



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

RAQUEL ESTER DALMÁCIO LOBO

**AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA APÓS O TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS**

Belém - PA

2022

RAQUEL ESTER DALMÁCIO LOBO

**AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE
AGUDA APÓS O TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS**

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

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann
Mares Azevedo Ribeiro.**

Belém - PA

2022

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

L799a Lobo, Raquel Ester Dalmacio.
Avaliação de Neutrófilos em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda após o tratamento com quimioterápicos / Raquel Ester Dalmacio Lobo. – 2022.
61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro Ribeiro
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2022.

1. Leucemia Mielóide Aguda, quimioterápicos, neutrófilos . I. Título.

CDD 615.0711

Raquel Ester Dalmacio Lobo

Avaliação dos Neutrófilos em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda após o tratamento com quimioterápicos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

Prof. Dra. Maria Fani Dolabela Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas/UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior Instituição: Instituto de Ciências
Biológicas/ICB

Belém - Pa

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Sônia e minha filha Priscila que são meus pilares, meus exemplos aqui nessa terra, minha força, presentes de Deus. Ofereço também a todos os portadores de Leucemia, esperando que todas as informações aqui relatadas venham de alguma maneira contribuir para que tenham uma qualidade de vida melhor.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Sônia e Paulo, minha Filha Priscila, Minhas irmãs Michele, Marília e Márcia e minha sobrinha Danyelle responsáveis pela minha felicidade.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e carinho.

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

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

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

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

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

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

EPÍGRAFE

“Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.” Josué 1:9

RESUMO

O câncer é uma entidade patológica que na sociedade atual se encontra entre as principais causas de morte no mundo segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS). A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é um tipo de câncer que afeta glóbulos brancos presentes na medula óssea. Sabe-se que uma das principais causas de morte em pacientes com LMA, se dá por infecção. Nos últimos anos, houve um relativo avanço no tratamento para os pacientes com leucemias, porém o tratamento é agressivo e tem como característica a eliminação de células importantes para defesa imune dos pacientes, como a célula denominada neutrófilo. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue circulante e atuam como uma primeira linha de defesa imunológica. Como parte da imunidade inata os neutrófilos protegem o hospedeiro através da fagocitose, liberação de moléculas citotóxicas, ativação do metabolismo oxidativo entre outros mecanismos de defesa. Logo este estudo avaliou alterações quantitativas e qualitativas dos neutrófilos em pacientes com LMA após o tratamento com quimioterápicos. Foram avaliadas amostras de sangue periférico de 8 pacientes, atendidos no Hospital Ophir Loyola, com LMA após quimioterapia no período de pós primeira indução e comparados com 8 controles saudáveis sendo estes funcionários e alunos voluntários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPA que concordaram em participar do estudo. O número de neutrófilos circulantes foi avaliado por meio do leucograma. A função fagocítica dos neutrófilos foi avaliada por meio da fagocitose de partículas de zymosan sensibilizadas e o metabolismo oxidativo por meio do teste de redução do tetrazólio nitro azul (NBT). Os protocolos de quimioterapia utilizados pelos pacientes foram: D3A7 (6/8) que é o esquema de 3 dias de Daunorrubicina + 7 dias de Citarabina (Ara-c) e o Protocolo M3A7(2/8) que é um esquema de 3 dias de Mitoxantrona + 7 dias de Citarabinas (Ara-c). Em relação à análise do número absoluto de neutrófilos, dos oito pacientes, 5 apresentaram neutropenia leve e os outros 3 estavam com taxa de neutrófilos dentro dos valores de referência. A função fagocítica nos grupos controle e LMA obteve média de Índice Fagocítico de 3.99 e 2.31, respectivamente. Quanto a ativação do metabolismo oxidativo o valor do grupo controle e LMA foi de 5% e 2%, respectivamente. Os resultados podem indicar alguns quimioterápicos como as antraciclinas estejam influenciando a função dos neutrófilos após tratamento para LMA, pois apresentaram efeitos nos neutrófilos, *in vitro*, diminuindo a capacidade de fagocitose frente a uma partícula estranha e diminuindo a produção de EROS.

Palavras- Chave: Leucemia Mielóide Aguda, quimioterápicos, neutrófilos

ABSTRACT

Cancer is a pathological entity that in today's society is among the leading causes of death in the world according to estimates by the World Health Organization (WHO). Acute Myeloid Leukemia (AML) is a type of cancer that affects white blood cells present in the bone marrow. It is known that one of the main causes of death in patients with AML is due to infection. In recent years, there has been a relative advance in the treatment of patients with leukemia, but the treatment is aggressive and is characterized by the elimination of important cells for the immune defense of patients, such as the cell called neutrophil. Neutrophils are the most abundant leukocytes in circulating blood and act as a first line of immune defense. As part of innate immunity, neutrophils protect the host through phagocytosis, release of cytotoxic molecules, activation of oxidative metabolism, among other defense mechanisms. Therefore, this study evaluated quantitative and qualitative changes in neutrophils in patients with AML after treatment with chemotherapy. Peripheral blood samples from 8 patients treated at Hospital Ophir Loyola, with AML after chemotherapy in the post-first induction period were evaluated and compared with 8 healthy controls, these employees and volunteer students from the Faculty of Pharmaceutical Sciences of UFPA who agreed to participate in the study. The number of circulating neutrophils was evaluated by means of the leukogram. The phagocytic function of neutrophils was evaluated through phagocytosis of sensitized zymosan particles and oxidative metabolism through the nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test. The chemotherapy protocols used by the patients were: D3A7 (6/8) which is a 3-day regimen of Daunorubicin + 7 days of Cytarabine (Ara-c) and Protocol M3A7(2/8) which is a 3-day regimen of Mitoxantrone + 7 days of Cytarabines (Ara-c). Regarding the analysis of the absolute number of neutrophils, of the eight patients, 5 had mild neutropenia and the other 3 had a neutrophil rate within the reference values. The phagocytic function in the control and AML groups had a mean Phagocytic Index of 3.99 and 2.31, respectively. As for the activation of oxidative metabolism, the value of the control and AML groups was 5% and 2%, respectively. The results may indicate that some chemotherapeutic agents such as anthracyclines are influencing the function of neutrophils after treatment for AML, as they had effects on neutrophils in vitro, decreasing the ability to phagocytose a foreign particle and decreasing the production of ROS.

Keywords: Acute Myeloid Leukemia, chemotherapy, neutrophils

LISTA DE TABELAS

Figura 1: Figura 1 Modelo de mutação associado ao aparecimento de LMA. Mutações de Classe I: conferem ao clone vantagens proliferativas ou de sobrevivência e mutações de Classe II que alteram o processo de diferenciação celular e apoptose.....	23
Figura 2: Daunorrubicina.....	26
Figura 3: Mitoxantrona.....	27
Figura 4: Citarabina.....	28
Figura 5:A cascata clássica de recrutamento de neutrófilos. As etapas sequenciais de recrutamento de neutrófilos da vasculatura para o tecido são descritas. As principais moléculas de adesão empregadas para o recrutamento de neutrófilos são ilustradas.....	26
Figura 6:Mecanismos de morte celular por neutrófilos. Representação da eliminação de patógenos realizados pelos neutrófilos: fagocitose e desgranulação.	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados referentes aos aspectos clínicos dos controles e pacientes com LMA como: sexo, idade, tempo de recuperação dos neutrófilos em dias e protocolo de quimioterapia	38
Tabela 2: Dados referentes ao Hemograma dos portadores de LMA após tratamento de indução com quimioterápicos coletados no HOL	39
Tabela 3: dados referentes ao número absoluto de neutrófilos em pacientes com LMA após quimioterapia de indução à remissão e controle saudáveis	40
Tabela 4: Dados referentes a função fagocítica dos neutrófilos circulantes em pacientes com LMA após quimioterapia de indução	42
Tabela 5: Dados referentes ao metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes em pacientes com LMA após quimioterapia de indução e controles saudáveis....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação da Organização Mundial da Saúde, 2008, para as Leucemias Mielóides Agudas(LMA)	17
Quadro 2: Classificação da gravidade da Neutropenia de acordo com os valores absolutos dos neutrófilos circulantes Fonte: Adaptado de Pereira (2018)	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
ARA-C	Citarabinas
ATP	Adenosina Trifosfato
BMO	Biópsia De Medula Óssea
CBFB	Subunidade Beta do Fator de Ligação ao Núcleo
CD11b	Subunidade α da integrina Mac-1
CD18	Integrina Beta Cadeia 2
CD62L	L-Selectina
CHCM	Concentração Da Hemoglobina Corpuscular Média
CTI	Centro de Tratamento Intensivo
D3A7	Daunorrubicina + 7 dias de Citarabina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DRM	Doença Residual Mínima
E.COLI	Escherichia Coli
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracetato
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food And Drug Administration
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
G-CSFR	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GM-CFS	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HB	Hemoglobina
HG-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos Humano
HOCL	Ácido Hipocloroso
HOL	Hospital Ophir Loyola
HT	Hematócrito
IF	Índice Fagocítico
INCA	Instituto Nacional Do Câncer
INV	Inversão
JAK 1	Janus Quinase 1
JAK2	Janus Quinase 2
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
M3A7	3 Dias de Mitoxantrona + 7 Dias de Citarabina
MPO	Mieloperoxidase
MYH11	Gene codificador da miosina-11
NADPH OXIDASE	Fosfato De Dinucleótido De Nicotinamida e Adenina
NBT	Tetrazólio Nitro Azul
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
O ²	Oxigênio Molecular
O ₋₂	Ânion Superóxido
OH	Radicais De Hidroxila
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salina
PR3	Proteinase 3

