaco que induz 50% de inibição celular). Foi calculada a IC 50 para a CP e células S17 com e sem PDGF, através da melhor reta e sua equação para cada tipo celular com e sem PDGF para fins de comparação apresentados na Figura 15. Para a CP sem PDGF encontramos a IC 50 de 14,21 μM , com PDGF 13,51 μM e para a S17 encontramos a IC 50 de 9,15 μM sem PDGF e 8,80 μM com PDGF. A IC50 serviu como parâmetro para escolha das concentrações do fármaco para os experimentos posteriores, apoptose e ciclo celular. Essas concentrações foram úteis para garantir que havia atividade expressiva de imatinibe e também células viáveis.

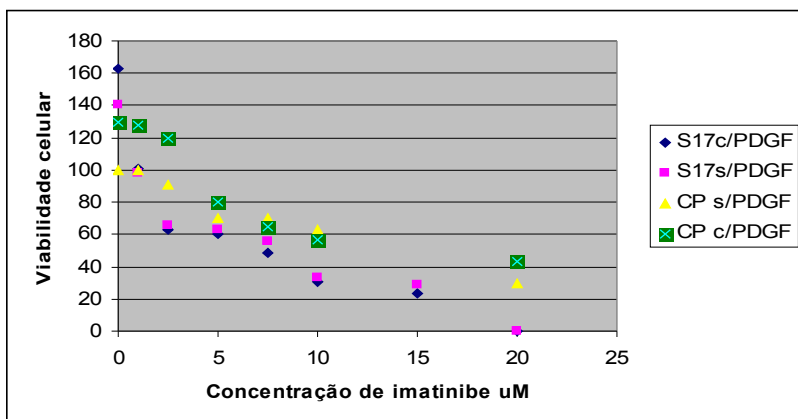


FIGURA 15. A viabilidade celular em função da concentração de imatinibe.

Foram colocadas no gráfico as médias dos resultados das culturas primárias e células S17.

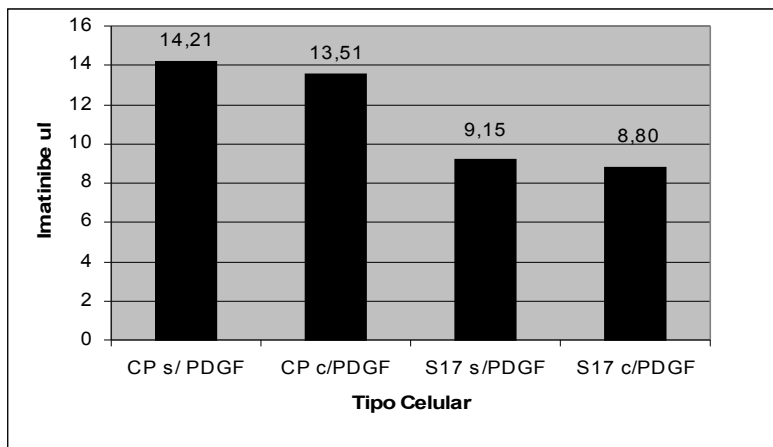


FIGURA 16. Concentração de Fármaco que induz 50% de inibição celular (Concentração de Fármaco que induz 50% de inibição celular) para as Culturas primárias e células S17 com e sem Fator de crescimento derivados de plaquetas.

4.8. Viabilidade Celular das células S17 pela técnica de Fluorescência

O brometo de etídio é utilizado para corar as células mortas e a laranja de acridina intercala-se ao DNA conferindo aparência verde ao núcleo celular atravessando membranas intactas e, portanto corando as células vivas. Já as células com membranas instáveis, ou seja, células não viáveis o BE intercala-se ao DNA corando-o de laranja e ligando-se fracamente ao RNA corando-o de vermelho, assim as células mortas irão apresentar uma fluorescência vermelha, enquanto as células viáveis irão apresentar uma fluorescência verde (TAKAHASHI et al, 2004). Foram cultivadas células S17 por 7 dias com e sem estímulo de PDGF nas concentrações 5,0 μM e 7,5 μM de imatinibe. Observa-se na Figura 17 que o PDGF proporcionou um evidente estímulo no crescimento celular (Figura 17-B) em relação ao grupo controle (Figura 17-A), e, que a diminuição da viabilidade ocasionada pelo imatinibe nas células S17 estimuladas (Figura 17-D e F) foi mais acentuada do que nas células S17 sem estímulo (Figura 17- C e E) e que em 7,5 μM surgiram sinais de apoptose (Figura 17- E e F). Efeitos mais pronunciados sob estímulo do PDGF foram também observados nos outros experimentos.

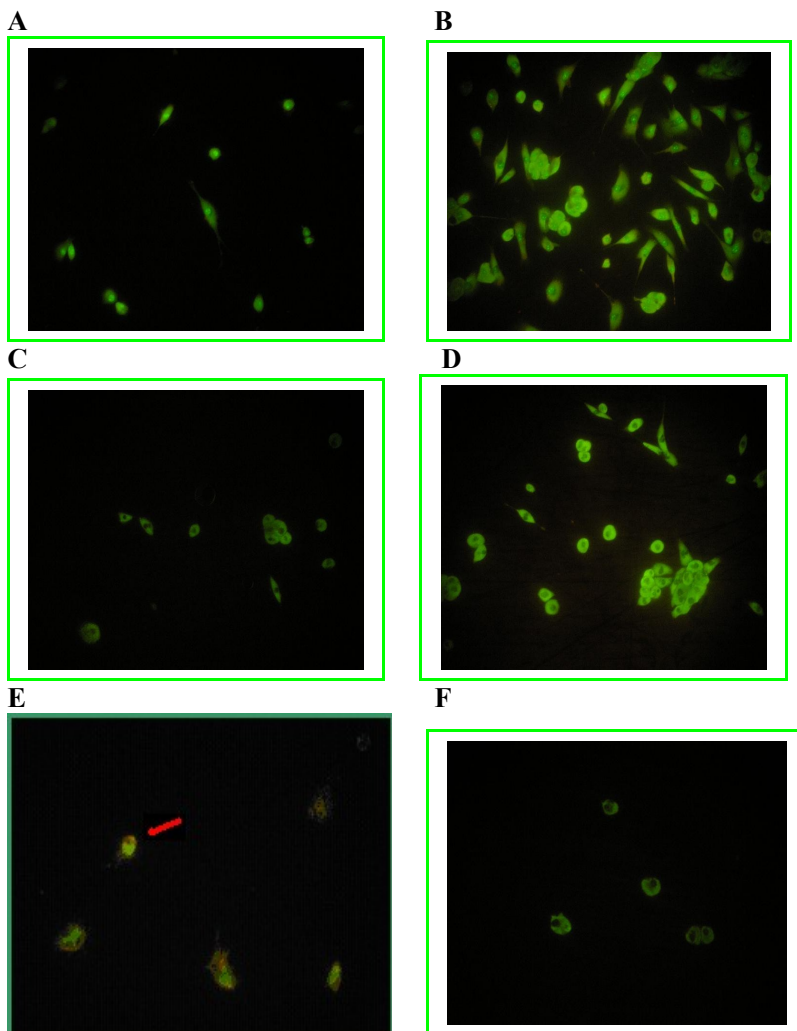


FIGURA 17. Análise citomorfológica das células S17 fibroblásticas de camundongo.

(A) Células controle – crescimento de fibroblastos. (B) Células com estímulo do fator de crescimento derivado de plaquetas – crescimento acentuado de fibroblastos (C) Células sob ação do imatinibe 5,0 μM – Diminuição da quantidade celular. (D) Células sob ação do imatinibe 5,0 μM e com estímulo de fator de crescimento derivado de plaquetas – Diminuição da quantidade celular fibroblástica. (E) Células sob ação do imatinibe na 7,5 μM – Diminuição celular e células em apoptose. (F) Células sob ação do imatinibe na 7,5 μM e

sob estímulo de fator de crescimento derivado de plaquetas – Diminuição celular acentuada com células em apoptose.

4.9. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

O ciclo celular controla a reprodução celular em 4 fases. A síntese de DNA ocorre na fase S e a mitose na fase M nos períodos G1 e G2. Foram cultivadas células S17 por 7 dias sob estímulo de PDGF e 7,5 μM de imatinibe. A Figura 18 abaixo é representada pelos histogramas das células conforme fluorescência detectada (FL2-Área) e número de eventos; e pelas respectivas médias em cada fase do ciclo.

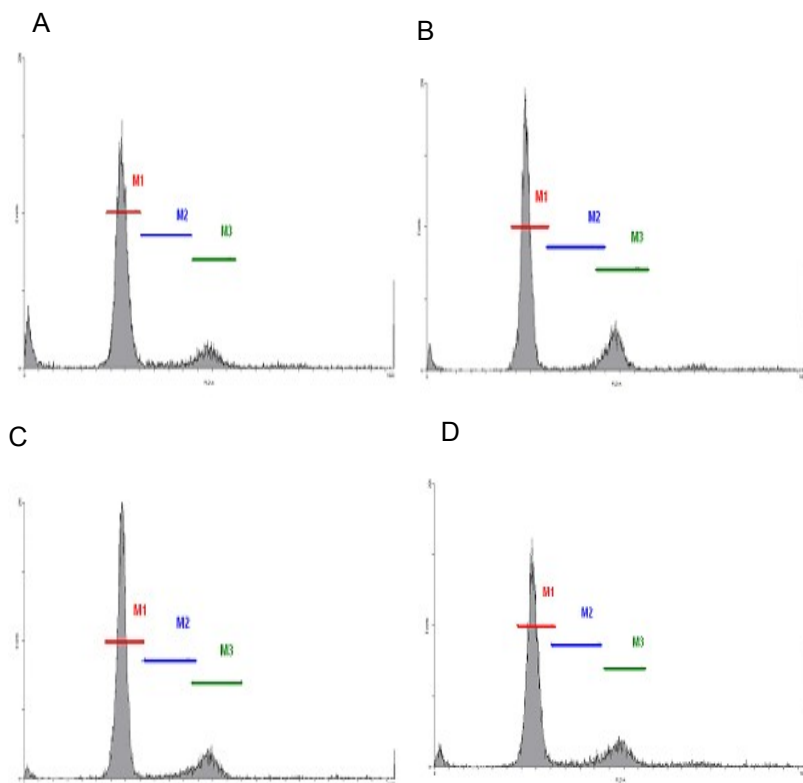


FIGURA 18. Histogramas formados pela citometria de fluxo - células S17.

A – Controle

M1 ---

B – Imatinibe

M2 ---

C – Imatinibe + PDGF

M3 ---

D – PDGF

TABELA 5. Efeito do Imatinibe sobre as fases do ciclo celular - células S17.

