

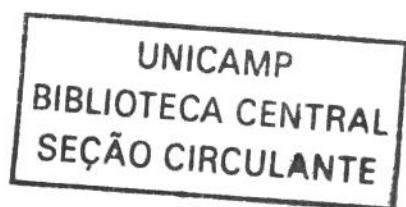
ELISANGELA RIBEIRO

***A INFLUÊNCIA DA AMIFOSTINA SOBRE A EXPRESSÃO
DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE FAS E FASL NOS
PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS NA MIELODISPLASIA***

200305924

CAMPINAS

2002



ELISANGELA RIBEIRO

***A INFLUÊNCIA DA AMIFOSTINA SOBRE A EXPRESSÃO
DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE FAS E FASL NOS
PRECURSORES HEMATOPOÉTICOS NA MIELODISPLASIA***

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área de
Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: *PROFA. DRA. IRENE LORAND-METZE*

CO-ORIENTADORA: *DRA. CARMEN SILVIA PASSOS LIMA*

CAMPINAS

2002

| | |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | <i>de</i> |
| Nº CHAMADA | <i>T/UNICAMP</i> |
| | <i>R354i</i> |
| V | EX |
| TOMBO BC/ | <i>S 2346</i> |
| PROC. | <i>124103</i> |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | <i>R\$ 11,00</i> |
| DATA | |
| Nº CPD | |

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M00179759-B

BIB ID 279811

Ribeiro, Elisangela

R354i

A influência da amifostina sobre a expressão dos抗ígenos de superfície FAS e FASL nos precursores hematopoéticos na mielodisplasia / Elisangela Ribeiro. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Irene Lorand Metze

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citometria de fluxo. 2. Síndromes mielodisplásicas. 3. Apoptose. 4. Linfócitos. I. Irene Lorand Metze. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

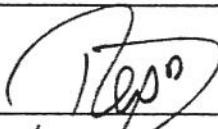
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Profa. Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

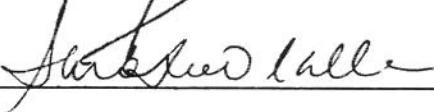


Membros:

1. Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego


Eduardo Rego

2. Professora Doutora Sara Terezinha Ollala Saad


Sara Terezinha Ollala Saad

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:22.02.2002

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Wilker R. Ribeiro, minha mãe Iraci S. Ribeiro e ao meu noivo Vinícius A. de Moraes Lobo pelo apoio constante que foi imprescindível para que eu concretizasse meu estudo

A minha irmã Ana Paula R. de Carvalho e a meu irmão Wilker R. Filho pelo incentivo

Aos pacientes pela sua contribuição, meus votos de longevidade

A realização deste trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

À *Profa. Irene*, pela dedicação a minha dissertação e pela confiança concedida para que eu pudesse desenvolvê-la. Agradeço pelos momentos de compreensão e paciência diante das minhas dificuldades. À sua experiência profissional, que me garantiu um desenvolvimento pessoal e, com certeza, futuramente, em minhas realizações profissionais. Pelo “Young Investigator’s Grant” que recebi da “Fundação Internacional das Síndromes Mielodisplásicas” pela apresentação de um trabalho nosso, que se não fosse por sua iniciativa eu não teria participado deste congresso internacional de mielodisplasia, que para mim foi uma grande experiência.

À *Dra Carmen*, pelos momentos de otimismo que fizeram com que eu tivesse mais confiança e orgulho do meu trabalho e em mim mesma. Às dicas concedidas nos trabalhos para apresentações. Às explicações dadas pacientemente para que eu compreendesse melhor o protocolo de tratamento que utilizamos no projeto. Pela companhia no congresso internacional.

Às secretárias, *Arlete* e *Nicete*, pela paciência, auxílio e pedidos intermináveis, que sempre foram atendidos prontamente. À *Nicete*, pelas cópias, impressão de fichas, recados e momentos de amizade demonstrados em nossas conversas informais. À *Arlete*, pelas ajudas constantes em relação às burocracias que envolveram o mestrado, recados vindos de minha orientadora, à formatação de minha dissertação e pelos momentos de descontração necessários naqueles dias estressantes.

À **Fernanda e Marta** do Laboratório Marcadores Celulares, pelo espaço concedido aos meus reagentes e pertences pessoais, pela utilização do aparelho citômetro de fluxo, pelo lisante quase sempre utilizado de vocês e pelas conversas descontraídas.