PRR	Padrões Receptores
PSGL-1	Ligante 1 Da Glicoproteína Da P-Selectina
PSGL-1	Ligante 1 Da Glicoproteína P-Selectina
RC	Remissão Completa
RDW	Redcell Volume Distributionwidt
SFB	Soro Fetal Bovino
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
T	Translocação
TCLE	Termo De Consentimento Livre E Esclarecido
UFPA	Universidade Federal do Pará
UTI	Unidade De Tratamento Intensivo
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: aspectos gerais	16
2.1.1. Patogênese da leucemia mieloide aguda	18
2.1.2. Tratamento leucemia mielóide aguda	19
2.2. NEUTRÓFILOS	22
2.2.1. Aspectos gerais	22
2.2.2. Fagocitose	25
2.2.3. NADPH oxidase, burst oxidativo e espécies reativas de oxigênio	27
3 OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
4.1. CASUÍSTICA	29
4.1.1. Local de realização do estudo	29
4.1.2. Seleção da amostra.....	29
4.1.3. Critérios de inclusão	30
4.1.4. Critérios de exclusão	30
4.1.5. Aspectos Éticos	30
4.1.6. Coleta de Dados.....	30
4.2. MATERIAL.....	31
4.3. MÉTODOS.....	32
4.3.1. Coleta do material biológico.....	32
4.3.2. Avaliação do hemograma	32
4.3.3. Avaliação da função fagocítica de neutrófilos circulantes	33
4.3.4. Avaliação do metabolismo oxidativo	36
4.3.5. Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES	38
5.2. AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA.....	39
5.2.1. Avaliação do Hemograma.....	39
5.2.2. Avaliação do número absoluto de neutrófilos	40

5.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA	41
5.4. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO	42
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	47
REFERENCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico de uma entidade patológica que pode afetar qualquer parte do corpo. Na sociedade atual é considerado como uma doença crônica não transmissível que se encontra entre as principais causas de morte no mundo segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS 2019).

A Leucemia Mielóide Aguda (LMA) é um tipo de câncer que irá afetar as células presentes na medula óssea. Sendo a medula óssea um tecido gelatinoso que ocupa o interior dos ossos longos e/ou chatos, lá são produzidos os componentes celulares. O termo LMA refere-se a um grupo de doenças hematológicas malignas de curso clínico progressivo e rápido que possuem formas genéticas heterogêneas e são caracterizadas pela proliferação clonal desregulada de células imaturas que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente (HAY MA 2016; ESTEY EH 2018; CAMPREGHER PV2016). A falência da medula óssea e a presença de células imaturas infiltradas em outros órgãos leva o paciente a apresentar sinais e sintomas que podem levá-lo a óbito em poucos meses quando não tratados, devido a rápida progressão da doença.

Em relação a epidemiologia das leucemias, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA 2020), o número de casos novos de Leucemia no Brasil no ano 2020 era de 5.920 novos casos em homens, sendo a quinta mais frequente na Região Norte (4,45/100 mil) em comparação a outros tipos de câncer, e 4.890 novos casos em mulheres, sendo a sexta mais frequente na região Norte (3,55/100 mil). Contudo esses dados podem ter sofrido alterações, com sub notificações devido a pandemia.

O tratamento para LMA consiste em uma quimioterapia inicial de indução, sendo indução a primeira fase do tratamento, que tem como objetivo eliminar do sangue as células de leucemia (blastos) e reduzir seu número na medula óssea. Nos últimos anos, houve um relativo avanço no tratamento para os pacientes com leucemias, porém o tratamento ainda é agressivo e elimina células importantes para defesa imune inata dos pacientes, como as células

denominadas neutrófilos (NUCCI, 2019; HAY, 2016).

Os neutrófilos são os mais numerosos dentre os granulócitos presentes no sangue periférico e são gerados diariamente na medula óssea sendo bem reconhecidos como um dos principais atores que combatem a infecção aguda (KOLACZKOWSKA E KUBES, 2013). Eles são normalmente os primeiros leucócitos a serem recrutados para um local inflamatório e são capazes de eliminar patógenos por múltiplos mecanismos, como fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio.

Sabe-se que uma das principais causas de morte em pacientes com LMA, durante o processo e após a remissão da doença, se dá por infecções oportunistas (CIFTCILER, 2019). Logo se faz necessário avaliar não apenas a quantidade como a função dos neutrófilos após o tratamento com agentes citotóxicos. O conhecimento minucioso dessas alterações poderá auxiliar o profissional da saúde para um melhor direcionamento quanto a terapêutica do paciente bem como proporcionar mais pesquisas nessa área.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA: aspectos gerais

O termo LMA refere-se a um grupo de doenças hematológicas malignas de curso clínico progressivo e rápido que possuem formas genéticas heterogêneas e são caracterizadas pela proliferação clonal desregulada de células imaturas que perderam a capacidade de se diferenciar normalmente (HAY MA, 2016; ESTEY EH, 2018; CAMPREGHER PV, 2016). Essas células além de perderem sua funcionalidade, acumulam-se na medula óssea resultando na produção insuficiente de células sanguíneas normais (NUNES AL, 2016; RANGEL FAL, 2016).

Epidemiologicamente a LMA é mais frequente em adultos com idade média de diagnóstico entre 40 e 63 anos (cerca de 80% dos casos) sendo ligeiramente mais acometida em homens. As taxas de morte anual no Brasil são de 2,8 a cada 100 mil habitantes por ano e 26% da população possui uma sobrevida de 5 anos após o diagnóstico da doença. (INCA, 2019).

Com relação a etiologia a LMA pode se desenvolver de forma primária ou secundária a outros distúrbios proliferativos como: as neoplasias mieloproliferativas (NMP) em que há um aumento de uma ou mais linhagens sanguíneas e Síndromes Mielodisplásicas (SMD) caracterizada pela hematopoese ineficaz. (RANGEL FAL, 2016). Outros fatores que se destacam para etiologia desta neoplasia é a exposição à radiação ionizante e exposição ao benzeno encontrado na fumaça do cigarro (OLIVEIRA JP 2017). Essas exposições podem causar, por exemplo, alterações nos cromossomos 5 e 7 e translocações nos cromossomos 8 e 21 (OLIVEIRA JP 2017)

Para o diagnóstico são utilizados critérios morfológicos, imunofenotípicos e moleculares. (OMS, 2016; NUNES AL, 2016). A investigação para o diagnóstico é precedida de uma suspeita clínica associada a alterações no hemograma do paciente sendo este uma ferramenta essencial tanto para o diagnóstico quanto no seguimento da doença (NUNES AL 2016). As células

apresentam alguns marcadores mielóides, incluindo bastões de Auer (grânulos aberrantes), alteração citoquímica (negro de Sudan, mieloperoxidase ou esterase não específica) e antígenos de superfície específicos (MS 2014). É necessário a identificação de $\geq 20\%$ de blastos mielóides leucêmicos na medula óssea ou no sangue periférico, ou, $< 20\%$ de blastos mielóides quando há presença de anormalidade cito genéticas específicas para LMA (OMS, 2016; ESTEY, 2018).

Com relação a sintomatologia fadiga, perda de peso, febre e palidez são queixas comuns. Também podem ser observados petéquias, hematomas e sangramentos decorrentes da trombocitopenia (NUNES 2016; ESTEY 2018). Estas manifestações clínicas ocorrem devido ao acúmulo de células mielóides malignas e pouco diferenciadas na medula óssea, no sangue periférico e em outros órgãos mais vascularizados. As células leucêmicas estão presentes na corrente sanguínea e são assim carregadas a todos os órgãos e tecidos, mas há certa predileção das células de se aninharem em tecidos ricamente vascularizados e naqueles que já tiveram, no período embrionário ou fetal, a função hemoformadora como fígado e baço. Daí a hepato e a esplenomegalia frequentemente observadas (LORENZI, 2006).