	G0/G1- M1	S - M2	G2/M -M3
	(%)	(%)	(%)
Controle	81.1	6.0	12.9
Imatinibe 7,5 µM	75.	4.2	20.2
Imatinibe 7,5 µM	80.3	5.3	14.4
+ PDGF			
PDGF	76.7	6.5	16.8

M1, M2, M3 representam as fases G0/G1, S, G2/M, respectivamente, cujas médias das células em percentual (%) em cada fase do ciclo celular estão dispostas nos histogramas. As células S17 controle (A) com 81% de células na fase G0/G1, na presença do imatinibe na IC50 (B) com 75,6% de células na fase G0/G1 e 20% de células na fase G2/M, as células com estímulo de fator de crescimento derivado de plaquetas e ação do imatinibe na IC50 (C) com uma maior porcentagem de células bloqueadas 80,3% na fase G0/G1 e as células sob estímulo do fator de crescimento derivado de plaquetas com 76,7% de células bloqueadas na fase G0/G1 e com a maior porcentagem de células na fase S/M2 6,5% que corresponde a fase de mitose.

5. Discussão:

A mielofibrose é uma doença que afeta severamente a medula óssea, impedindo o seu funcionamento normal. O crescimento exacerbado de células fibroblásticas na medula óssea impede o crescimento e desenvolvimento das células hematopoéticas que irão para a corrente sanguínea. Isso provoca um organismo debilitado, incapaz de combater as infecções e as hemorragias que podem aparecer no doente com mielofibrose (KUMAR et al., 2009).

Atualmente o tratamento para essa doença é obscuro e ineficaz. Com isso, o uso de fármacos novos ou já existentes no mercado pode ser uma alternativa para combater a morbidade e mortalidade por MP (KUMAR et al., 2009).

O imatinibe é um agente quimioterápico eficiente, principalmente quando principalmente empregado no tratamento de LMC e alguns outros tipos de tumores. Entretanto, assim como a maioria dos agentes quimioterápicos conhecidos, o imatinibe lesa tanto as células cancerosas como as normais, atuando de forma não específica. O imatinibe tem mostrado afetar severamente células estromais *in vitro*. Além desse problema, o uso prolongado destes agentes quimioterápicos sugere a formação de tumores resistentes (APPEL et al., 2005).

Beham-Schmid e colaboradores (2002), analisaram morfológicamente e morfometricamente a MO de pacientes com LMC após uso do imatinibe e verificaram que houve regressão na fibrose medular em poucos meses após tratamento com imatinibe, sugerindo a possibilidade da expansão desse tratamento para doenças com fibrose da medula óssea por outras causas. Rumpel e colaboradores (2003), estudaram a densidade dos vasos sanguíneos que podem alimentar tumores malignos em pacientes com LMC, e verificaram que os vasos estão aumentados nesses pacientes e que, com o uso do imatinibe, esta a densidade foi diminuindo progressivamente. Assim o imatinibe pode provocar uma resposta no estroma e na vascularização medular e, diante dessas observações a respeito do efeito do imatinibe em células BCR-ABL negativas, a utilização do imatinibe foi expandida para outras patologias além da LMC.

Appel e colaboradores (2005), referem que o tratamento de pacientes com imatinibe tem se mostrado promissor em GIST causada por mutações em c-kit e DMPs com mutações em genes PDGF-R β e JESUS e Vituri (2008), em estudos com imatinibe em pacientes com

LMC demonstraram a regressão da fibrose medular trazendo esperanças da utilização do fármaco para a mielofibrose.

A cultura de células fora do organismo consiste em manter as características iguais ou semelhantes às que ocorrem *in vivo* permitindo o uso de ensaios experimentais que analisem o funcionamento das células envolvidas em patologias e a ação de fármaco sobre as mesmas. A necessidade de se fazer culturas *in vitro* é descobrir e entender o funcionamento normal e como as patologias surgem, progridem e regredem em um determinado sistema. O estabelecimento de clones de células estromais tem ganhado importância no entendimento da função do microambiente medular e o complexo celular de estroma e células hematopoéticas em novos modelos que permitem entender a relação entre esses dois tipos celulares (HUBIN et al., 2005).

Neste trabalho, as culturas de medula óssea de camundongo realizadas foram estimuladas pelo PDGF a promover uma proliferação exacerbada de fibroblastos, como acontece na mielofibrose. O imatinibe foi adicionado para verificar a sua ação sobre as células normais e células fibroblásticas estimuladas.

Fibroblastos provenientes da medula óssea de camundongos em cultivo celular por 14 dias, quando estimulados pelo PDGF na concentração de 10 ng/mL, aumentaram em 3,6 vezes o número de células em relação à cultura sem estímulo. Buchdunger e colaboradores (2000), utilizaram também 10 ng/mL de PDGF em estudo de viabilidade celular de células mielóides de murino. Este modelo *in vitro* proporcionou estudos de efeito do imatinibe sobre o crescimento/viabilidade em células super estimuladas pelo PDGF, como acontece na mielofibrose.

Neste estudo o efeito de imatinibe nas CP avaliadas pelo método de azul de tripan nas concentrações 1,0, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 50 e 100 μM com e sem estímulo de PDGF (Figura 8-A e B) mostram que a diminuição da viabilidade foi significativa a partir de 2,5 μM em relação ao controle sem PDGF ($p < 0,01$) e 1,0 μM com PDGF ($p < 0,001$). A partir de 5 μM o grau de significância foi ainda maior ($p < 0,001$) sem PDGF e em 100 μM e 50 μM não houve crescimento celular em ambos. Tais resultados foram confirmados no método de MTT (Figura 9-A e B). Em ambos os ensaios de azul de tripan e MTT a CP quando estimuladas apresentavam diferença estatística mais acentuada em relação ao controle do que a CP sem estímulo.

Os resultados obtidos concretizam que a concentração de 50 μM para a cultura de MO de camundongo é a concentração que provoca

morte total das células, o imatinibe mesmo em baixas concentrações, afeta o estroma medular, e, que o controle sem estímulo possui um número de células viáveis menor que a cultura estimulada pelo PDGF confirmando que o fator de crescimento realmente age como um potente estímulo para células estromais.

Melzer e colaboradores (2004), em estudo com células estromais da medula mostraram que o imatinibe em concentrações de 1 a 10 μM podem afetar severamente as células do estroma medular *in vitro*.

Rumpel e colaboradores (2003), estudaram a vascularização de pacientes com LMC tratados com imatinibe, verificando que o fármaco normaliza a vascularização na medula óssea em pacientes em fase crônica. Beham-Schmid e colaboradores (2002), estudaram a ação do imatinibe sobre a redução da fibrose reticulina na medula óssea e verificaram a redução da fibrose durante o tratamento com o fármaco. Jesus e Vituri (2008), trabalharam com pacientes portadores de LMC, os quais desenvolvem alterações significativas no estroma medular, mielofibrose secundária e após tratamento com imatinibe, os pacientes apresentaram regressão da fibrose da medula óssea. Estes estudos enfatizam os resultados iniciais apresentados em que, após tratamento com imatinibe, há uma regressão na fibrose medular, além da resposta arquitetural do estroma e da vascularização de pacientes com DMP.

Esses dados podem ser relevantes para a administração do imatinibe em situações com grande aumento da renovação das células do estroma medular, tais como regeneração após intensa quimioterapia e radioterapia (MELZER et al., 2004).

O PDGF tem se mostrado efetivo *in vivo* em células hematopoiéticas e progenitores celulares e a mielossupressão do imatinibe ocorre em resposta ao tratamento contra clones malignos e supressão da expansão dessas células na MO (APPEL et al., 2005). Assim, o imatinibe, sendo utilizado em patologias em que o PDGF é responsável pela super estimulação das células, pode atuar realmente modificando o estroma medular.

Appel e colaboradores (2005), em estudos de inibição e efeito antiproliferativo do imatinibe em diferentes células da hematopoiese normal, exceto as células tronco imaturas, revelaram que o efeito provocado pelo imatinibe parece estar relacionado com o estado proliferativo das células, e os resultados são relevantes, considerando-se a toxicidade a longo prazo. Pacientes com GIST tratados com imatinibe durante 9 meses desenvolveram 7% neutropenia (5% eram dos graus 4 e 5) e 9% desenvolveram anemia (2% dos graus 4 e 5) suportando a

suposição que os efeitos hematológicos do fármaco são parcialmente explicados pela inibição da hematopoiese normal.

Os estudos acima estão de acordo com os resultados da análise das células hematopoéticas (Figura 9-A), que revelou que, com o aumento da concentração do medicamento, houve um decréscimo da quantidade de células hematopoéticas com diferença significativa a partir de 2,5 μM do imatinibe ($p < 0,001$), mostrando que o fármaco realmente pode interferir no estroma medular que sustenta e alimenta as células hematopoéticas, podendo atuar indiretamente ou diretamente nas células hematopoéticas.

Com o emprego de imatinibe e estímulo de PDGF (Figura 9-B), pode-se notar um decréscimo na viabilidade das células hematopoéticas com diferença significativa a partir de 1 μM , ($p < 0,001$). Provavelmente, o medicamento se liga nos receptores de PDGF interferindo mais agressivamente com a presença da citocina. Assim, nas doenças em que a citocina provoca super estimulação das células, o medicamento modificará e prejudicará mais agressivamente o estroma medular e as células hematopoéticas que o normal. A observação do efeito antiproliferativo de imatinibe em células hematopoéticas Bcr-Abl- é uma explicação ao sucesso recente terapêutico do imatinibe em pacientes com DMP (APPEL et al., 2005).

Com esses resultados, o efeito do imatinibe em algumas doenças pode ser prejudicial ao estroma medular e para a hematopoiese, mas em DMP em que há exacerbação de células do estroma como os fibroblastos, os benefícios de diminuir ou bloquear intensa fibrose pode ser maiores do que os efeitos maléficos sobre o estroma normal.

Na análise microscópica das CP (Figura 11), observamos a confluência das células com estímulo e sem estímulo de PDGF (Figura 11-B e 11-A), verificando a diversidade de formas celulares e que, quando a cultura é estimulada pelo PDGF, ocorre realmente a exacerbação no crescimento das células. O imatinibe agride progressivamente o estroma medular de maneira dose-dependente, evidenciado principalmente pela diminuição das células fibroblásticas (Figura 11-C); que são caracterizadas, segundo Tagami e colaboradores (2003), como células fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante. Conforme estudos e experimentos da tese de Soares e Vituri (2009), utilizaram o imatinibe sobre células da medula óssea de camundongo e, verificou a morte de fibroblastos e manutenção de células redondas supostamente os macrófagos que não são

severamente afetados pelo imatinibe; Nesse trabalho podemos notar a presença de células redondas, enquanto há grande diminuição de fibroblastos, inversamente proporcional ao aumento do imatinibe (Figura 11-D).

Verificando-se que as células aderentes, mais especificamente os fibroblastos, foram agressivamente atingidos pela ação do fármaco, e que a cultura, quando estimulada pelo PDGF, induzia o crescimento exacerbado de fibroblastos e diminuía as células vivas em número em relação ao controle sem o estímulo, foi proposto o uso da linhagem celular fibroblástica obtidas da medula óssea de camundongo, as células S17. Assim, a ação do fármaco foi analisada diretamente sobre essas células, uma vez que na mielofibrose o crescimento exacerbado e descontrolado dessas células é a causa de todos os sinais e sintomas da doença já apresentados no trabalho.

O experimento realizado com o método de azul de tripan em células S17 normais e sob o estímulo de PDGF- β *in vitro*, com e sem o efeito do imatinibe (Figura 12), mostram que a proliferação celular diminuiu com o aumento da ação do fármaco (Figura 12-A), com diferença significativa a partir de 2,5 μM ($p < 0,001$) sem estímulo e 1 μM ($p < 0,001$) nas células S17 com estímulo.