Ao **Roberto**, pela paciência e dedicação concedidas aos meus gráficos de resultados que facilitaram a visualização dos dados.

À *Maristela, Karina* e *Gustavo*, do Laboratório de Citogenética, pelos cariótipos analisados, pela atenção aos casos em que eu precisava do resultado com mais urgência e aos momentos agradáveis que vocês me proporcionaram durante o desenvolvimento do meu mestrado.

À **Hélia, Mônica, Iramaia e estagiários**, do Laboratório de Hematologia, pela atenção e disposição para atender às minhas necessidades, além da utilização do contador hematológico, pelas lâminas separadas e hemogramas concedidos.

À **Sandra e ao Ricardo**, pela atenção concedida à confecção de slides, posters, figuras escaneadas, enfim pelo apoio didático dado as minhas necessidades.

Aos **residentes** da Hematologia, pelas amostras colhidas e mielogramas analisados.

Às **enfermeiras, farmacêuticos e técnicos** do Ambulatório de Quimioterapia e TMO, pela dedicada assistência aos pacientes e as minhas necessidades, além da boa conduta profissional.

Obrigada a vocês pelo apoio, atenção e amizade.

| | PÁG |
|---|--------------|
| RESUMO..... | <i>xxvii</i> |
| INTRODUÇÃO..... | 31 |
| Síndromes mielodisplásicas..... | 33 |
| Citogenética..... | 35 |
| Apoptose..... | 35 |
| Sistema Fas/FasL..... | 39 |
| Apoptose na SMD..... | 42 |
| Tratamento para pacientes com SMD..... | 45 |
| Amifostina..... | 47 |
| Fator de transcrição nuclear NFkB..... | 48 |
| OBJETIVOS..... | 51 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 55 |
| Pacientes..... | 57 |
| Critérios de inclusão de pacientes no estudo..... | 57 |
| Critérios de exclusão de pacientes no estudo..... | 57 |
| Esquema terapêutico com amifostina..... | 58 |
| Critérios de resposta ao tratamento..... | 58 |
| Reações colaterais..... | 58 |
| Avaliação laboratorial..... | 58 |
| Análise estatística..... | 64 |

| | |
|---|-----|
| RESULTADOS..... | 67 |
| Pacientes..... | 69 |
| Cariótipos..... | 70 |
| Hemograma..... | 70 |
| Mielograma..... | 73 |
| Estudo da apoptose..... | 76 |
| Reações colaterais..... | 81 |
| Adesão e dificuldades de inclusão no estudo..... | 81 |
| Evolução dos pacientes após tratamento com AMF..... | 82 |
| DISCUSSÃO..... | 85 |
| CONCLUSÕES..... | 95 |
| SUMMARY..... | 99 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 103 |
| ANEXOS..... | 117 |