A classificação das leucemias passou por diversas mudanças ao longo da história sendo que hoje a mais utilizada é a Classificação da OMS, que dividiu a LMA em categorias (Quadro 1) de acordo com a combinação de alterações de morfologia, imunofenótipo, aspectos genético-moleculares e síndromes clínicas (OLIVEIRA, 2017).

LMA: com *anormalidades genéticas recorrentes*
 LMA: com *t (8; 21) (q22; q22); RUNX1-RUNX1T1*
 LMA: com *inv (16) (p13.1q22) ou t (16; 16) (p13.1; q22); CBFβ-MYH11*
 Leucemia promielocítica aguda: com *t (15; 17) (q22; q12); PML-RARE*
 LMA: com *t (9; 11) (p22; q23); MLLT3-MLL*
 LMA: com *t (6; 9) (p23; q34); DEK-NUP214*
 LMA: com *inv (3) (q21q26.2) ou t (3; 3) (q21; q26.2); RPN1-EVI1*
 LMA (megacarioblástica): com *t (1; 22) (p13; q13); RBM15-MKL1*
 LMA: com *mutações NPM1*
 LMA: com *mutações CEBPA*
 LMA relacionada a *alterações mielodisplásicas*
 Relacionado ao *tratamento de neoplasias mielóides*
 Leucemia mieloide aguda, *não especificada*

Quadro 1 – Classificação da Organização Mundial da Saúde, 2008, para as Leucemias Mielóides Agudas (LMA)

Fonte: Adaptada de OMS (2016)

2.1.1. Patogênese da leucemia mieloide aguda

A LMA é uma doença que está associada a alterações genéticas, cromossômicas (translocações, inversões e deleções de cromossomos), mutações somáticas, mudanças na expressão gênica e na regulação epigenética (SANDERS 2013). Acredita-se que a patogênese esteja associada ao acúmulo dessas modificações gênicas que conferem ao clone das células-tronco leucêmicas capacidade proliferativa e perda da função de resposta a sinais de diferenciação e morte celular (OLIVEIRA 2016).

Estudo feito por alguns autores levaram ao desenvolvimento de um modelo de leucemogênese que oferece uma estrutura conceitual para classificar as várias mutações associadas a LMA. De acordo com esse modelo a LMA está atreladaa pelo menos dois tipos de mutações: mutações de classe I em que há ativação de vias que conferem ao clone características de proliferação ou de sobrevivência e mutações de classe II que afetam os processos de diferenciação celular e apoptose. Recentemente um terceiro grupo de mutações que não se enquadram nessas categorias foi identificado que incluem genes envolvidos na epigenética molecular (Figura 1). (GILLILAND; GRIFFIN, 2002; HAY 2016).

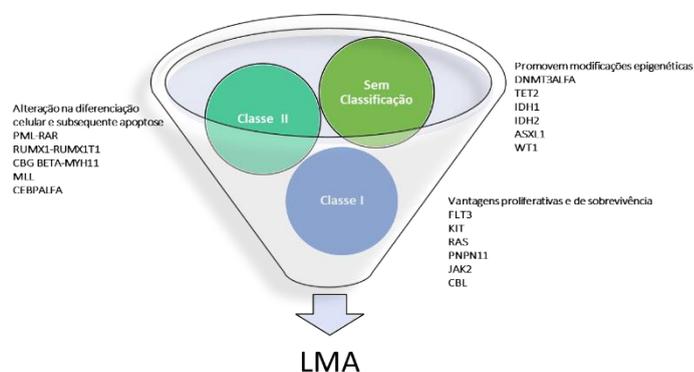


Figura 1: Modelo de mutação associado ao aparecimento de LMA. Mutações de Classe I: conferem ao clone vantagens proliferativas ou de sobrevivência e mutações de Classe II que alteram o processo de diferenciação celular e apoptose.

Fonte: HAY (2016)

Mutações que afetam os genes FLT3, KIT e os genes RAS são consideradas mutações de classe I, enquanto que alterações cromossômicas como t(8;21), inv(16) e t(15;17) que geram rearranjos gênicos CBFβ/MYH11 e PML/RARA, juntamente com as mutações nos genes RUNX1, CEBPA e MLL são consideradas integrantes da classe II. De acordo com esse modelo o acúmulo de mutações de classe I e II culminaria no desenvolvimento de progenitores hematopoéticos transformados capazes de propagar o fenótipo leucêmico (GILLILAND; GRIFFIN, 2002).

2.1.2. Tratamento Leucemia Mielóide Aguda

Os pacientes elegíveis primeiro são submetidos à terapia de indução para atingir a Remissão Completa (RC), sendo RC o termo utilizado em Medicina para designar a fase da doença em que não há sinais de atividade dela, mas não é possível concluir como cura. Uma resposta favorável à terapia de indução deve ser seguida por terapia de consolidação a fim de erradicar qualquer doença residual mínima e alcançar uma remissão duradoura (NUCCI 2019; HAY 2016).

Nos dias atuais o tratamento considerado padrão para atingir a remissão da LMA consiste na associação de uma Antraciclina nos dias 1-3 e 7 dias de citarabinas (Ara-C), o chamado regime “3 + 7”. As antraciclinas como a daunorrubicina, epirrubicina, mitoxantrona, idarrubicina e doxorubicina são os quimioterápicos mais usados na terapêutica farmacológica. Após a obtenção da remissão da doença a administração de dois a quatro cursos de consolidação com doses mais altas de citarabina tem sido a opção mais comum para os pacientes mais jovens. (NUCCI 2019).

O objetivo do tratamento da LMA é atingir a RC, ou seja, a medula óssea com menos de 5% de mieloblastos e no sangue periférico neutrófilos acima de 1.000/mm³ e plaquetas acima de 100.000/mm³ (MS 2014).

2.1.2.1 Daunorrubicina

Daunorrubicina é um fármaco da classe das antraciclinas que representam uma importante classe de agentes antineoplásicos. Os compostos antineoplásicos

afetam o crescimento celular e a funcionalidade das células em divisão ativa. Evidências sugerem que as antraciclinas apresentam três mecanismos de ação. Um seria pela formação de ligações com os grupos fosfolipídeos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de íons. Também promoveriam a formação do radical livre do oxigênio e da semiquinona através de um processo redutor enzimático. Um outro modo de ação seria a formação de ligações interfilamentares com o DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos da macromolécula (DNA) logo a antraciclinas nibe a síntese do DNA e do ácido ribonucleico DNA-dependente. Essa inibição ocorre pela formação de um complexo com o DNA com uma intercalação entre os pares de base impedindo que a hélice se enrole (GRANCH, 1988; ENACHE, 2016).

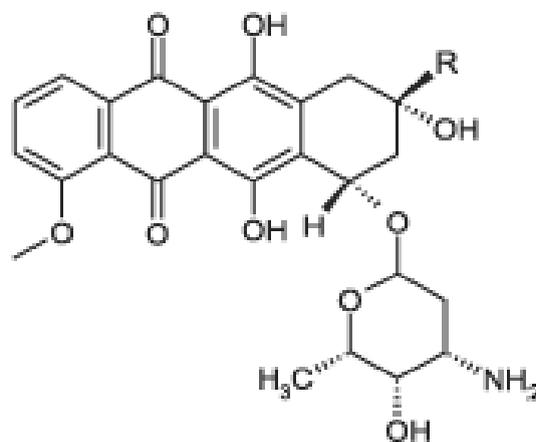


Figura 2: Daunorubicina

2.1.2.2 Mitoxantrona

A mitoxantrona (1,4-dihidroxi-5,8-bis[2-(2-hidroxietilamino)etilamino]antraceno-9,10-diona) é um fármaco anticancerígeno sintético utilizado clinicamente no tratamento de diversos tipos de câncer como: câncer de mama, leucemia aguda, linfoma e câncer de próstata e, mais recentemente, nas formas ativas de esclerose múltipla sendo um inibidor da enzima topoisomerase tipo II, interrompe a síntese e reparo do DNA em células sãs e cancerosas. Mitoxantrona é um agente DNA-reativo. Apresenta efeito citocida sobre células humanas cultivadas, proliferantes ou não, o

que sugere uma atividade contra neoplasias de rápida proliferação e lento crescimento. (HEO SK, 2020)