O método do MTT (Figura 13) foi realizado para confirmar os resultados obtidos nos ensaios de azul de tripan. Ambos os métodos mostraram que houve inibição celular com o aumento de imatinibe, e que o controle sem estímulo possui uma viabilidade celular menor que as células estimuladas pelo PDGF, confirmando que o fator de crescimento age como estímulo para o crescimento celular dessas células.

Distler e colaboradores (2007), utilizaram imatinibe em cultura de fibroblastos obtidas de biópsias de pele de pacientes com esclerose sistêmica. Obtiveram como resposta: efeitos colaterais baixos, diminuição do acúmulo de fibroblastos ou das proteínas da matriz extracelular, prevenção da progressão da fibrose e diminuição da morbidade. Todos esses efeitos confirmam os nossos resultados, a partir dos quais pode-se sugerir provavelmente que o imatinibe age diretamente sobre as células fibroblásticas.

Beyer e colaboradores (2010), em estudos de modelos experimentais de esclerose sistêmica encontraram que o imatinibe não só previne o desenvolvimento de fibrose, mas também reduz a estabilidade da fibrose. Além disso, o fármaco exerce potente efeito anti-fibrótico em modelos experimentais de fibrose de pulmão, rim e

fígado. Há casos que o tratamento do imatinibe podem provocar a regressão da fibrose medular.

HELDIN (2004), comenta que o PDGF é uma molécula dímera feita de um sistema de PDGF e receptor de PDGF que ativa tirosina quinase pela indução durante a ligação do receptor dímero e autofosforilação, e pode haver uma resposta mais efetiva aos resultados com imatinibe e com a presença do PDGF do que sem o estímulo. Os resultados encontrados nesse trabalho realizado de viabilidade celular menor para as células sem PDGF, demonstram que o estímulo age aumentando o efeito do imatinibe.

Dudley e colaboradores (2003) estudaram o efeito do PDGFBB, inibidor de tirosina quinase que atua nos receptores do PDGF β , c-kit e Proteína com função tirosino-quinase (c-Abl) atingindo as suas vias de sinalização. Durante o recrutamento de células musculares lisas da aorta na angiogênese em ratos sob efeito do imatinibe, verificaram que o imatinibe inibe o PDGFBB *in vitro*, provocado pela anti-proliferação e anti-migração das células musculares lisas. Assim, o fator de crescimento parece interagir com este fármaco, provocando um maior número de morte celular do que as células sem esse estímulo, e que o imatinibe atua sobre a linhagem celular fibroblástica S17, aumentando o potencial para maiores investigações em doenças como a mielofibrose primária, bem como em outras patologias que tem por base a disfunção dessas células.

Foi calculada a IC50 com os resultados dos experimentos para a escolha das concentrações do fármaco a serem empregadas nos experimentos mais refinados de apoptose e ciclo celular (Figura 14). Para a apoptose, foi utilizado um valor próximo da IC50 e um ponto abaixo da IC50. Para o ciclo celular, foi utilizado o mesmo valor próximo da IC50, garantindo que haveria células viáveis para a realização dos mesmos e a atividade expressiva do imatinibe. A equação da reta forneceu (Figura 15) para as CPs sem estímulo a IC50 de 14,21 μM de imatinibe e com PDGF, 13,51 μM , confirmado que, na presença do fármaco, a viabilidade celular de 50% é atingida antes do que sem PDGF, sugerindo que o fármaco juntamente com o PDGF atua mais rápido. Para as células S17 a IC50 foi calculada sem PDGF em 9,15 μM e com PDGF 8,80 μM , sendo utilizado nos experimento a dosagem de 7,5 μM como IC50 para garantir a presença de células viáveis para a realização dos mesmos.

Bartolovic e colaboradores (2004), em estudo com células hematopoiéticas e células progenitoras *in vitro* sob ação do imatinibe,

obtiveram, na cultura por 12 dias, a redução de células na concentração de 10 μM , e expansão, na concentração de 5 μM . No MTT de 48 horas, a IC50 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 IC50 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 imatinibe em células hematopoiéticas BCR-ABL negativas, é sustentada clinicamente por observações em pacientes com desordens mieloproliferativas que tiveram sucesso no tratamento com MI. Dados sugerem que o imatinibe age primeiramente nos ciclos celulares mais ativos em compartimentos compostos por células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. Esses resultados estão próximos e correspondem aos de Dudley e colaboradores (2003), que obtiveram a IC50 de 0,1 μM de imatinibe sob células musculares da aorta de ratos. Os valores encontrados neste trabalho para supressão do crescimento foram diferentes, provavelmente por eles terem utilizado progenitores mais primitivos e superestimulados com citocinas como interleucina humana 3 (IL-3), interleucina humana 6 (IL-6), obtendo-se uma maior supressão em concentrações inferiores de imatinibe que as testadas neste trabalho.

A partir desses resultados foram analisados os efeitos do imatinibe sobre as células S17, quanto a apoptose/viabilidade e ciclo celular pelas técnicas de LA/BE e IP respectivamente. Seguiu-se a mesma linha de raciocínio, sempre tratando as culturas com o fármaco e tendo em paralelo um experimento estimulado pelo PDGF.

A técnica do LA/BE permite diferenciar células viáveis daquelas que estão em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Células em apoptose inicial, que apresentam membrana intacta, apresentam manchas verdes no núcleo e não são marcadas pelo BE, mas morfológicamente apresentam alterações de membrana em decorrência de formação de corpúsculos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permanecem intactas durante o processo apoptótico até os últimos estágios, quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (TAKAHASHI et al, 2004).

Na Figura 17-A, o crescimento de fibroblastos (S17) sem estímulo, como controle, é marcado pelo LA/BE. Na figura 17-B, células fibroblásticas, sob ação do PDGF, evidencia-se que a citocina incentivou o crescimento e replicação dos fibroblastos, mostrando um

aumento do número de células marcadas em verde fluorescente, correspondendo aos métodos anteriores de viabilidade.

Na figura 17-C, observa-se a ação do imatinibe na dosagem de 5 μM , um ponto abaixo da IC50. Nesta concentração, o fármaco age diminuindo o número de células vivas coradas em verde, provavelmente inibindo a proliferação devido à ausência de corpos apoptóticos.

Na figura 17-D, observa-se a ação do imatinibe na dosagem de 5 μM sob estímulo de PDGF, com a diminuição da quantidade de células é mais pronunciada que na figura 17-B, correlacionando como os dados apresentados nos métodos anteriores que o fármaco tem ação mais pronunciada quando está sob o estímulo de PDGF.

Na figura 17-E e F, a ação do imatinibe na dosagem de 7,5 μM (IC50), o fármaco provoca a diminuição mais pronunciada de células vivas do que na dosagem anterior, e, nesta concentração há presença de células coradas em vermelho, que indica provável morte por apoptose.

Bartolovic e colaboradores (2004), em estudo com células hematopoéticas e células progenitoras *in vitro* sob ação do imatinibe, expuseram células CD34+ a concentrações baixas de imatinibe e não houve uma significativa indução a apoptose.

Distler e colaboradores (2007), utilizaram imatinibe em cultura de fibroblastos obtidas de biopsias de pele de pacientes com esclerose sistêmica e analisou a apoptose por anexina V e também não obteve resposta de células em apoptose em baixas concentrações de imatinibe, mas o autor cita que não se pode excluir a possibilidade do imatinibe modificar respostas apoptóticas de fibroblastos em condições proapoptóticas. Os resultados desses estudos divergem dos nossos resultados, provavelmente ao tipo celular estudado e principalmente a quantidade de imatinibe utilizada.

O ciclo celular é um regulador dos processos de proliferação e crescimento celular, atuando na divisão celular após dano no DNA. Ele age na transição da quiescência (G0) e na proliferação celular através dos pontos de controle garantindo a permanência da genética transcrita (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

O ciclo celular controla a reprodução celular em 4 fases. A síntese de DNA ocorre na fase S e a mitose na fase M da mitose nos períodos G1 e G2 (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

Perturbações no ciclo celular estão descritas freqüentemente na carcinogênese e, também a compreensão dos efeitos da quimioterapia em células saudáveis e cancerosas evidenciando o papel crítico que o ciclo celular desempenha na resistência a quimioterapia. Estas

observações levaram ao desenvolvimento de uma classe terapêutica antineoplásica na clínica especificamente drogas que agem na regulação do ciclo celular como as CDKs - quinases dependentes de ciclina e as tirosinas – quinases (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

A utilização do fármaco imatinibe pode interferir no ciclo celular promovendo a indução da apoptose ou impedindo a progressão do ciclo celular.

Na Tabela 5-A, células fibroblásticas sem estímulo do PDGF e sem imatinibe (controle) encontram-se na sua maioria (81%) na fase G0/G1, fase preparatória para que ocorra a mitose.

Na Tabela 5-D, células S17 estimuladas pelo PDGF, há um aumento de células na fase S comparadas com o controle, correspondendo que o PDGF apresenta maior poder mitótico sobre as células, estimulando o ciclo celular.

Na Tabela 5-B, células S17 sob ação do imatinibe, possui grande parte das células na fase G0/G1 (75,6%) e G2/M (20,2%), com diminuição da porcentagem de células na fase S (4,2%) em relação ao controle, verificando-se que o fármaco inibe o ciclo celular na fase G0/G1 e G2/M, devido à presença do fármaco.

Na Tabela 5-C, células S17 com PDGF e imatinibe, houve uma queda no número de células na fase S (5,3%) e aumento do número de células na fase G0/G1 (80,3%) e G2/M (14,4%) em relação ao controle, verificando que o fármaco bloqueia a ação do PDGF nas fases G0/G1 e G2/M, sendo esse bloqueio superior de quando do fármaco atua isolado sobre as células.

Gioni e colaboradores (2008), verificaram o efeito do imatinibe na proliferação de fibroblastos do estroma da mama. Concentrações de imatinibe 0,1-10 μ M foram adicionadas à cultura e a síntese de DNA foi estimada após 24 horas de incubação pela medida da incorporação de timidina radioativa. O imatinibe inibiu a proliferação de fibroblastos de modo concentração-dependente, ocorrendo desde concentrações muito baixas como 0,1 μ M. A análise do ciclo celular destas, revelou uma significativa diminuição das células na fase S e acúmulo de célula em G0/G1 concentração-dependente, sem alterações pronunciadas na proporção G2/M.

Soares e Vituri (2009), trabalharam com estroma de MO e obteve o bloqueio do ciclo celular crescente proporcional à quantidade de imatinibe em G0/G1, o que foi considerado correspondente aos resultados de apoptose também obtidos pelo mesmo autor.

Melzer e colaboradores (2004), em estudos de culturas de estroma medular, mostraram que células do estroma, na fase de crescimento máximo possuem uma sensibilidade maior ao imatinibe do que as células no estado estacionário. Assim, quando há estímulo do PDGF há uma maior porcentagem de células na fase S e sugere-se que, o imatinibe pode induzir a apoptose como foi confirmado pela técnica de LA/BE e pelos resultados do ciclo celular, em que há uma ação inibitória do imatinibe, bloqueando o ciclo celular e induzindo apoptose em concentrações próximas a IC50.