LISTA DE ABREVIATURAS

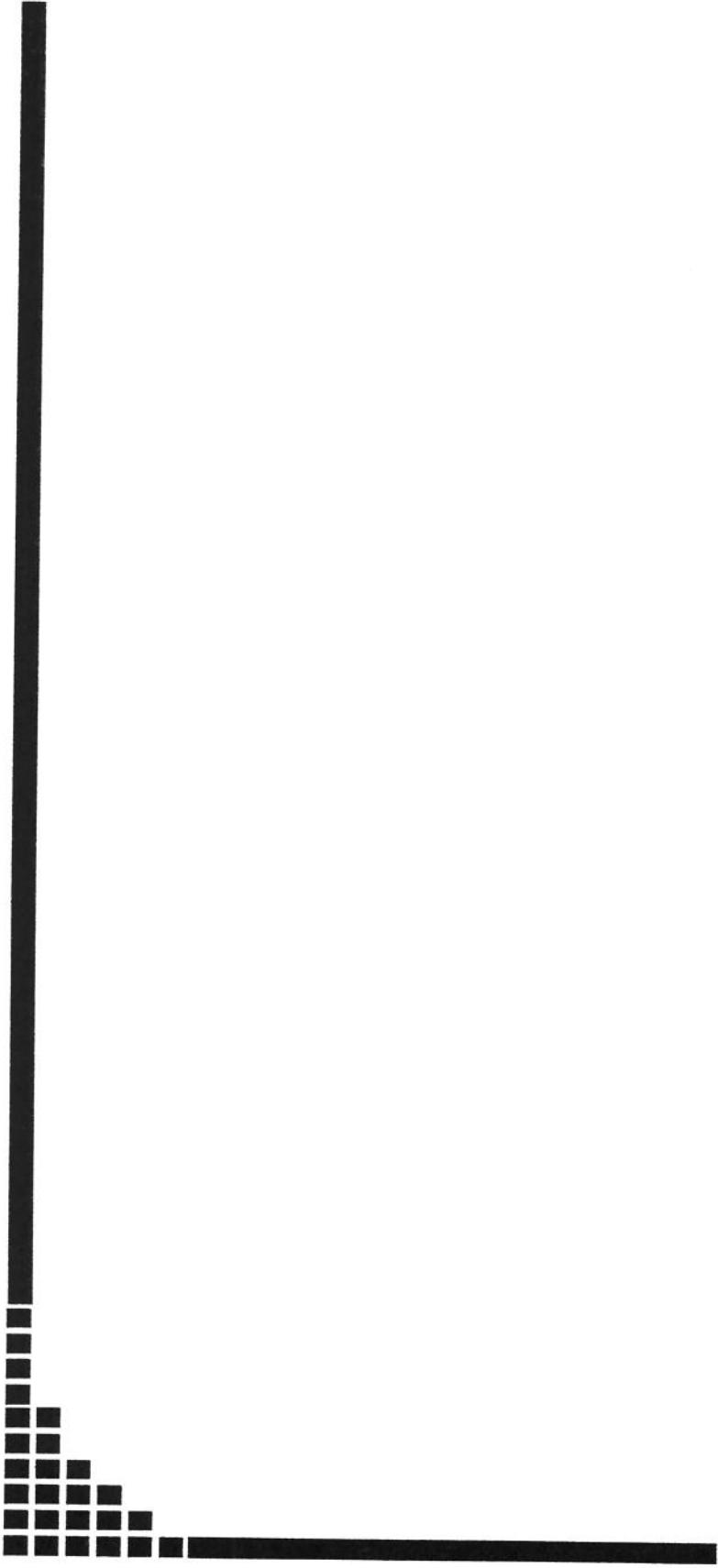
| <i>Sigla</i> | <i>Descrição</i> |
|---------------------|---|
| Ag | Antígeno |
| AMF | Amifostina |
| AR | Anemia refratária |
| AREB | Anemia refratária com excesso de blastos |
| AREB-t | Anemia refratária com excesso de blastos em transformação |
| ARSA | Anemia refratária com sideroblastos em anel |
| ATG | Globulina anti timócito |
| BD | Becton Dickinson |
| Ca | Cálcio |
| CD | Cluster Differentiation |
| CFU-GM | Granulocytic - Monocytic Colony Forming Unit |
| CSF-G | Granulocitic Colony Stimulator Factor |
| Del | Deleção |
| EPO | Eritropoetina |
| FAAD | Fas-Associated Death Domain |
| FAB | French-American-British |
| Hb | Hemoglobina |
| IκB | Inibitory kappa B |
| IL | Interleucina |
| IPSS | International Prognostic Sistem of Score |

| | |
|-----------------|--|
| LMA | Leucemia Mielóide Aguda |
| LMMC | Leucemia Mielomonocítica Crônica |
| MO | Medula Óssea |
| NF κ B | Nuclear Factor Kappa B |
| NK | Natural Killer |
| N 0 absoluto | Número Absoluto |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PL | Plaquetas |
| PA | Pressão Arterial |
| QT | Quimioterapia |
| SCF | Stem Cell Factor |
| SMD | Síndrome Mielodisplásica |
| SP | Sangue Periférico |
| TGF | Tumoral Growth Factor |
| TNF | Tumoral Necrosis Factor |
| TPO | Trombopoetina |
| UCH | Unidade de concentrado de hemácias |
| UCHFLI | Unidade de concentrado de hemácias fenotipadas, lavadas e irradiadas |
| WHO | World Health Organization |