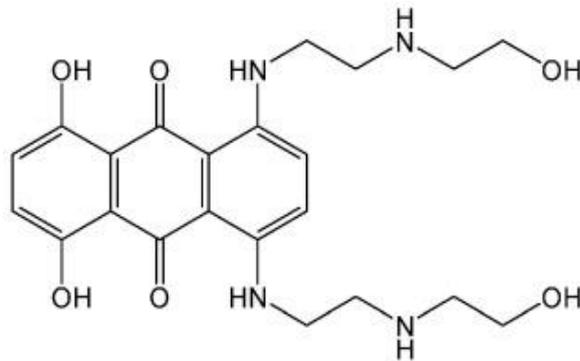


Figura 3: Mitoxantrona

2.1.2.2. Citarabina

A citarabina (1-β-D-arabinofuranosilcitosina, citosina arabinosídeo, Ara-C), figura 4, tem sido usada como terapia convencional para LMA há mais de 40 anos e representa um protótipo da classe de análogos de nucleosídeos de agentes antineoplásicos e continua sendo uma das drogas mais eficazes utilizadas no tratamento da leucemia aguda, bem como de outras neoplasias hematopoiéticas. Ela retarda a síntese de DNA na fase S do ciclo celular, e sua ação está relacionada principalmente à fragmentação do DNA e terminação da cadeia. Geralmente é prescrita sozinho ou em combinação com outros medicamentos. A terapia de indução consistindo de Ara-C em combinação com antraciclinas leva a respostas em aproximadamente 60% dos pacientes adultos com LMA. (HEO SK, 2020)

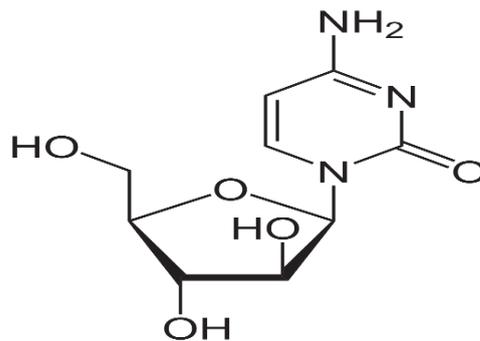


Figura 4: Citarabina

É esperado que o tratamento com citotóxicos irá ocasionar no paciente um período de pancitopenia grave durante 3 a 4 semanas, ou seja, diminuição completa das células do sangue, inclusive neutrófilos necessitando de tratamento de suportes e por vezes internação em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (MS 2014).

2.2. NEUTRÓFILOS

2.2.1. Aspectos gerais

Os neutrófilos são um tipo de leucócito polimorfonuclear, produzidos e armazenados na medula óssea. São bem reconhecidos como um dos principais atores durante a inflamação aguda (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). Eles são normalmente os primeiros leucócitos a serem recrutados para um local inflamatório e são capazes de eliminar patógenos por múltiplos mecanismos. (PEDROSA, 2013). Na medula óssea a produção de neutrófilos ocorre a partir de células hematopoiéticas pluripotentes sob estímulos de numerosos mediadores, em especial os hG-CFS e de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CFS) (PEDROSA, 2013).

Nos humanos os neutrófilos representam 50-70% de todos os leucócitos circulantes. O valor de referência de neutrófilo segmentado circulante no sangue varia entre 1600 a 8000 células por mm^3 . Pacientes apresentando neutrófilos com valor <1500 caracterizam neutropenia. Existem três classificações de severidade de neutropenia baseado na contagem absoluta de neutrófilos (Quadro 2): Leve,

Moderada e Severa. (PEREIRA,2018).

Severidade da Neutropenia	Contagem Absoluta de neutrófilos
Leve	1.000 a 1500 células por mm ³
Moderada	500 a 1000 células por mm ³
Grave	< 500 células por mm ³

Quadro 2- Classificação da gravidade da Neutropenia de acordo com os valores absolutos dos neutrófilos circulantes Fonte: Adaptado de Pereira (2018)

Em circulação os neutrófilos maduros têm um núcleo segmentado e aproximadamente 7–10 μ m de diâmetro com um citoplasma enriquecido com grânulos e vesículas secretoras (BORREGAARD, 2010). Os neutrófilos possuem uma meia-vida que pode variar entre 6 a 12 horas na circulação. No entanto, esse tempo de estender a vida dessas células há alguns dias (ALMEIDA et al. 2012).

Durante a inflamação a cascata inicial de recrutamento de neutrófilos é acionada por alterações na superfície das células endoteliais como resultados de mediadores inflamatórios (citocinas, leucotrienos e histamina) liberados por leucócitos residentes no tecido que se encontram patógenos (LIEW e KUBES, 2019). Além disso as células endoteliais também podem ser ativadas diretamente por meio de reconhecimento de padrões receptores (PRR) que detectam patógenos. Quando estas células chegam ao local da inflamação ocorrem interações transitórias entre selectinas e células do endotélio que resultam em ligação e rolamento de neutrófilos, que são os primeiros passos da cascata de recrutamento de leucócitos. Uma vez ativados ocorre o aumento da expressão de selectinas sendo elas: E-Selectina e P- Selectina expressas no endotélio e Ligante-1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1) e L-Selectina (CD62L) expressas pelos neutrófilos (PHILLIPSON e KUBES, 2011).

Essas últimas duas moléculas de adesão maximizam o recrutamento de neutrófilos por meio de funções sobrepostas. Tanto a P-selectina quanto a E-selectina se ligam aos seus ligantes glicosilados como o ligante-1 da glicoproteína da P-selectina (PSGL-1) que leva à captura (isto é, amarração) de neutrófilos para células endoteliais e permite que os neutrófilos comecem a rolar na direção do fluxo

sanguíneo na superfície do endotélio (PHILLIPSON e KUBES, 2011).

Esta etapa permite que os neutrófilos sejam capturados por células do endotélio próximas da área inflamada. Os receptores acoplados à proteína G nos neutrófilos rolantes ligam as quimiocinas sequestradas no endotélio, gerando sinais "de dentro para fora" que induzem mudanças conformacionais em integrinas $\beta 2$ expressas por neutrófilos que aumentam sua avidéz e afinidade, resultando em detenção de neutrófilos e rastreamento intravascular subsequente ao local de transmigração (PHILLIPSON, 2006; PHILLIPSON e KUBES, 2011).

Neutrófilos em rotação aumentam sua chance de encontrar endotélio com muitas quimiocinas (químioatraentes) que são moléculas carregadas positivamente immobilizadas em células endoteliais através da ligação a sulfatos de heparano carregados negativamente (PHILLIPSON e KUBES, 2011). Os sulfatos de heparana fazem parte do glicocálice que cobre as células endoteliais e servem como âncoras para quimiocinas para evitar forças de cisalhamento no sangue evitando que sejam levados. Podemos observar na Figura 2 a cascata de recrutamento dos neutrófilos para o local de inflamação.