6.CONCLUSÕES:

- 1 O imatinibe exerceu um efeito inibitório sobre a viabilidade celular em cultura primária da MO a partir da concentração de 2,5 μM em células do estroma (CP) e em células hematopoéticas;
- 2 O imatinibe exerceu um efeito inibitório sobre a viabilidade celular em cultura da MO sob estímulo de PDGF a partir da concentração de 1,0 μM em células do estroma e em células hematopoéticas;
- 3 Houve alteração da predominância do tipo celular na CP sob ação do imatinibe, com inibição das células tipo fibroblásticas e predominância de células redondas na concentração de 10 μM ;
- 4 O imatinibe exerceu um efeito inibitório sobre a viabilidade celular em células fibroblásticas S17 a partir da concentração de 2,5 μM sem estímulo e 1 μM com estímulo de PDGF;
- 5 A IC50 calculada para a CP sem estímulo foi 14,21 μM , com estímulo 13,51 μM ; para as células S17 sem estímulo foi 9,15 μM e com estímulo foi 8,80 μM ;
- 6 Na concentração de 7,5 μM , o efeito inibitório foi de 55% e 48% para células S17 com e sem estímulo de PDGF, respectivamente;
- 7 A técnica LA/BE confirmou os resultados anteriores de viabilidade da célula S17 sob ação do Imatinibe e mostrou que, em 5,0 μM não houve processo de apoptose, porém em 7,5 μM induziu apoptose;
- 8 O imatinibe exerceu bloqueio do ciclo celular das células S17 nas fases G0/G1 e G2/M sem estímulo e com estímulo do PDGF. Com estímulo de PDGF houve aumento de células na fase S, confirmando que o PDGF estimula as células S17 e que o fármaco atua principalmente nos fibroblastos em proliferação.

O imatinibe, que foi desenvolvido inicialmente para LMC, após os resultados preliminares deste trabalho, confirma evidências que o mesmo poderá ser um candidato ao tratamento da fibrose exacerbada, pois atua também sobre a linhagem celular fibroblástica. Assim, tem potencial para maiores investigações na mielofibrose primária, que compromete o microambiente hematopoiético envolvendo fibroblastos, bem como em outras patologias que tem como base a disfunção dessas células.

7. Referências bibliográficas

- ABDEL-WAHAB, O.; LEVINE R. L. Primary Myelofibrosis Update on Definition, Pathogenesis, and Tratament. **Anm. Rev. Med** 60: 233-45, 2009.
- AKIYAMA, STEVEN K.; OLDEN KENNETH; YAMADA, KENNETH M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**. 14: 173-189,1995.
- ALMEIDA, V.R.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005
- APPEL, S.; BALABANOV, s.; BRUMMENDORF, T. H.; BROSSART, P. Effects of Imatinib on Normal Hematopoiesis and Immune Activation. **Stem Cells**, 23; 1082-1088, 2005.
- ATHENS, J. W. Mielofibrose. In LEE, R. G.; BITHELL, T. C., FOERSTER, J.; ATHENS, J.W., LUKENS, J. N. **Wintrobe-Hematologia Clínica**. 9ª ed. São Paulo: Manole, 1998.
- BARTOLOVIC, K.; BALABANOV, S.; HARTMANN, U.; KOMOR, M.; BOEHLER, A.M.; BÜHRING, H.J.; MÖHLE, R.; HOELZER, D.; KANZ, L.; HOFMANN, W.K.; BRÜMMENDORF, T.H. Effect of Imatinib on Normal Hematopoietic Cells. **Blood**. v. 103, n. 2. 2004.
- BEHAM-SCHMID, C.; APFELBECK, U.; SILL, H.; TSYBROVSKY, O.; HÖFLER, G.; HAAS, O.; LINKESCH W. Treatment of chronic myelogenous leukemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. **Blood**, 1 January, Vol. 99, No. 1, pp. 381-383, 2002.
- BERK, P.D. Doenças Mieloproliferativas. In: CECIL, R. L. ; WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. **Cecil tratado de medicina interna**. 19.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993
- BEYER, C.R; DISTLER, J.H.W; DISTLER, O.B Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases? *Swiss Medical Weekly*
- The European Journal of Medical Sciences**. April, 21, 2010.
- BRADBURY, P.; RAE, K. Connective tissues and stains. In: BANCROFT, J. D.; STEVES, A.; TURNER, D.R. **Theory and Practice of histological technique**. 4ª. ed. Curchil Livingstone, 1996.
- BORGES, L. G.; FRÖEHLICH, P. E. Talidomida – Novas Perspectivas para Utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e

- Antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, V. 49, 2003
- BUCHDUNGER, E.; CIOFFI, C. L.; LAW, N.; STOVER D.; OHNO-JONES, S.; DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. 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**. v. 295, p.139-145, 2000
- CERVANTES, F. Prognostic Factors and Current Practice in Treatment of Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia: an Update anno 2000. **Pathol Biol**, v.49, p. 148 – 152, 2001.
- CHAMPLIN R., GOLDE, D. W. As leucemias. In KASPER, BRAUNWALD, FAUCI, HAUSER, LONGO, JAMESON. **Harison-Medicina Interna**. 14ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil LTDA, 1998.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991
- DISTLER, J. H. W.; JUNGEL, A.; HUBER, L. C. et al. Imatinibe mesylate Reduces production of Extracellular Matrix and prevents Development of Experimental Dermal Fibrosis. **Arthritis & Rheumatism**. Vol. 56, n1, January, pp 311-322, 2007.
- DUDLEY, A.; GILBERT R. E. ; THOMAS, D. ; COX, A.; PRICE, J. T.; BEST, J.; JENKINS, A. STI-571 inhibts in vitro angiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 310, p. 135-142. 2003
- ELLIOTT, M. A.; TEFFERI, A. Splenic Irradiation in Myelofibrosis With Myeloid Metaplasia: a Review. **Blood Reviews**, v. 13, p. 163 – 170, 1999.
- GESKE, F.J.; GERSCHENSON, L.E. **The biology apoptose**. Hum Pathol. v.32, n10, pp. 1029-1038, 2001.
- GILES, F. J.; et al. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. **BLOOD**, 15, may, V.99, N.10, 2002.
- 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.
- GIRAUDIER, S.; CHAGRAOUI, H.; KOMURA, E.; BARNACHE, S.; BLANCHET, B.; LECOUEDIC, J. P.; SMITH, D. F.; LARBRET, F.; TAKSIN, A.L.; MOREAU-GACHELIN, F.; CASADEVALL, N.;

- TULLIEZ, M.; HULIN, A.; DEBILI, N.; VAINCHEMCKER, W. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. **Blood**. v. 100, p. 2932-2940, 2002.
- GONG, J.; ARDELT, B.; TRAIGANOS, 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.
- HARRISON, C. N. Myeloproliferative Disorders. **Medicine**. V.32, p. 58 – 60, 2004.
- HELDIN, C.H. Platelet-derived growth factor-an introduction. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 15, p. 195-196, 2004.
- HOFFBRAND, A.V.; PETTIT, J.E.; MOSS, P.A.H. **Fundamentos em Hematologia**. 4 Edição Editora Artmed, São Paulo, 2004.
- HUBIN, F.; HUMBLET, C.; BELAID, Z.; LAMBERT, C.; BONIVER, J.; THIRY, A.; DEFRESNE, M.P. 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.
- JAMRA, M.; LORENZI, T. F. **Leucócitos/ Leucemias/ Linfomas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1983.
- JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MAJKA, M.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M. Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. **Stem Cells**, v.19, n.2 p. 99-107, 2001.
- JEGATHESAN, J.; LIEBENTHAL, J. A.; ARNETT, M. G.; CLANCY, R.L.; PIERCE R. L.** Apoptosis: understanding the new molecular pathway. **Med Surg Nursing, Dec, 2004.**
- 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.
- KERBAUY, D. M. B.; GOOLEY, T. A.; SALE, G. E.; FLOWERS, M. E. D.; DONEY, K. C.; GEORGES, G. E.; GREENE, J. E.; LINENBERGER, M.; PETERSDORF, E.; SANDMAIER, B. M.; SCOTT, B. L.; SORROR, M.; STIREQALT, D. L.; STEWART, F. M.; WITHERSPOON, R. P.; STORB, R.; APPELBAUN, F. R.; DEEG, H. J. Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Idiopathic Myelofibrosis, Advanced Polycythemia Vera, and Essential Thrombocythemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 13, p. 355 – 365, 2006.

- KUMAR, C.; PURANDARE, A.V.; LEE, F. Y.; LORENZI, M.V. Kinase drug discovery approaches in chronic myeloproliferative disorders. **Oncogene**, 28, 2305-2313, 2009.
- LAZENNEC, G.; JORGENSEN, C. Concise Review: Adult Multipotent Stromal Cells and Cancer: Risk or Benefit? **Stem Cells**, 26:1387-1394, 2008.
- LÊ BOUSSE-KERDILÈS, M.C.; MARTYRÉ, M. C. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. **Ann Hematológica**. v.78, p. 437-444,1999.
- LICHTMAN M.; BEUTLER, A.; KIPPS T.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Williams Hematology**. 7 edição. Mc graw-hill medical.2006
- LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia – Procedência e Clínica** . 2ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA, 1999.
- MARTINS, G.B.; REIS, S., R., A.; SILVA, T., M., C. Expressão de colágeno I em carcinomas epidermóides da cavidade oral. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, 17(1):82-8, 2003.
- MCGARY, E. C., WEBER, K.; MILLS, L.; DOUCET, M.; LEWIS, V.; LEV, D. C.; FIDLER, I. J.; BAR-ELI, M. Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Proliferation of Osteosarcoma Cells by the Novel Tyrosine Kinase Inhibitor STI571. **Clinical Cancer Research**, v.8, p.3584-3591, 2002.
- 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.
- MESA, R. A.; ELLIOTT, M. A.; TEFFERI, A. Splenectomy in Chronic Myeloid Leukemia and Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. **Blood Reviews**, v.14, p. 121 – 129, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunil Methods**. V16 pag 55-63, December,1983.
- NILSSON, S.K.; DEBATIS, M.E.; DOONER, M.S.; MADRI, J.A.; QUESENBERRY, P.J.; BECKER, P.S. Immunofluorescence characterization of jey extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. **J. Histochem. Cytochem.**, Seattle, v.46, n3, p371-377, 1998.
- PAROLIN, M.B.; E REASON, I.J.M. apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq. Gastroenterol**, v.38, n2, pp.138-144, 2001.