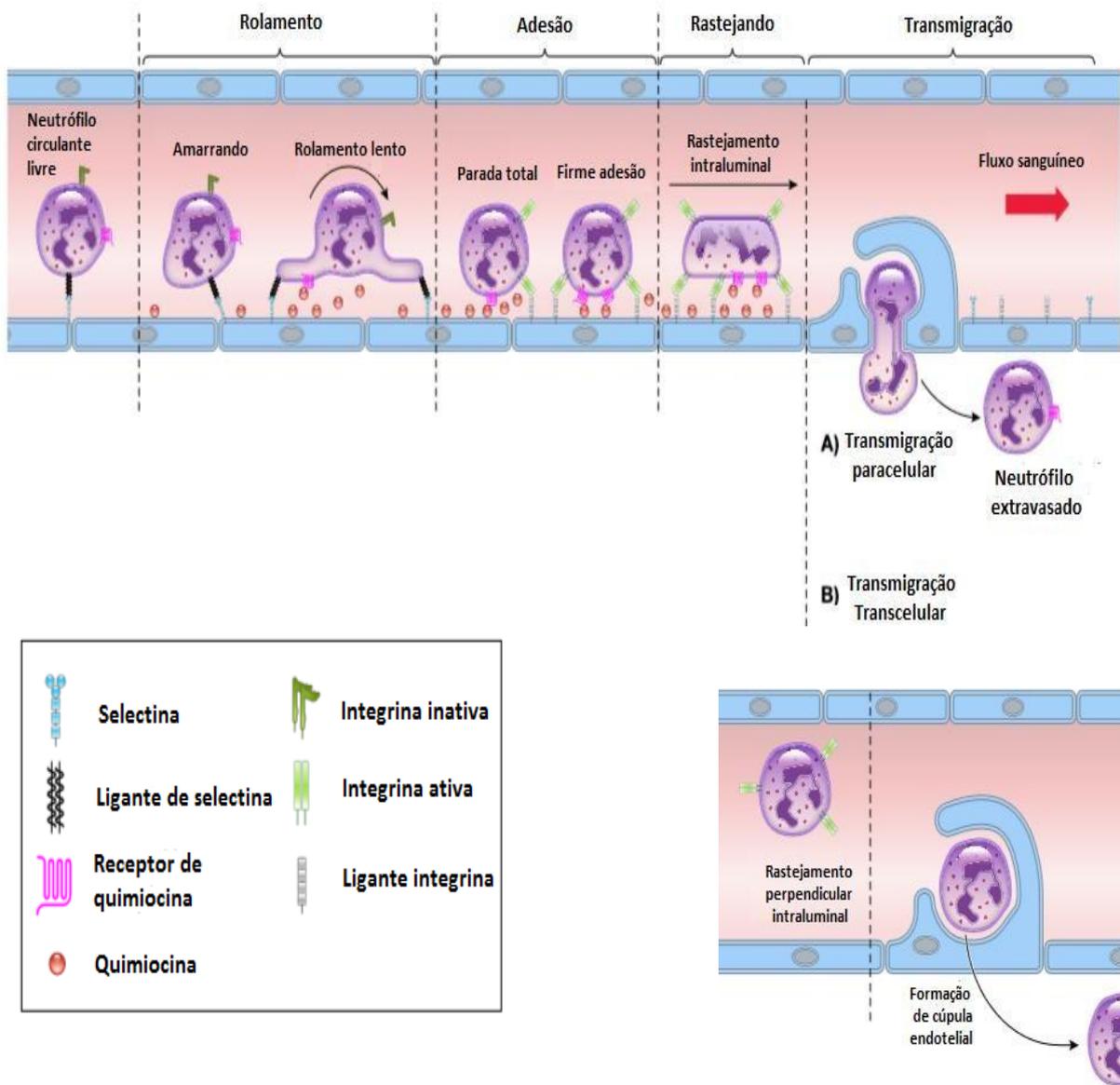


Figura 5:A cascata clássica de recrutamento de neutrófilos. As etapas sequenciais de recrutamento de neutrófilos da vasculatura para o tecido são descritas. As principais moléculas de adesão empregadas para o recrutamento de neutrófilos são ilustradas

2.2.2. Fagocitose

Os neutrófilos podem eliminar patógenos por vários meios, tanto intra quanto extracelularmente, esse processo é denominado de fagocitose. A fagocitose é um mecanismo de defesa essencial da resposta imune inata. O processo se inicia a partir do contato da célula fagocitária com o agente invasor e é acompanhado de sinais que ativam processos celulares tais como rearranjo do citoesqueleto, ativação de mecanismos microbicidas, produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação de apoptose celular e mecanismos de apresentação de antígenos para as células do sistema imune adaptativo (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OLIVEIRA, 2012).

No processo de reconhecimento das partículas e sinalizações intracelulares pode-se dizer que o processo de fagocitose ocorre através do reconhecimento e internalização do patógeno, sinalização intracelular e acoplamento da atividade fagocitária à resposta inflamatória local e sistêmica (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; OLIVEIRA, 2012). O agente invasor pode ser reconhecido tanto através da sua ligação direta aos receptores, quanto através da ligação de opsoninas em sua superfície aos receptores localizados na membrana das células fagocitárias. Na fagocitose intracelular, as sinalizações da presença de partículas sinalizadoras induzem a polimerização de moléculas de actina e a membrana citoplasmática estende-se por toda a partícula invasora, levando-a ao centro da célula. O fagossoma transforma-se em fagolisossoma, resultando na liberação do conteúdo enzimático de grânulos primários e secundários que são ricos de hidrolases ácidas, enzimas microbicidas, mieloperoxidase (MPO), lisosima, proteinases neutras (elastase, catepsina G e proteinase 3 - PR3), levando o patógeno a ser morto e digerido (ADEREM, 2003; PEDROZA, 2013; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013) (Figura 3).

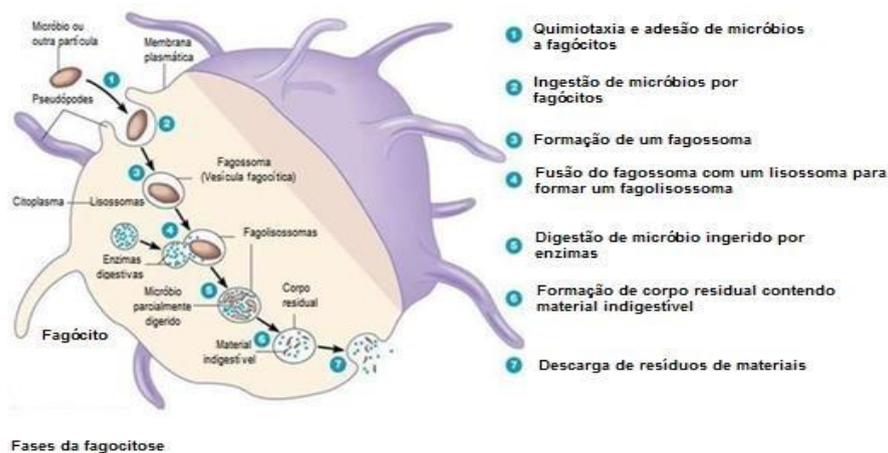


Figura 6: Mecanismos de morte celular por neutrófilos. Representação da eliminação de patógenos realizados pelos neutrófilos: fagocitose e desgranulação.

2.2.3. NADPH oxidase, burst oxidativo e espécies reativas de oxigênio

O Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH oxidase) é um complexo enzimático localizado na membrana plasmática dos fagócitos, é composto pela junção de vários constituintes na membrana citoplasmática em resposta a um sinal que ativa o neutrófilo. Dentre estes compostos estão as proteínas citossólicas de 47 KD, 67 KD, denominadas respectivamente p47-phox e p67-phox, uma proteína G citossólica, denominada p21 rac, e um citocromo b558 ligado à membrana, sendo este constituído por uma subunidade proteica de 22 KD, p22phox, e uma subunidade de glicoproteína de 91 KD, gp91phox, ambas contendo o grupo heme (ROSEN et al. 1999; PESSOA, 2009).

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

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

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar as alterações quantitativas e qualitativas dos neutrófilos em pacientes com LMA que realizaram quimioterapia de indução.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar o número de neutrófilos circulantes em portadores de LMA após tratamento com quimioterápicos através do hemograma;

-Avaliar a função fagocítica, *in vitro*, dos neutrófilos;

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

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1. Local de realização do estudo

Os participantes desse estudo foram selecionados no ambulatório do setor de hematologia do Hospital Ophir Loyola (HOL), Belém-PA. A escolha do local foi determinada por se tratar de uma Unidade de Referência no tratamento de pacientes adultos com doenças oncológicas na região Norte do país que admite casos novos vindos do interior do estado e do município de Belém.

Os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

4.1.2. Seleção da amostra

No total 16 indivíduos adultos (8 pacientes e 8 controles) participaram da pesquisa e foram orientados especificamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os benefícios, riscos e procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa. Quando em conformidade com os esclarecimentos prestados, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) passando a fazer parte do estudo.

Os participantes foram alocados em dois grupos:

-Grupo Controle: composto por 8 indivíduos adultos de ambos os sexos com idades proporcionais aos dos pacientes do grupo com LMA saudáveis e se declararam que não possuíam o hábito de consumir bebidas alcoólicas ou medicamentos de uso contínuo. Apresentando parâmetros hematológicos dentro dos valores de referência sem ter alguma infecção e/ou inflamação. Sendo voluntários desse grupo funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFPA que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE. A coleta de sangue destes voluntários foi realizada no Laboratório de Hematologia Clínica da referida faculdade.

-Grupo diagnosticado com LMA após a quimioterapia de indução: composto por 8 pacientes adultos com idade igual ou superior a 18 anos de ambos os sexos. Foi realizada nesse grupo uma coleta sanguínea no período em que os pacientes recuperaram os neutrófilos, ou seja, de 20 a 30 dias pós QT . Estes pacientes não utilizaram Granulokine para recuperação dos neutrófilos circulantes .

4.1.3. Critérios de inclusão

Foram selecionados para o estudo pacientes maiores de 18 anos atendidos no HOL diagnosticados com LMA após o tratamento de indução. A medula óssea com menos de 5% de mieloblastos e no sangue periférico neutrófilos acima de 1.000/mm³ e plaquetas acima de 100.000/mm³.

O tempo para que fosse realizada a coleta sanguínea, ou seja, tempo em que o paciente recuperou os neutrófilos após o tratamento com quimioterápicos, variou entre 26 e 35 dias.

4.1.4. Critérios de exclusão

Pacientes que não concordaram em participar do estudo ou pacientes que estavam em estado de imunossupressão (diagnóstico de doença imunossupressora ou uso de medicamentos imunossupressores), bem como pacientes com outros tipos de neoplasias, visto que essas condições podem alterar o perfil fagocítico.

4.1.5. Aspectos Éticos

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

4.2. MATERIAL

Neste estudo foram utilizados ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA) 2% (BIOLAB), Histopaque®-1077 (SIGMA-ALDRICH®), tampão fosfato salina (PBS) 10x(16 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 4,336 g de Na₂HPO₄·7H₂O e 0,4 g de KH₂PO₄ em 200 mL de água destilada), solução de hemólise (16,05 g de NH₄CL, 1,680 g de NaHCO₃, 0,74 g de EDTA em 2 litros de água destilada) RPMI-1640

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), soro fetal bovino (SFB) 0,01% e penicilina estreptomicina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), NBT (SIGMA-ALDRICH®), corante leishman (1,5 g de Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa em 1 litro de Metanol).

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada por meio dos prontuários dos pacientes em que foram coletadas as seguintes informações: Nome, idade, sexo, patologia diagnosticada, protocolo de quimioterapia, hemograma, bem como tempo de internação e presença de infecção nesse período.

4.3.2. Coleta do material biológico

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

4.3.3. Avaliação do hemograma

As amostras foram analisadas por meio de metodologia semi automatizada. Os seguintes parâmetros foram analisados: hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e plaquetas.

Para a avaliação da diferencial leucocitária e de possíveis alterações celulares, como piquilocitose, o esfregaço sanguíneo foi realizado em todas as amostras, utilizando a coloração panótica e posteriormente submetido à microscopia óptica em objetiva de imersão.

4.3.4. Avaliação da função fagocítica de neutrófilos circulantes

4.3.4.1. *Obtenção e Preparo dos Neutrófilos Circulantes*

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

Foi realizada a contagem total de leucócitos (na câmara de nebaur) adicionando-se solução de células à solução de Turk. A contagem diferencial foi realizada em lâmina preparada com 20 µl da solução de células em citocentrífuga corada e observada em microscópio com objetiva de imersão (100x). Foram contadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares — mononucleares, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

4.3.4.2. Avaliação da Capacidade Fagocítica

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

4.3.5. Avaliação do metabolismo oxidativo

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

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

5 RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES

Nessa pesquisa foram utilizadas amostras de sangue de dois grupos experimentais como demonstrado na tabela 1: grupo controle composto por indivíduos saudáveis (n=8) com média de idade (média±DP) 41,7±15,0 anos e grupo de pacientes diagnosticados com LMA (n=8) com média de idade (média±DP) 40,6±14,6 anos.

Os protocolos de quimioterapia utilizados pelos pacientes foram: D3A7 (6/8) que é o esquema de 3 dias de Daunorrubicina + 7 dias de Citarabina (Ara-c) e o Protocolo M3A7(2/8) que é um esquema de 3 dias de Mitoxantrona + 7 dias de Citarabinas (Ara-c). Tanto a Daunorrubicina quanto a Mitoxantrona são exemplos de Antraciclinas comumente utilizadas em pacientes com LMA. Quanto ao gênero 3 eram do sexo feminino e 5 do sexo masculino.

Tabela 1: Dados referentes aos aspectos clínicos dos pacientes com LMA e controle como: gênero, idade e protocolo de quimioterapia

	IDADE (LMA)	IDADE (CONTROLE)	GÊNERO (LMA)	GÊNERO (CONTROLE)	QUIMIOTERAPIA (LMA)
1	29	28	F	F	D3A7
2	21	21	M	M	D3A7
3	40	45	M	M	D3A7
4	60	64	M	M	M3A7
5	49	49	F	F	D3A7
6	23	23	M	M	D3A7
7	41	41	F	F	D3A7
8	64	63	M	M	M3A7
MÉDIA	40,6	41,75			
DP	14,6	15,0			

DP: desvio padrão; D3A7: danurrubicina e Ara c; M3A7: mitoxantrona e Ara c; F: Feminino; M: masculino; LMA: leucemia mieloide aguda

5.2. AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA

5.2.1. Avaliação do Hemograma

Por meio do hemograma foram avaliados os parâmetros expostos na Tabela 2. Houve diferença estatística nos parâmetros de hemoglobina ($p > 0,001$), hematócrito ($p = 0,0026$) e Leucócitos totais ($p = 0,0061$) quando comparados com grupo controle.

Tabela 2: Dados referentes ao Hemograma dos portadores de LMA após tratamento de indução com quimioterápicos coletados no HOL

Parâmetros hematológicos	Controle	LMA
Hb (g/dl)	12,3±0,5	8,1±0,9*
Ht (%)	39,3±0,9	25±2,1*
Plaquetas (mil/mm³)	254±49	191.5±90
Leucócitos totais (mil/mm³)	7,8±2,4	2.7±1.4*

Os valores apresentados representam média e desvio padrão; Abreviaturas: Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; LMA: Leucemia Mielóide Aguda HOL: Hospital Ophir Loyola

5.2.2. Avaliação do número absoluto de neutrófilos

O número absoluto de neutrófilos foi avaliado por meio do hemograma. O grupo controle obteve uma média±desvio padrão de 4.164 cél./mm³ ± 1700 já os pacientes com LMA que receberam quimioterapia de indução obtiveram o número absoluto de neutrófilos uma média±desvio padrão de 1607,1 cél./mm³ ±633,2.

Em relação a análise dos nossos resultados, 5 dos 8 pacientes apresentaram taxa de neutrófilos entre 1000 e 1500 células por mm³ apresentando neutropenia leve e os outros 3 dos 8 pacientes estavam com taxa de neutrófilos dentro dos valores de referência (>1600 células por mm³).

Tabela 3: dados referentes ao número absoluto de neutrófilos em pacientes com LMA após quimioterapia de indução à remissão e controle saudáveis

	Neutrófilos Controle	Neutrófilos LMA
1	6960 cél. /mm ³	1256 cél./mm ³
2	2569 cél. /mm ³	2499 cél./mm ³
3	3976 cél./mm ³	1139 cél./mm ³
4	4452 cél./mm ³	1452 cél./mm ³
5	5256 cél./mm ³	1056 cél./mm ³
6	1740 cél./mm ³	2740 cél./mm ³
7	4352 cél./mm ³	1352 cél. /mm ³
8	2508 cél./mm ³	1686 cél./mm ³
Média	4164 cél./mm³	1647,5 cél./mm³
Dp	1.700	633

Dp: desvio padrão

5.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA

A função fagocítica foi analisada utilizando o zimosan sensibilizado como partícula como demonstrado na **Figura 4** em que “A” representa um neutrófilo sem fagocitose e “B” um neutrófilo fagocitando partículas de zimosan.

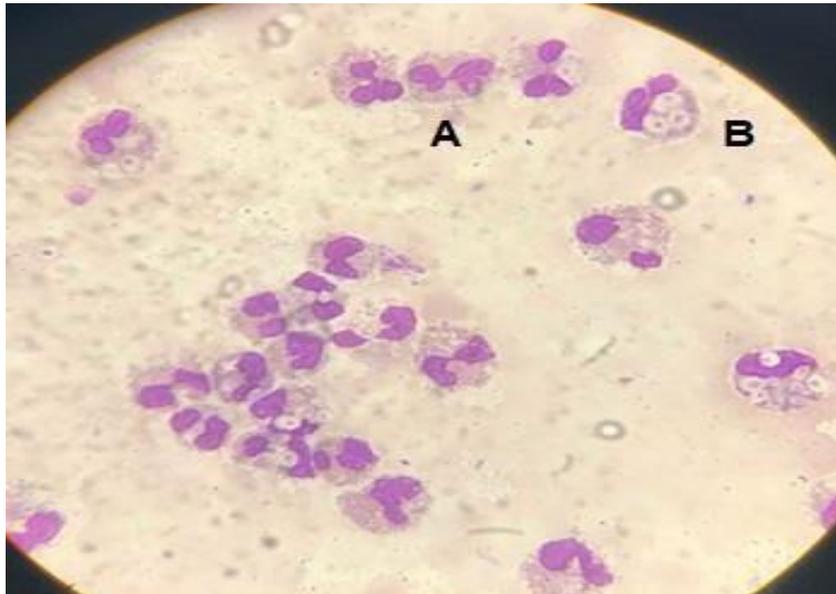


Figura 4 Neutrófilo sem partícula fagocitada (A); neutrófilo fagocitando partículas de zimosan (B). Coloração Leishman. Aumento 100x

Foi avaliada o IF nos grupos controle com resultado de média \pm desvio padrão de $3,99 \pm 0,613$ e em pacientes com LMA após indução à remissão com o valor de $2,31 \pm 0,72$. Os dados referentes a função fagocítica dos neutrófilos do pacientes mais controle saudáveis estão demonstrado na tabela 4.

Tabela 4: Dados referentes a função fagocítica dos neutrófilos circulantes em pacientes com LMA após quimioterapia de indução

Função fagocítica		
	Controle	Pacientes
1	3,7	3,4
2	3,4	2,88
3	4,66	1,65
4	4,5	2,94
5	3,84	2,29
6	4,2	1,47
7	3	1,5
8	4,66	2,4
Média	3,995	2,31625
DP	0,613724	0,72853939

DP: Desvio Padrão

5.4. AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO

O neutrófilo foi considerado NBT-positivo quando apresentou qualquer grânulo intracitoplasmático de coloração azul a negro, independentemente do número e tamanho. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos. Conforme descrito por Pasternak et al. (1974).