- PEGGS K, MACKINNON S. Imatinib Mesylate: the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**;348(11):1048-500,2003.
- ÖZEN, S.; FERHANOGLU, B.; SENOCAK, M.; TÜZÜNER, N. Idiopathic Muelofibrosis (Agnogenic Myeloid Metaplasia): Clinicopathological Analysis of 32 Patients. **Leukemia Research**, v. 21, p. 125 – 131, 1997.
- RAPAPORT, S. I. **Introdução a Hematologia**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 1990
- REILLY, J. T. Idiopathic Muelofibrosis: Pathogeneses, Natural History and Management. **Blood Reviews**, v.11, p. 233 – 242, 1997.
- RICO P., RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ J. C., MORATAL D., ALTANKOV G., MONLEÓN PRADAS M., SALMERÓN-SÁNCHEZ M. Substrate-induced assembly of fibronectin into networks: influence of surface chemistry and effect on osteoblast adhesion. **Tissue Eng Part A**. Nov;15(11):3271-8, 2009.
- RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.E.; SILVA, I.S.B. Molecular Basis of Cervical Oncogenesis. 179. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47(2): 179-84, 2001.
- RUMPEL et al, Imatinib normalizes bone marrow vascularity in patients with chronic myeloid leukemia in first chronic phase. **Blood**, 1 June, Vol. 101, No. 11, pp. 4641-4643, 2003.
- RUNGE, M. S.; GREGANTE, M. A. **Medicina Interna de Netter**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- SANTA'ANA, A. C. P. Efeitos da aplicação de diferentes fatores de crescimento (PDGF-BB, IGF-1 e TGF-B1) isolados ou combinados na taxa de proliferação e na adesão de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano a fragmentos radiculares tratados ou não com ácido cítrico e tetraciclina após a raspagem.. **Tese (Doutorado em Odontologia, área de periodontia)- Faculdade de Odontologia de Bauru**, Universidade de São Paulo, 2001.
- SARASTE, A.; PULKKIC, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, pp.528-537, 2000.
- SESHI B.; KUMAR, S.; SELLERS, D. Human Bone Marrow Stromal Cell: Coexpression of Markers Specific for Multiple Mesenchymal Cell Lineages. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, 26(3) June: 234–246, 2000.
- SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. A. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of clinical oncology** V. 23 N. 36 Dezembro,2005

- SOARES, P. B.; VITURI, C. L. Avaliação do potencial mielossupressor do mesilato de imatinibe sobre células progenitoras hematopoéticas e células do estroma da medula óssea da camundongos. **Tese de mestrado em farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina**, 2009.
- SNYDER, D. S.; PALMER, J.; STEIN, A. S.; PULLARKAT, V.; SABEBI, F.; COBEN, S.; VORA, N.; GAAL, K.; NAKAMURA, R.; FORMAN, S. J. Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Following Reduced Intesity Conditioning for Treatment of Myelofibrosis. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 12, p. 1161 – 1168, 2006.
- STAGNO, F.; CONSOLI, C.; MANNINO, F.; GUGLIELMO, P.; GIUSTOLISI, R. Successful treatment of advanced idiopathic myelofibrosis with imatinib mesylate. **European Journal Of Haematology**. v. 73, p.14, 2004.
- TAKAHASHI, K.; REYNOLDS, M.; OGAWA, N.; LONGO, D. L.; BURDICK, J. Augmentation of T-cell apoptosis by immunosuppressive agents. **Clinical Transplantation** V. 18 12, Pages 72 – 75, 2004.
- TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M.et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 1, p. 31-40, Apr. 2003.
- TESTA, N.G.; MOLINEUX, G. **Haemopoiesis: A pratical Approach**. New York: Oxford. University Press Inc., 1993.
- UUTELA, M.; WIRZENIUS, M.; PAAVONEN, K.; RAJANTIE, I.; HE, Y.; KARPANEN, T.; LOHELA, M.; WIIG, H.; SALVEN, P.; PAJUSOLA, K.; ERIKSSON, U.; ALITALO, K. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. **Blood**, v.104, p. 3198-3204, 2004.
- VANUCCHI, A. M.; GUGLIELMELLI, P.; TEFFERI, A. Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms. **CA Cancer J. Clin** 59, 171-191, 2009.
- VERRASTRO, T., LORENZI, T. F.; NETO, S. W. **Hematologia e Hemoterapia: fundamentos de morfologia, patologia e clínica**. 1ª ed. São Paulo:Atheneu, 1996
- VITURI, C.L.; BORELLI, P., SILVA, M.A. Efeito da Desnutrição protéica sobre a Matrix Extracelular da Medula óssea de Camundongos. **Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo**, 2001.
- WANG, J. C.; HEMAVATHY, K.; CHARLES, W.; ZHANG, H.; DUA, P. K.; NOVETSKY, A. D.; CHANG, T.; WONG, C.; JABARA, M.

Osteosclerosis in Idiopathic Myelofibrosis is Related to the Overproduction of Osteoprotegerin (OPG). **Experimental Hematology**, v. 32, p. 905 – 910, 2004.

ZAGO, M. A; FALCÃO, R. P; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

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.

8.ANEXOS

ANEXO A



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 MIELOSSUPPRESSOR DO MESILATO DE IMATINIBE

Pesquisador Responsável: Cidônia de Lourdes Víturi

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 saudios.

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 clinica 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 saudios 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-graduanda do Mestrado em Farmácia - UFSC. Possui currículo para efetuar tal projeto (especialização anterior no mesmo tema).

Comentários: - O estudo proposto possui relevância científica.

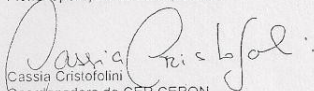
- Os sujeitos serão esclarecidos quanto sua vulnerabilidade e proteção. Seus riscos e benefícios estão bem argumentados pelos pesquisadores.
- Os pacientes estarão corretamente instruídos pelo TCLE, estando identificados os responsáveis pela pesquisa e pelo atendimento, é mostrada ao sujeito as garantias 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 contato 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

ANEXO B

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00127

Título

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIELOSSUPPRESSOR DOS FÁRMACOS CITARABINA, DAUNORRUBICINA E MESILATO DE IMATINIB.

Data de Entrada

20/06/2007

Resultado:

Aprovado

Data / Prazo

08/08/2007

Considerações

Ofício nº 105/CEUA/PRPe/2007

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Cidônia de Lourdes Vituri, Departamento de Análises Clínicas - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 1 (hum) ano, para a utilização de 408 camundongos (*Mus musculus*).

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.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Presidente-interino/CEUA/PRPe/UFSC

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 13/11/2008**

Data 13/08/2007

Anexo C – Artigo Mielofibrose

Patogênese, Diagnóstico e Tratamento da Mielofibrose

Larissa Duarte Christofolletti,^{1a}; Karina Bettega Felipe^{1b}; Natalia Gazzoni Scaravelli^{1c}; Cidonia de Lourdes Vituri^{2a}

^{1a} Aluna de Mestrado de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Santa ^{1b} Aluna de Mestrado da Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, ^{1c} Mestre pela Universidade Federal de Santa Catarina; ^{2a} Profa Dra da Universidade Federal de Santa Catarina

Resumo

A mielofibrose primária (MP) é uma desordem mieloproliferativa crônica caracterizada pela hiperplasia e fibrose medular. A fibrose característica dela está relacionada à liberação de fatores de crescimento hematopoéticos, dentre eles o fator derivado de plaquetas (PDGF), que estimula a proliferação de fibroblastos, com conseqüente depósito de fibras colágenas e reticulínicas. O desenvolvimento de fibras de colágeno no lugar do tecido hematopoético normal é o responsável pela maioria dos sintomas da doença: fadiga, anemia, aumento da circunferência abdominal, perda de peso, dores musculares e ósseas dentre outros. A hepatoesplenomegalia e a presença de um tumor no hipocôndrio esquerdo tratam-se dos achados físicos mais relatados. As alterações hematológicas são variáveis e se devem ao distúrbio anatômico da MO e parcialmente a hematopoese extramedular com leve anemia. Há necessidade de uma biópsia medular para a elucidação da fibrose, uma vez que, na maioria das vezes, a aspiração da MO resulta em uma punção seca. O exame histopatológico revela o aumento da reticulina fibrilar, do colágeno e dos fibroblastos. O diagnóstico laboratorial é baseado principalmente em alterações no hemograma, mielograma e no exame histopatológico da MO do paciente. As alterações séricas, a presença de anormalidades cromossômicas e a ocorrência de metaplasia mielóide auxiliam no diagnóstico. O tratamento da doença é paliativo, não sendo conhecida nenhuma terapia capaz de inibir o processo fibrótico. Dessa forma, o tratamento é direcionado às complicações específicas da doença, visando amenizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Palavras-chave: mielofibrose, mieloproliferativa, hematopoese extramedular

Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Myelofibrosis

The primary myelofibrosis (MP) is a chronic myeloproliferative disorder characterized by hyperplasia and marrow fibrosis. The characteristic Fibrosis of this is related to the release of hematopoietic growth factors, among them the derived factor plaquets (PDGF), that stimulates the proliferation of fibroblasts, with subsequent deposit of collagen and reticulin fibers.

The development of collagen fibers in the place of normal hematopoietic tissue is responsible for the majority of symptoms of the disease: fatigue, anemia, abdominal obesity, weight loss, muscle and bone pains, others. Hepatosplenomegaly and the existance of a tumor in the left handle are the most reported physical findings.

The hematologic abnormalities are variable and are consequence of a anatomical disorder of MO and partly to extramedullary hematopoiesis with mild anemia. There is the need for a bone marrow biopsy to elucidate the fibrosis, since, in most cases, the aspiration of the MO results in a dry puncture. The histopathology exam show us an increase in fibrillar reticulin, collagen and fibroblasts.

Laboratory diagnosis is mainly based on alterations in the hemogram, mielogram, and histopathologic exam of the patient's MO. The changes in serum, the presence of chromosomal abnormalities and the existance of myeloid metaplasia help in the diagnosis. The treatment of the disease is palliative, and there is no known therapy capable of inhibiting the fibrotic process. Thus, the treatment is directed at specific complications of the disease, in order to reduce the symptoms and improve the quality of life of the patient.

Key words: myelofibrosis, myeloproliferative, extramedullary hematopoiesis

Introdução

A mielofibrose primária (MP) é uma desordem mieloproliferativa crônica de etiologia desconhecida (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2005), caracterizada pela hiperplasia e fibrose medular (GIRAUDIER, et al., 2002), crescimento de células neoplásicas em locais fora da medula óssea (MO), hematopoese extramedular, leucoeritroblastos no sangue periférico e alterações no número de plaquetas e granulócitos (CHAMPLIN, GOLDE, 1998; STAGNO, et al., 2004).

A mielofibrose com metaplasia mielóide é uma síndrome na qual as evidências morfológicas de proliferação de fibroblastos e deposição excessiva de colágeno na MO acompanham-se de metaplasia mielóide em órgãos como o fígado, o baço e os linfonodos, locais ativos da hematopoese extramedular. Geralmente o grau da hematopoese extramedular tende a acompanhar a extensão da fibrose da MO (BERK, 1993).

Incidência

A MP é uma desordem observada principalmente em pacientes de meia-idade e idosos. Embora alguns relatos tenham citado a ocorrência da doença em crianças ou até mesmo em bebês, pelo menos 60% dos casos ocorrem em indivíduos com idade entre 50 e 70 anos de idade, sem qualquer predileção por sexo, sendo mais comumente em caucasianos que em outras raças (ATHENS, 1998; BERK, 1993; HARISSON, 2004).

Aproximadamente há 0,5 casos por 100.000 habitantes/ano e a sobrevivência mediana em três anos é de 52% (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2005).

Etiologia e patogênese

A hiperplasia de megacariócitos, típica dos estados mieloproliferativos em geral, está diretamente envolvida com a proliferação dos fibroblastos, e conseqüente fibrose medular. Isso leva a uma megacariocitopoese ineficiente, com conseqüente morte intramedular de megacariócitos e liberação dos fatores de crescimento. Estes por sua vez, atuam estimulando a proliferação dos fibroblastos e a produção de colágeno, que, associada à inibição da atividade da colagenase, leva à fibrose medular (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996). Dentre os fatores de crescimento que podem estimular a proliferação dos fibroblastos pode-se citar o fator derivado de plaquetas

(PDGF), o fator β de crescimento e transformação (TGF- β) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (ZAGO, FALCÃO, PASQUINI, 2005).

Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são glicoproteínas secretadas pelas células estromais que atuam na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Esses fatores são classificados de acordo com o tipo de receptor de membrana celular em: família das citocinas e família dos receptores de tirosina quinase resumidos na tabela 1 (LORENZI, 1999).

Tabela 1: Principais fatores de Crescimento que agem na MP

FATOR DE CRESCIMENTO	ORIGEM	ALVO	RECEPTOR
PDGF PM:30.000	plaquetas cel.endotelial macrófagos	fibroblastos células musculares lisa celulass gliais	tirosina quinase
EGF PM:6.045	Glandula de Brunner glandula. submaxilar	queratinócitos células endoteliais fibroblastos	tirosina quinase
TGF- β PM:25.000	plaquetas	queratinócitos hepatócitos fibroblastos osteoblastos	3 receptores alta afinidade
FGF Pm:16.400	cérebro retina corpo lúteo macrófago rim próstata tireóide	células endoteliais fibroblastos condrócitos celulas gliais células epiteliais osteoblastos queratinócitos	alta afinidade sem endocitose do complexo FGF-FGF-R

TGF- β

O fator β de crescimento e transformação (TGF- β) é sintetizado pelos megacariócitos agindo no aumento da síntese e no acúmulo de proteínas da MEC e regulando a atividade dos genes envolvidos na síntese da mesma (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

Esse fator é responsável pelo aumento de fibronectina, tenascina, proteoglicanos e colágenos do tipo I, III e IV, observados nos estágios mais avançados da doença (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999; REILLY, 1997). Tem poder angiogênico (REILLY, 1997) e bloqueia a degradação da MEC pelo decréscimo da síntese de proteases colagenase-like e aumento da expressão de inibidores de proteases (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999; REILLY, 1997).

PDGF

O PDGF é um fator de crescimento derivado de plaqueta e é uma molécula dímica feita de um sistema de PDGF e receptor de PDGF que ativa tirosina quinase pela indução durante a ligação do receptor dímero e autofosforilação (HELDIN, 2004).

O PDGF estimula o crescimento e a divisão de células fibroblásticas, atua também como fator quimiostático para fibroblastos, neutrófilos e monócitos, sendo responsável pela proliferação de fibroblastos na MP (REILLY, 1997). É um potente mitógeno para células de origem mesenquimal como fibroblastos, células musculares lisas e outras, sendo capaz de estimular a proliferação, quimiotaxia e sobrevivência das células normais e células alteradas como as do câncer, arteriosclerose e doença fibrótica (MCGARY, et al., 2002).

EGF

Fator de Crescimento Epidermal (EGF): presente nos grânulos das plaquetas. Estudos mostram que ele coopera com o PDGF e TGF- β no estímulo para fibroblastos crescerem na MO (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

VEGF

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF): trata-se de uma citocina multifuncional que contribui na angiogênese. Ela permite o extravasamento de proteínas do plasma para o espaço extravascular, alterando a MEC e favorecendo a angiogênese e o crescimento de fibroblastos (LÊ BOUSSE-KERDILÈS, MARTYRÈ, 1999).

Sintomas

O início dos sintomas da MP é geralmente silencioso, por vários anos, com progressão lenta da doença em muitos casos, sendo que um quarto dos casos é assintomático no diagnóstico (BERK, 1993).

Os sintomas mais comuns da MP podem ser observados na tabela 2 (VANUCCHI, GUGLIELMELLI, TEFERI, 2009, ATHENS, 1998;).

Tabela 2: Sintomas comuns em pacientes que apresentam MP

Anemia	(VANUCCHI, GUGLIELMELLI, TEFERI, 2009; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Aumento da circunferência abdominal	(BERK, 1993)
Fadiga	(RAPAPORT, 1990;ATHENS, 1998; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Perda de peso	(RAPAPORT, 1990;ATHENS, 1998; RUNGE; GREGANTE, 2005)
Palidez	(JAMRA; LORENZI, 1983; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996; LORENZI, 1999)
Dores musculares	(JAMRA; LORENZI, 1983; VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996; LORENZI, 1999)
Dores ósseas	(BERK, 1993)
Sudorese noturna	(RAPAPORT, 1990;RUNGE; GREGANTE, 2005)
Saciedade prematura	(RAPAPORT, 1990;RUNGE; GREGANTE, 2005)
Diarréia	(RUNGE; GREGANTE, 2005)
Edema periférico	(RUNGE; GREGANTE, 2005)

Achados Físicos

Os achados físicos mais comuns em pacientes com MP podem ser observados na tabela 3:

Tabela 3: Achados físicos comuns em pacientes com MP

Esplenomegalia	(ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Hepatomegalia	(BERK, 1993)
Tumor no hipocôndrio esquerdo	(JAMRA; LORENZI, 1983)

Dados laboratoriais

Sangue

As alterações no sangue são variáveis. A tabela 4 resume as principais alterações hematológicas encontradas em pacientes com MP:

Tabela 4: Principais alterações hematológicas em pacientes com MP

Hemoglobina	9-13 mg/dl (leve anemia)	(BERK, 1993)
Morfologia das hemácias	Eritrócitos em forma de lágrima, ovais e nucleados; aniso e poiquilocitose acentuadas	(RAPAPORT, 1990; ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Granulócitos	Leucometria variável; presença de leucócitos imaturos	(BERK, 1993)
Plaquetas	Plaquetometria geralmente aumentada; presença de megatrombócitos e fragmentos de megacariócitos	(ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Fosfatase alcalina	Variável	(BERK, 1993)

A princípio, as hemácias são normocíticas e normocrômicas com discreta poiquilocitose. Observa-se policromasia e uma discreta reticulocitose de 2 a 5%. O achado de alguns normoblastos e, algumas vezes, precursores eritróides ainda mais jovens é muito comum. A anisocitose, a poiquilocitose, a policromasia, o pontilhado basofílico e a normoblastose são mais graves à medida que a doença progride, portanto esses achados e o crescimento do baço podem ser suficientemente característicos para indicarem diagnóstico (BERK, 1993). Células fragmentadas e células em alvo também podem ser observadas (ATHENS, 1998).

A sobrevida da hemácia está quase que invariavelmente diminuída, sendo freqüente o seqüestro esplênico. Os estudos eritrocínicos mostram uma eritropoiese bastante ineficaz (BERK, 1993).

A anemia está presente na maioria dos pacientes, a qual se apresenta de leve a moderada no momento do diagnóstico, com hemoglobina variando entre 9 e 13 g/dL (BERK, 1993).

As leucometrias são variáveis estando aumentadas em aproximadamente 50% dos pacientes, normal em cerca de um terço dos pacientes, e baixa nos 15% restantes. Mais tipicamente, a contagem fica na faixa de 15000 a 30000/mm³, porém foram observados até 70000/mm³ (BERK, 1993).

A contagem de eosinófilos e basófilos está freqüentemente aumentada, mesmo nos pacientes com leucopenia (ATHENS, 1998; RAPAPORT, 1990). O número de linfócitos comumente está normal. (ATHENS, 1998). É típico um certo grau de imaturidade do granulócito no sangue periférico incluindo a presença de até 10 % de formas jovens. Entretanto essa condição não sugere necessariamente a evolução para leucemia aguda, sobretudo quando também existem números proporcionais de promielócitos, mielócitos e metamielócitos (BERK, 1993). A anomalia de Pelger-Huet adquirida é um outro aspecto típico no esfregaço do sangue periférico (BERK, 1993).

A concentração de fosfatase alcalina do leucócito é variável, porém com freqüência normal ou aumentada (BERK, 1993). A reação da fosfatase alcalina serve para diferenciar a MP da leucemia mielóide crônica, visto que a fibrose medular pode ser encontrada em todas essas situações englobadas sob a denominação de síndromes mieloproliferativas (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999).

A deficiência de peroxidase dos neutrófilos pode-se fazer acompanhar por uma deficiência de funcionamento destes, tendo sido ainda descritas várias outras anormalidades funcionais. Foi citada ainda uma liberação defeituosa de lactoferrina pelos neutrófilos. Tal liberação poderia constituir-se num defeito no controle por feed-back negativo (supressão) da granulopoiese, o que por sua vez, poderia resultar num aumento da atividade mieloproliferativa (ATHENS, 1998).

O número de plaquetas está aumentado por ocasião do diagnóstico em aproximadamente 50% dos pacientes (ATHENS, 1998), estando associada a um grande aumento na reserva esplênica (BERK, 1993). A plaquetometria tende a cair pouco a pouco com o passar do

tempo, sendo comum a trombocitopenia na fase final da doença (BERK, 1993; ATHENS, 1998). Graus extremos de trombocitose podem constituir-se na principal característica da doença em alguns pacientes, um achado que enfatiza a dificuldade na diferenciação entre trombocitemia primária e mielofibrose (ATHENS, 1998). Do ponto de vista morfológico, os megatrombócitos e os fragmentos megacariocíticos são extremamente comuns (BERK, 1993; ATHENS, 1998).

Medula óssea

Descrevem-se três fases no quadro anatômico da medula na MP: na primeira fase há hipercleruidade medular; na fase seguinte, a MO mostra áreas de fibrose e áreas com precursores hematopoiéticos; já a terceira fase caracteriza-se por mielofibrose franca, com resíduos de tecido hematopoiético escassos, de permeio a fibras colágenas (VANUCCHI, GUGLIEMELLI, TEFFERI, 2009, VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999)

As tentativas de aspirar a MO tem como resultado quase invariável uma punção seca, mesmo quando a medula está em grande celularidade (BERK, 1993). Por isso, geralmente é preciso fazer a biópsia da MO, seja percutânea ou cirúrgica, para confirmar o diagnóstico (BERK, 1993).

Esfregaços bem-sucedidos de aspirados de medula podem não exibir qualquer anormalidade, mas com mais freqüência está aumentada a proporção de precursores dos neutrófilos e de megacariócitos. São observados micro e macromegacariócitos bem como uma assincronia nuclear citoplasmática e inclusões nucleares fibrilares, apresentando ligações cruzadas (ATHENS, 1998).