Quanto à ativação do metabolismo oxidativo em pacientes com LMA ela variou entre 1% e 4% sendo a média \pm desvio padrão 2% \pm 0,01 como descrito na tabela 5. Já o grupo controle variou entre 9% e 3% sendo a média \pm desvio padrão de 5% \pm 0,1.

Tabela 5: Dados referentes ao metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes em pacientes com LMA após quimioterapia de indução e controles saudáveis

NBT		
	Controle	Pacientes
1	9%	2%
2	5%	1%
3	6%	2%
4	4%	4%
5	5%	4%
6	7%	1%
7	4%	2%
8	3%	3%
Média	5%	2%
DP	0,019226098	0,01111024

Dp: desvio padrão

6 DISCUSSÃO

As características demográficas da LMA, de acordo com os dados da literatura, é que ela está presente principalmente em adultos, entre 40 e 70 anos, e há uma ligeira prevalência para o sexo masculino. (RANGEL 2016). Nosso estudo demonstrou que pacientes com LMA apresentaram idade média de 40 anos (DP±14anos) no momento diagnóstico bem como incidência no sexo masculino corroborando assim com a literatura.

O tratamento para LMA, no Brasil, é utilizado há aproximadamente 3 décadas e consiste no esquema de antraciclinas e citarabinas com protocolos de indução para atingir a RC (OLIVEIRA 2017). O protocolo mais utilizado no nosso estudo foi o D3A7(6/8) utilizado geralmente em pacientes jovens sem doenças pré-existentes(AZEVEDO 2009). O protocolo M3A7 foi menos utilizado em nosso estudo (2/8). Este protocolo é comumente bem aplicado em idosos ou em pacientes com risco de cardiopatia, pois a mitoxantrona é menos cardiotóxica sendo utilizada com mais segurança nesses pacientes (AZEVEDO 2009). A maior parte dos pacientes do nosso estudo realizaram o protocolo D3A7 este resultado pode ser justificado devido a não prevalência de idosos.

Neste estudo foi demonstrado que a maioria dos pacientes com LMA estavam apresentando neutropenia leve, porém estes pacientes estão mais susceptíveis a neutropenia febril que é uma emergência clínica comum em pacientes oncológicos, principalmente naqueles com doenças hematológicas (ex.: leucemia aguda) logo, indivíduos neutropênicos apresentam mecanismos de defesa imunológica comprometidos e, portanto, ficam suscetíveis a infecções graves (ANNA LPS, 2020).

Além disso apresentaram plaquetas dentro dos valores de referência e não apresentaram blastos circulantes no hemograma. Pode-se deduzir, que de acordo com a quantidade de células e com a literatura, que esses pacientes apresentam menos risco de sofrerem hemorragias, devido ao número de plaquetas (AZEVEDO,2015).

Ao avaliar o IF destes pacientes, mesmo após a hematopoese natural em que essas células deveriam apresentar-se normais, foi observado uma diminuição da capacidade de fagocitar partículas quando comparada com grupo controle. Significando dizer que, apesar do número de neutrófilos apresentados no hemograma, não se apresentam em risco moderado ou grave para infecção baseado em classificações pré-existentes, estes pacientes podem estar mais susceptíveis a infecções. Concordando com a ideia de que a análise apenas quantitativa não se torna suficiente para avaliar o verdadeiro quadro desses pacientes.

Com o propósito de complementar os ensaios de fagocitose, realizou-se o teste do NBT. Por meio desse teste é possível verificar se o sistema NADPH oxidase inicia um processo chamado de explosão respiratória. Khan MA et al 2019 demonstraram que as antraciclinas agem de forma supressora do Sistema NADPH dos neutrófilos, pois dificultam o desenrolamento da cromatina do DNA ao interagir com a topoisomerase-2 do DNA, um complexo necessário para as fases de replicação e transcrição. Consequentemente há uma diminuição de EROS, substância essencial para atividade microbicida dos neutrófilos.

Uma vez estimulados, os neutrófilos manifestam um aumento do consumo de oxigênio, fazendo com que esse mecanismo produza grandes quantidades de superóxido e peróxido de hidrogênio, demonstrando grande relevância para a função bactericida dos neutrófilos (AFONSO et al., 2002). Nossos resultados mostraram que houve diferença quantitativa entre pacientes com LMA e controle saudáveis. Isso significa que a produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase encontra-se alterada nesses pacientes.

Apresentamos dados que indicam que pacientes com LMA, após tratamento com quimioterápicos, podem apresentar diminuição da capacidade de fagocitose frente a uma partícula estranha bem como diminuição de produção de EROS.

Estes resultados podem ser importantes no acompanhamento e prognóstico destes pacientes contribuindo para o entendimento dos diferentes mecanismos que estão envolvidos nesta etapa de defesa imunológica do

organismo, pois a medida que o mecanismo é descoberto, mais tratamentos podem ser formulados para combater as condições nas quais a função dos neutrófilos é desregulada, como no câncer. Destacando a importância de análises quantitativas e qualitativas para a prática clínica e para o desenvolvimento de possíveis estratégias terapêuticas racionais.

7 CONCLUSÃO

Pacientes com LMA até o presente estudo estavam apresentando diminuição no número de neutrófilos;

A função fagocítica dos neutrófilos estava diminuída após o tratamento com quimioterápicos;

A produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase apresentou-se alterada nesses pacientes.

REFERENCIAS

- AFONSO, J.A.B.; CIARLINI, P.C.; KUCHEMUCK, M.R.G.; et al. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. *Pesq. Vet. Bras*, v. 22, n. 4, p.129-134, out/dez. 2002.
- AZEVEDO, M. C. Avaliação retrospectiva dos pacientes portadores de leucemiamielóide aguda tratados no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 1978 e 2007. p. 177, 2009.
- BALDASARO, M. M. Significado da detecção de proteína específica no soro e na urina diagnóstico precoce de nefropatia diabética. v. 7, p. 219–232, 2014.
- BORREGAARDN. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*33:657–670, 2010.doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011.
- BULLINGER, L.; DÖHNER, K.; DOHNER, H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *Journal of Clinical Oncology*, v. 35, n. 9, p. 934–946, 2017.
- ÇELIK, H. et al. Highly multiplexed proteomic assessment of human bone marrow in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, v. 4, n. 2, p. 367–379, 2020.
- CORNES, P.; KRENDYUKOV, A. The evolution of value with filgrastim in oncology. *Future Oncology*, v. 15, n. 13, p. 1525–1533, 2019.
- DE GREEF, G. E.; HAGEMEIJER, A. Molecular and cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes. *Bailliere's Clinical Haematology*, v. 9, n. 1, p. 1–18, 1996.
- DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. 'Acute myeloid leukemia: A

comprehensivereview and 2016 update'. *Blood Cancer Journal*, v. 6, n. 7, 2016.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, v. 115, n. 3, p. 453–474, 2010.

EDWARDS S. The development and structure of mature neutrophils. In: *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, edited by Edwards S. New York: Cambridge Univ. Press, 2005, p. 33–76.

ESTEY, E. H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, v. 93, n. 10, p. 1267–1291, 2018.

FRANCISCHETTI I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2010doi: 10.1590/s0102- 76382010000400023. PMID: 21340389.

GEISLER, K.; GUNZER, M.; OSTERMANN, H. How Safe Is the Administration of Long-Acting Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Cancer Patients? *Oncology Research and Treatment*, v. 41, n. 5, p. 316–326, 2018.

Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia.

New England Journal of Medicine, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 2013.

GREEN, S. D.; KONIG, H. Treatment of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Genomics—Achievements and Persisting Challenges. *Frontiers in Genetics*, v. 11, n. May, 2020.

GURION, R. et al. Colony-stimulating factors for prevention and treatment of infectious complications in patients with acute myelogenous leukemia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: Genetics and prognostic factors. *Jornal de Pediatria*, v. 84, n. 4 SUPPL., p. 52–57, 2008.

HAN, E. S.; GOLEMAN, DANIEL; BOYATZIS, RICHARD; MCKEE, A. Tono. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019.

JONES, R. Genetic changes NIH Public Access. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.

JUNG, J. et al. Reclassification of acute myeloid leukemia according to the 2016 who classification. *Annals of Laboratory Medicine*, v. 39, n. 3, p. 311–316, 2019.

KIERSNOWSKA-ROGOWSKA B, Parfieńczyk A, Rogowski F. [Effect of cytostatic therapy on IL-1beta and L-selectin concentrations, synthesis, accumulation and excretion in patients with acute myeloid leukaemia]. *Polski Merkurusz Lekarski : Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2004 Oct;17(100):341-344.