Há necessidade de uma biópsia medular para a elucidação da fibrose. Em praticamente todos os pacientes, graus variáveis de fibrose são detectados. Observa-se também o aumento da reticulina fibrilar, do colágeno e dos fibroblastos (RAPAPORT, 1990). Também se notam grupos de megacariócitos, com muitos megacariócitos atípicos, sinusóides dilatados da MO, e maiores quantidades de mastócitos nas biópsias, particularmente em áreas adjacentes à fibrose (VANUCCHI, GUGLIEMELLI, TEFFERI, 2009, RUNGE, GREGANTE, 2005 VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; ATHENS, 1998; LORENZI, 1999;). Há o aumento nas fibras de reticulina através da impregnação com prata (coloração de Gomori) nas áreas nas quais talvez não se consiga evidenciar colágeno maduro. Já a coloração com hematoxilina-

eosina (HE) permite observar a celularidade da medula (BERK, 1993; BRADBURY, RAE, 1996).

Anormalidades cromossômicas

Estudos verificam anormalidades cromossômicas e de mutação do gene N-ras (ATHENS, 1998).

Alterações citogenéticas são observadas em até 50% dos pacientes, incluindo anormalidades do cromossomo del (20q 11q13), del(13q12q22), trissomia dos cromossomos 1 q, 8 e 9 e monossomia/deleções envolvendo o cromossomo 7(BERK, 1993; O' BRIEN, TEFFERI, VALENT, 2004). Anomalias dos cromossomos 5 e 20 também ocorrem com grande frequência. Não há cromossomo Ph1; os casos em que essa anomalia foi descrita representam muito provavelmente exemplos atípicos de leucemia mielóide crônica (BERK, 1993).

Soro

As principais alterações séricas encontradas em pacientes com MP foram descritas na tabela 5:

Tabela 5: Alterações séricas comuns em pacientes com MP

Vitamina B12	Normal/levemente aumentada	(BERK, 1993)
Ácido úrico	Aumentado	(RAPAPORT, 1990; ATHENS, 1998; BERK, 1993)
Desidrogenase láctica (LDH)	Elevada	(ATHENS, 1998; BERK, 1993)
AST	Levemente aumentada	(BERK, 1993)
ALT	Levemente aumentada	(BERK, 1993)
Bilirrubina	Levemente aumentada	(BERK, 1993)
Ferro	Normal/ reduzido em hemorragias; aumentado em hiper-hemólise	(VERRASTRO; LORENZI; NETO, 1996; LORENZI, 1999).

Ocorrem níveis séricos normais ou levemente elevados da vitamina B12 bem como das proteínas que conjugam a vitamina B12, porém os valores não são tão gritantes quanto aqueles vistos na leucemia granulocítica crônica (BERK, 1993).

A hiperuricemia causada pela maior produção de ácido úrico é comum, o que sugere que está ocorrendo um aumento significativo na

velocidade de turnover total do tecido hematopoiético (BERK, 1993; ATHENS, 1998; RAPAPORT, 1990).

A concentração da desidrogenase láctica séria (LDH) está elevada na maioria dos pacientes, provavelmente refletindo uma mielopoiese ineficaz (BERK, 1993; ATHENS, 1998). O nível de fosfatase alcalina sérica também está aumentado, porém esse aumento provavelmente reflete a doença óssea e não a hepática (ATHENS, 1998; RAPAPORT, 1990).

O ferro pode estar normal ou reduzido, quando ocorrem hemorragias. Nos casos de hiper-hemólise, o ferro sérico costuma estar aumentado (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999).

Outras alterações laboratoriais são elevações discretas dos níveis séricos das transaminases e da bilirrubina e aumentos discretos da muramidase (BERK, 1993).

Punção de gânglio linfático e de baço

Tanto na leucemia mielóide crônica quanto na mielofibrose, podem haver palpados linfonodos pouco aumentados de tamanho. A punção dos mesmos com agulha evidencia sempre um grande número de granulócitos jovens e maduros no material obtido, caracterizando a metaplasia mielóide que aparece nos tecidos linfóides nas síndromes mieloproliferativas. O baço também é sede dessa metaplasia, observada sempre que se faz a punção do órgão ou pelo exame histopatológico de material obtido após a esplenectomia (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999).

Critérios para o diagnóstico de mielofibrose primária

Os critérios para o diagnóstico de mielofibrose com metaplasia mielóide incluem:

Critérios necessários: fibrose da MO difusa, e ausência do cromossomo Filadélfia ou rearranjo BCR-ABL nas células sanguíneas periféricas;

Critérios opcionais: esplenomegalia de qualquer grau, anisopoiquilocitose com dacriócitos, circulação de células mielóides imaturas, circulação de eritroblastos, agrupamentos de megacarioblastos e megacariócitos anômalos nas seções da MO, metaplasia mielóide (RUNGE, GREGANTE, 2005).

O diagnóstico da mielofibrose com metaplasia mielóide pode ser feito se as seguintes combinações estiverem presentes: os dois critérios necessários, mais quaisquer dois critérios opcionais quando a

esplenomegalia estiver presente, ou os dois critérios necessários mais quaisquer quatro critérios opcionais, quando a esplenomegalia estiver ausente (RUNGE, GREGANTE, 2005).

Complicações e evolução da doença

A evolução da MP caracteriza-se por esplenomegalia progressiva e hepatomegalia um pouco menor. Geralmente a esplenomegalia acompanha-se de anemia e trombocitopenia progressiva (BERK, 1993).

A anemia pode ser tão severa que o paciente só consegue sobreviver á custa de repetidas transfusões. Embora a anemia se deva primeiramente à insuficiência na produção de hemácias, em alguns pacientes o seqüestro esplênico contribui significativamente para a sua gravidade (RAPAPORT, 1990).

A trombocitopenia pode levar a um sangramento anormal. Entretanto, pacientes que não apresentam nenhum distúrbio no número de plaquetas também podem sangrar anormalmente, devido a defeitos qualitativos da função plaquetária. Se for necessária uma cirurgia, devem ser administrados concentrados de plaquetas para controlar o sangramento pós-operatório (RAPAPORT, 1990).

A evolução da mielofibrose para um quadro de policitemia Vera (PV) tem sido citada, mas com maior freqüência ela se transforma em leucemia de tipo aguda, com blastos mielóides ou com grande componente de megacarioblastos (LORENZI, 1999).

Além da mielofibrose de evolução crônica, existe uma forma de mielofibrose aguda que não tem esplenomegalia tão marcante. Tal forma aguda evolui de modo rápido, com anemia acentuada, estado geral muito comprometido e freqüentes hemorragias. A MO é muito hipocelular, fibrosada e esclerosada (osteomielo esclerose), com blastos atípicos. Essa doença corresponde à leucemia aguda rara, de tipo megacariocítico, a LMA-M₇ da classificação FAB (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999).

As complicações da doença podem incluir hipertensão portal, infarto do baço e de outros locais da hematopoiese, causando linfadenopatia, derrames pleurais, ascite (superfícies serosas), processos de pneumonia, hematúria e compressão da medula espinhal e raízes nervosas (espaços paraespinhal e epidural) (RUNGE, GREGANTE, 2005).

Prognóstico

O prognóstico da MP permanece pobre quando comparado com outras desordens mieloproliferativas, e não obteve mudança significativa durante os últimos 20 anos. (ÖZEN, FERHANOGLU, SENOCAK, et al, 1997).

O prognóstico da mielofibrose depende da fase em que se apresenta a doença, a qual implica maior ou menor quantidade de fibrose instalada (LORENZI, 1999).

O quadro histopatológico medular pode revelar hiper celularidade, especialmente de megacariócitos, fibrose discreta ou fibrose difusa colágena. Os achados anatômicos e hematológicos dependem da propensão da doença e, por sua vez, orientam o prognóstico (LORENZI, 1999).

Tamanho aumentado do baço e do fígado, febres, suores noturnos, perda de peso, cariótipo anormal, idade avançada, altas taxas de precursores mielóides imaturos no sangue, aumento de reticulina e colágeno, hematopoiese intrasinusoidal e trombocitopenia também são considerados importantes fatores de um mau prognóstico (CERVANTES, 2001; ÖZEN, FERHANOGLU, SENOCAK, et al, 1997).

Mortalidade por MP inclui anemia progressiva e desconforto abdominal decorrente da esplenomegalia (ELLIOTT, TEFFERI, 1999). As principais causas de morte são infecção, hemorragia, falha progressiva da medula, complicações decorrentes da hipertensão portal, insuficiência cardíaca, mortalidade pós-esplenectomia e transformação em leucemia aguda (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005). Esta pode ocorrer em aproximadamente 15% dos pacientes e é comumente mieloblástica ou mielo-monoblástica, podendo envolver também a linhagem megacariocítica, eritrocítica e linfóide (REILLY, 1997). Foi observada a morte atribuível também à insuficiência renal, insuficiência hepática ou trombose (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005).

Sugerem um bom prognóstico: baço e fígado de tamanho normais e um bom estado histológico da MO (CERVANTES, 2001).

Tratamento

Não se chegou a um consenso sobre o tratamento ótimo da metaplasia mielóide agnôgena ou da mielofibrose pós policitêmica. Não existe até agora qualquer tratamento eficaz que iniba o processo fibrótico (BERK, 1993). Além disso nenhuma das formas terapêuticas convencionais mostrou-se capaz de prolongar a sobrevida, e nem

apresentou um efeito benéfico consistente sobre o processo patogênico básico subjacente à mielofibrose (ATHENS, 1998). Assim o tratamento é paliativo e direcionado às complicações específicas, visando amenizar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (ATHENS, 1998; RUNGE, GREGANTE, 2005).

Visto que os pacientes com mielofibrose exibem variabilidade no do progresso de sua doença e uma faixa de sobrevida variável, muitos pacientes não necessitam de terapia por períodos prolongados. Geralmente, os pacientes assintomáticos apenas devem ser observados (ATHENS, 1998). A maioria dos hematologistas não realiza qualquer tratamento específico no tratamento assintomático, a exceção do emprego de 200 a 400 mg/dia de alopurinol para evitar as complicações da hiperuricemia (BERK, 1993).

O tratamento convencional da anemia consiste em transfusões, para manter a hemoglobina em níveis razoáveis, e de uma suplementação com folato (ATHENS, 1998; VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999). A eritropoetina pode ser usada em pacientes com um certo grau de anemia, com algum resultado (VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996). Entretanto, no caso de anemia severa utiliza-se terapia com andrógenos e corticosteróides (ATHENS, 1998; BERK, 1993; RUNGE, GREGANTE, 2005). São administradas grandes doses de andrógenos aos pacientes, numa tentativa de aumentar a eritropoiese efetiva (RAPAPORT, 1990; VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999), mas são de valor questionável e podem provocar um aumento esplênico posterior e retenção de fluidos (RAPAPORT, 1990). Foi relatado que a terapia androgênica melhora a função medular em aproximadamente 40% dos pacientes (REILLY, 1997).

Deve-se continuar o tratamento por pelo menos 3 meses para verificar se determinado preparado é eficaz, sendo que alguns hematologistas argumentam que os pacientes que não respondem a um androgênio podem acabar respondendo a outro (BERK, 1993). Caso não seja observada a melhora após 3 a 6 meses, a terapia deverá ser descontinuada. Entretanto, deve ser enfatizado que o benefício da terapia por andrógenos em casos de mielofibrose é ainda objeto de debates. Os esteróides das adrenais não têm efeitos comprovadamente benéficos em casos de mielofibrose (ATHENS, 1998).

Como a MP é uma doença crônica, as subseqüentes transfusões podem levar a um aumento nas concentrações séricas de ferro, devendo ser implantada uma terapia de quelação do ferro (REILLY, 1997).

Alopurinol deve ser usado para manutenção dos níveis séricos de ácido úrico para, dessa forma, evitar a nefropatia por uratos e cálculos renais, e também como profilaxia contra ataques de gota secundária (ATHENS, 1998; RAPAPORT, 1990).

A falta de uma terapia realmente eficaz para a mielofibrose juntamente com os efeitos causados pela esplenomegalia sugere a redução do tecido esplênico como a terapia para essa desordem (MESA, ELLIOTT, TEFFERI, 2000).

A redução direta do tecido esplênico pode ser realizada pelo uso de agentes citotóxicos, por irradiação ou pela remoção do órgão. As respostas aos agentes citotóxicos são variáveis e podem resultar em uma mielossupressão significativa (MESA, ELLIOTT, TEFFERI, 2000).

Pequenas doses de radiação são usadas para reduzir o tamanho do baço e costumam proporcionar alívio aos sintomas dolorosos decorrentes da esplenomegalia (RAPAPORT, 1990; VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999), sendo que a resposta ao tratamento dura por aproximadamente 4 a 6 meses (REILLY, 1997).

A radioterapia é usada com maior frequência em pacientes com indicação para esplenectomia sem hipertensão portal, que são candidatos a uma cirurgia de alto risco. Todas as dosagens recomendadas provêm de estudos observacionais anteriores, que fornecem informações, embora limitadas, sobre as dosagens em que possam se esperar efeitos benéficos ou tóxicos. Porém, com base nas informações disponíveis, não se pode prescrever nenhuma dosagem ou esquema de radiação apropriado para todos os pacientes, devendo a terapia ser individualizada (ELLIOTT, TEFFERI, 1999).

A radioterapia continua útil no tratamento de áreas de dor óssea localizada, de implantes hematopoiéticos serosos que levam a derrames, ou de tumores hematopoiéticos extramedulares sintomáticos, principalmente aqueles que comprimem o cérebro e a medula (BERK, 1993).

A quimioterapia é defendida por alguns autores tendo como base o raciocínio de que a mielofibrose é uma desordem da proliferação clonal das células tronco hematopoiéticas (ATHENS, 1998; VERRASTRO, LORENZI, NETO, 1996; LORENZI, 1999). A hidroxauréia é o agente quimioterápico mais usado e pode diminuir o tamanho do fígado e do baço, diminuir ou eliminar sintomas constitucionais, reduzir o número de plaquetas e, em alguns casos, levar a um aumento na concentração de hemoglobina. O efeito da terapia dura

aproximadamente 4 a 5 meses, sendo de grande toxicidade levando ao encerramento da terapia (REILLY, 1997).

Tentou-se o transplante de MO por técnicas convencionais e após a manipulação cirúrgica da cavidade medular óssea no esforço de proporcionar um microambiente melhor para a medula transplantada. Só foram descritos sucessos ocasionais, e esse procedimento deve ser considerado altamente experimental (BERK, 1993). Porém, Harrison (2004) cita que é possível curar alguns pacientes com o transplante, mas devido a altos riscos de mortalidade relacionado ao procedimento, essa técnica é realizada somente em pacientes jovens com um pobre prognóstico.

O transplante de célula hematopoiética alogênica está sendo aplicado em pacientes idosos com MP obtendo resultados satisfatórios/estimulantes. É um tratamento com potencial curativo para os pacientes com doador na família (irmãos), mas também para pacientes sem doadores relacionados (SNYDER, PALMER, STEIN, et al, 2006).

Por ser uma terapia com potencial curativo, os pacientes candidatos ao transplante devem fazê-lo antes de desenvolverem risco. A hora ideal para o transplante permanece indeterminada, porém os estudos sugerem que os melhores resultados são obtidos no início da doença (KERBAUY, GOOLEY, SALE, et al, 2006).

O transplante de células tronco é uma opção nos pacientes jovens (RUNGE, GREGANTE, 2005), no entanto a maioria cursa a doença em idade avançada.

A talidomida também vem sendo usada como uma alternativa no tratamento da mielofibrose (LICHTMAN, BEUTLER, KIPPS, et al, 2006; BORGES, FRÖEHLICH, 2003). Seu exato mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas as hipóteses incluem uma diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF), a inibição da interleucina 12 e produção e coestimulação de linfócitos CD18. Estudos mostram que a talidomida tem propriedades antiangiogênicas, provavelmente por bloquear a ação de potentes fatores angiogênicos como o FGF- β e o VEGF (BORGES, FRÖEHLICH, 2003).

Estudos futuros

A grande expressão de PDGF contribui para o desenvolvimento de doenças e ajuda a desenvolver antagonistas específicos para o PDGF. Esses agonistas incluem anticorpos bloqueadores ou anticorpos mais evoluídos contra as isoformas de PDGF ou receptores de PDGF, bem

como receptores kinases inibidores de baixo peso molecular para PDGF. Os antagonistas seletivos de PDGF podem ser utilizados em modelos pré-clínicos, assim como em tratamento de pacientes tem impulsionado pesquisa para o desenvolvimento do PDGF em algumas doenças como arteriosclerose, desordens fibróticas, e desordens malignas causadas pela ativação autocrina e paracrina de receptores de PDGF (HELDIN, 2004). Dada à complexidade do processo patogênico da MP, propostas alvo necessitam envolver vias ou agentes múltiplos.

Referências Bibliográficas

- ATHENS, J. W. Mielofibrose. In LEE, R. G.; BITHELL, T. C., FOERSTER, J.; ATHENS, J.W., LUKENS, J. N. **Wintrobe-Hematologia Clínica**. 9ª ed. São Paulo: Manole, 1998.
- BERK, P.D. Doenças Mieloproliferativas. In: CECIL, R. L.; WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. **Cecil tratado de medicina interna**. 19.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- CERVANTES, F. **Prognostic Factors and Current Practice in Treatment of Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia: an Update anno 2000**. *Pathol Biol*, v.49, p. 148 – 152, 2001.
- CHAMPLIN R., GOLDE, D. W. As leucemias. In KASPER, BRAUNWALD, FAUCI, HAUSER, LONGO, JAMESON. **Harison-Medicina Interna**. 14ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil LTDA, 1998.
- BERK, P.D. Doenças Mieloproliferativas. In: CECIL, R. L.; WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. **Cecil tratado de medicina interna**. 19.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- BORGES, L. G.; FRÖEHLICH, P. E. **Talidomida – Novas Perspectivas para Utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e Antiangiogênico**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, V. 49, 2003
- ELLIOTT, M. A.; TEFFERI, A. **Splenic Irradiation in Myelofibrosis With Myeloid Metaplasia: a Review**. *Blood Reviews*, v. 13, p. 163 – 170, 1999.
- GIRAUDIER, S.; CHAGRAOUI, H.; KOMURA, E.; BARNACHE, S.; BLANCHET, B.; LECOUEDIC, J. P.; SMITH, D. F.; LARBRET, F.; TAKSIN, A.L.; MOREAU-GACHELIN, F.; CASADEVALL, N.; TULLIEZ, M.; HULIN, A.; DEBILI, N.; VAINCHEMKER, W. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. **Blood**. v. 100, p. 2932-2940, 2002.
- HELDIN, C.H. Platelet-derived growth factor-an introduction. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 15, p. 195-196, 2004.
- JAMRA, M.; LORENZI, T. F. **Leucócitos/ Leucemias/ Linfomas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1983.
- KERBAUY, D. M. B.; GOOLEY, T. A.; SALE, G. E.; FLOWERS, M. E. D.; DONEY, K. C.; GEORGES, G. E.; GREENE, J. E.; LINENBERGER, M.; PETERSDORF, E.; SANDMAIER, B. M.; SCOTT, B. L.; SORROR, M.; STIREQALT, D. L.; STEWART, F. M.; WITHERSPOON, R. P.; STORB, R.; APPELBAUN, F. R.; DEEG, H.

J. Hematopoietic Cell Transplantation as Curative Therapy for Idiopathic Myelofibrosis, Advanced Polycythemia Vera, and Essential Thrombocythemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 13, p. 355 – 365, 2006.

LÉ BOUSSE-KERDILÈS, M.C.; MARTYRÉ, M. C. **Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Ann Hematológica*. v.78, p. 437-444, 1999.

LICHTMAN M.; BEUTLER, A.; KIPPS T.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Williams Hematology**. 7 edição. Mc graw-hill medical. 2006

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia – Procedência e Clínica** . 2ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA, 1999.

MCGARY, E. C., WEBER, K.; MILLS, L.; DOUCET, M.; LEWIS, V.; LEV, D. C.; FIDLER, I. J.; BAR-ELI, M. Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Proliferation of Osteosarcoma Cells by the Novel Tyrosine Kinase Inhibitor STI571. **Clinical Cancer Research** , v.8, p.3584-3591, 2002.

MESA, R. A.; ELLIOTT, M. A.; TEFFERI, A. **Splenectomy in Chronic Myeloid Leukemia and Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.** *Blood Reviews*, v.14, p. 121 – 129, 2000.

RAPAPORT, S. I. **Introdução a Hematologia**. 1ª ed. São Paulo:Harper & Row do Brasil LTDA., 1978.

REILLY, J. T. **Idiopathic Muelofibrosis: Pathogeneses, Natural History and Management.** *Blood Reviews*, v.11, p. 233 – 242, 1997.

RUNGE, M. S.; GREGANTE, M. A. *Medicina Interna de Netter*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SNYDER, D. S.; PALMER, J.; STEIN, A. S.; PULLARKAT, V.; SABEBI, F.; COBEN, S.; VORA, N.; GAAL, K.; NAKAMURA, R.; FORMAN, S. J. **Allogenic Hematopoietic Cell Transplantation Following Reduced Intesity Conditioning for Treatment of Myelofibrosis.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 12, p. 1161 – 1168, 2006.

VANNUCCHI, A. M.; GUGLIEMELLI P.; TEFFERI A. **Advances in Understanding and Management of Myeloproliferative Neoplasms.** *CA Cancer J Clin*, 59;171-191, 2009.

VERRASTRO, T., LORENZI, T. F.; NETO, S. W. **Hematologia e Hemoterapia: fundamentos de morfologia, patologia e clínica**. 1ª ed. São Paulo:Atheneu, 1996.

ZAGO, M. A; FALCÃO, R. P; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

março de 2010.

Ilma.Sra.

Dra.Larissa Christofolletti

Prezada Doutora,

Informamos que recebemos o seu trabalho intitulado **"Patogênese, diagnóstico e tratamento da mielofibrose"** em 18/02/2010.

Aproveitamos para informar que a média de tempo para a efetiva avaliação, com o aceite ou não do trabalho, está sendo de 1 ano a 1 ano e meio, ou seja, atualmente estão sendo avaliados pela direção da Revista, os trabalhos recebidos em Dezembro/2008.

Tão logo, tenhamos um parecer entraremos em contato.

Sem mais para o momento, firmamo-nos.

Cordialmente,

Dr.Mateus Mandu de Souza

Diretor da RBAC