KHAN MA, D'Ovidio A, Tran H, Palaniyar N. Anthracyclines Suppress Both NADPH Oxidase- Dependent and -Independent NETosis in Human Neutrophils. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 7;11(9):1328. doi: 10.3390/cancers11091328. PMID: 31500300; PMCID: PMC6770146.

LAGUNAS-RANGEL, F. A. Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, v. 15, n. 3, p.150–157, 2016.

LEHMAN, H. K.; SEGAL, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 145, n. 6, p. 1535–1544, 2020.

LI, L. et al. Am80- GCSF synergizes myeloid expansion and differentiation to generate functional neutrophils that reduce neutropenia-associated infection and mortality . *EMBO Molecular Medicine*, v. 8, n. 11, p. 1340–1359, 2016.

LUIZ, F. Clonagem , expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli* . 2014.

MROŹEK, K. et al. Prognostic significance of the European Leukemia Net standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 36, p. 4515–4523, 2012.

NUNES, A. D. L. Análise das alterações citogenéticas e sua associação com características clínicas e evolução das crianças e adolescentes com leucemia mieloide aguda. 2016.

PHILLIPSON M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17: 1381–1390, 2011. doi:10.1038/nm.2514.

PORTUGAL, R. D.; NUCCI, M. L. M. Current treatment preferences in acute myeloid leukemia: a survey in Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 42, n. 3, p. 252–254, 2020.

QUISPE-TINTAYA, W. Myocardial Extraction from Newborn Rats HHS Public Access.

Physiology & behavior, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

REINÉ, J. et al. Neutrophil function is impaired in paediatric patients with malignancy and may be a useful clinical marker. *Clinical and Translational Oncology*, v. 22, n. 11, p. 2121–2125, 2020.

SALEEM, U. et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicology Reports*, v. 4, n. October, p. 580–585, 2017.

SCHLENK, R. F. Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica*, v. 99, n. 11, p. 1663–1670, 2014.

SILVA, A. M. P. DA. Mutações no gene DNMT3A em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda no Rio Grande do Sul, Brasil. 2012.

THOMAS, D.; MAJETI, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, v. 129, n. 12, p. 1577–1585, 2017.

WANG X, Clowes C, Duarte R, Pu QQ. Expression of CD11b/CD18 on neutrophils after consolidation chemotherapy for acute myeloid leukemia and after high dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Oncol*. 2000 Sep;17(3):597-602. doi: 10.3892/ijo.17.3.597. PMID: 10938404.

WANG, A.; ZHONG, H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*, v. 23, n. 10, p. 729–739, 2018.

WATTS, J.; NIMER, S. Recent advances in the understanding and treatment of acutemyeloid leukemia. *F1000Research*, v. 7, n. 0, p. 1–14, 2018.

WEINBERG, O. K. et al. Diagnostic work-up of acute myeloid leukemia. ***American Journal of Hematology***, v. 92, n. 3, p. 317–321, 2017.

ZARBOCK A, Ley K, Mc Ever RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118: 6743– 6751, 2011. doi: 10.1182/blood-2011-07-343566.

Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res.* 1998; 72:197-233. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60703-4. PMID: 9338077.

Enache M, et al. Mitoxantrone-Surfactant Interactions: A Physicochemical Overview. *Molecules.* 2016 Oct 13;21(10):1356. doi: 10.3390/molecules21101356. PMID: 27754390; PMCID: PMC6273455.

Heo SK, et al. Radotinib aumenta a morte celular de leucemia mielóide aguda induzida por citarabina (Ara-C). *Câncer BMC.* 4 de dezembro de 2020;20(1):1193. doi: 10.1186/s12885-020-07701-8. PMID: 33276759; PMCID: PMC7718665.

APÊNDICE A - PARECER CEP

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -
HOL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Neutrófilos Circulantes em Pacientes com Neoplasias Hematológicas Malignas

Pesquisador: CAROLINA HEITMANN MARES AZEVEDO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64964917.6.3001.5550

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.072.992

Apresentação do Projeto:

As doenças onco-hematológicas, como as leucemias e outras doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas afetam de diferentes formas o funcionamento da medula óssea e órgãos linfóides alterando a produção e função das células hematopoéticas. Uma vez que os neutrófilos apresentam atividade antitumoral e que funções de leucócitos circulantes podem estar alteradas em pacientes com câncer de diferentes origens, nosso objetivo será verificar se pacientes portadores de neoplasias hematológicas malignas, em diferentes estadiamentos, apresentam alterações no número e/ou função quimiotática e fagocítica de neutrófilos circulantes e o efeito do tratamento sobre esses parâmetros.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos específicos:- Caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes com doenças neoplásicas hematológicas malignas atendidos no Hospital Ophir Loyola através dos dados contidos nos prontuários dos mesmos, através do SAME (Serviço de Atendimento Médico e Estatístico) - Avaliar o número e/ou na função quimiotática e fagocítica de neutrófilos circulantes em pacientes com neoplasias hematológicas malignas, em estadiamento inicial ou avançado da doença, antes do início de qualquer tratamento.- Avaliar alguns marcadores de inflamação como atividade da Mieloperoxidase e liberação de citocinas pró-inflamatórias.- Verificar o efeito do

Endereço: GOVERNADOR MAGALHÃES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3265-6665

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

APÊNDICE B: ARTIGO PUBLICADO



Interação medicamentosa em pacientes com câncer: revisão integrativa da literatura

Drug interaction in cancer patients: an integrative literature review

DOI:10.34117/bjdv7n3-784

Recebimento dos originais: 30/02/2021

Aceitação para publicação: 30/03/2021

Raquel Ester Dalmácio Lobo

Mestranda em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, Pará, Brasil

E-mail: raquel.ester17@hotmail.com

Brendo Paulo Guimarães Bahia

Graduando em Farmácia

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, Pará, Brasil

E-mail: guibrendo.bg@gmail.com

Gabriela Evelin Anjo Silva

Mestranda em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, Pará, Brasil

E-mail: gabrielae.anjo@gmail.com

Larissa Nunes da Cruz

Mestranda em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, Pará, Brasil

E-mail: larissacruz336@gmail.com

Erica dos Santos Sarges

Doutoranda em Oncologia

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém, Pará, Brasil

E-mail: ericasarges_15@hotmail.com

Ana Cristina Lo Prete

Doutora em Farmácia

Universidade São Judas Tadeu-Rua Taquari, 546, Mooca, São Paulo,SP, Brasil

E-mail: analoprete@gmail.com

Thiago Xavier Carneiro

Doutor em Medicina (Hematologia)

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém,Pará, Brasil

Hospital Ophir Loyola – Belém, Pará, Brasil

E-mail: thiagoxavc@gmail.com

Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro

Doutora em Farmácia

Universidade Federal do Pará- Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém,Pará, Brasil

E-mail: carolmheitmann@hotmail.com

ANEXO A

PROTOCOLO LEUCEMIAS

AGUDAS DATA COLETA: _____/_____/_____

1. Nome do paciente: _____
2. Prontuário: _____
3. Data de Nascimento: ____/____/_____
4. Tempo de Internação _____
5. Gênero: () Maculino () Femenino
6. Diagnóstico:
7. Utilizou o G-CSF () sim () Quanto tempo _____
8. Protocolo de quimioterapia utilizado: _____
9. Houve infecção hospitalar durante o período de internação: () Sim () Não
10. Hemograma atual: Hb _____ Ht _____ Leuco: _____ Seg
(Absoluto): _____ Seg (%): _____ Plaquetas: _____
Linf (Absoluto): _____ Linf (%): _____ blasto: _____

ANEXO B - TCLE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

Riscos: Com relação aos riscos, é importante lembrar que os riscos serão mínimos em relação à coleta de sangue, e que serão inerentes a vida cotidiana, relacionado à possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer

fase de uma pesquisa e dela decorrente. Alguns riscos conhecidos, embora raros, estão associados à colocação de uma agulha na veia. Entre esses riscos estão: desconforto, a possibilidade de infecção (que é mínima uma vez que são usadas agulhas estéreis

e descartáveis), além de hematoma ou inchaço temporário. Caso tenha a presença de algum desses danos decorrente da pesquisa, o participante terá direito a indenização.

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

A identidade dos pacientes será preservada, sendo-lhes atribuído um número, e somente o aluno e o pesquisador principal terão conhecimento das mesmas. Sua participação é voluntária, não havendo nenhuma forma de pagamento nem custos por sua participação. Você pode se recusar a participar ou retirar deste estudo a qualquer momento sem penalização ou prejuízo de seu tratamento.

**DECLARAÇÃO DE
CONSENTIMENTO
DO PACIENTE:**

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

Belém, ____ de _____ de _____

ASSINATURA E IDADE DO PACIENTE

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

Raquel Ester Dalmacio Lobo (mestranda)- Universidade Federal do Pará-
Faculdade de Farmácia- fone: 32017201