LISTA DE TABELAS

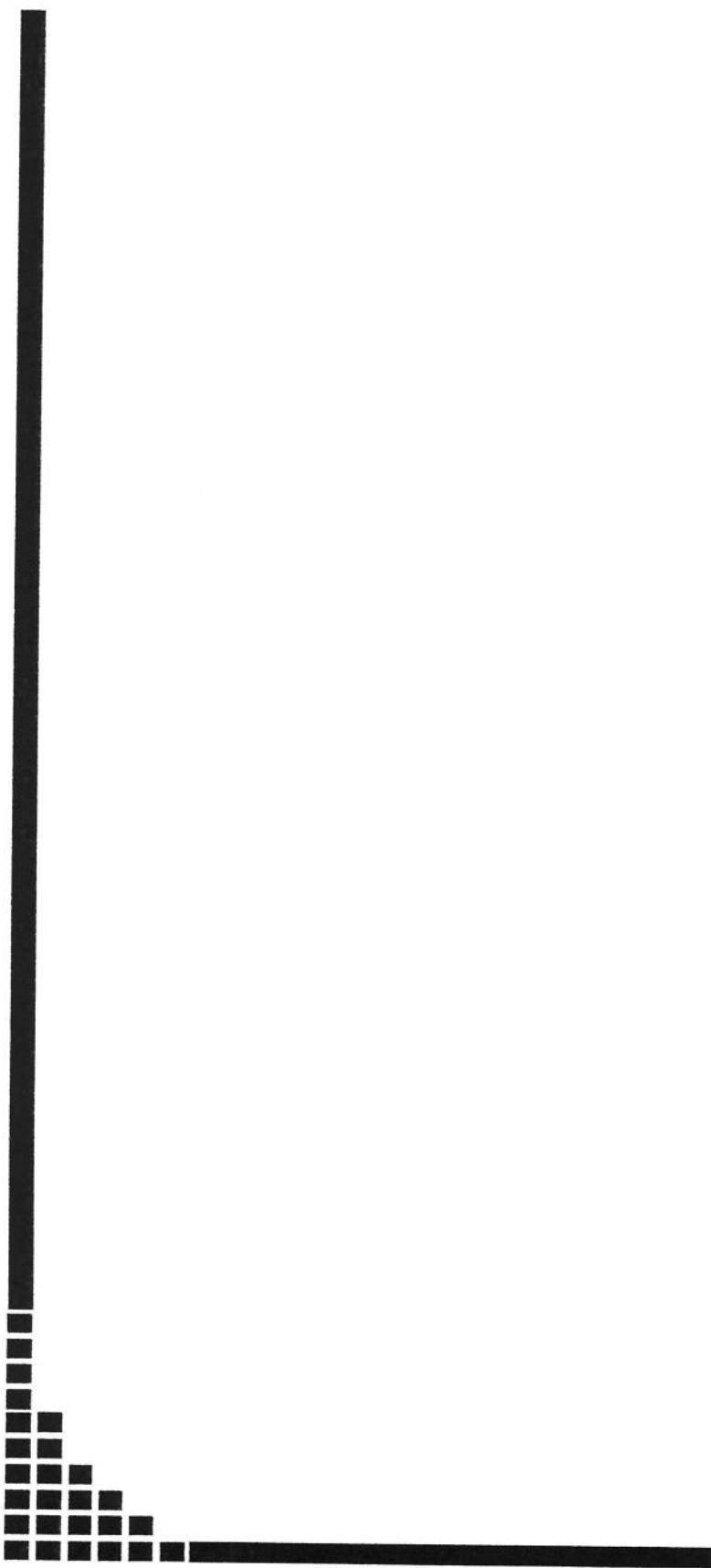
| | <i>PÁG</i> |
|---|------------|
| TABELA 1: Escore IPSS para pacientes com SMD..... | 34 |
| TABELA 2: Expressão da oncoproteína BCL-2 e do Ag fas em subpopulações de indivíduos normais..... | 42 |
| TABELA 3: Expressão dos marcadores apoptóticos CD95 e CD95L em amostras de normal e de pacientes com smd..... | 43 |
| TABELA 4: Aspéctos hematológicos dos subtipos da SMD de acordo com classificação FAB..... | 59 |
| TABELA 5: Tipo FAB, idade e análise cariotípica da MO nos pacientes com SMD no início do tratamento com AMF..... | 69 |
| TABELA 6: Comparação das características dos pacientes respondedores e não respondedores..... | 74 |
| TABELA 7: Mielograma pré, pós ciclo 2 e pós ciclo 6 nos pacientes submetidos à amifostina..... | 75 |
| TABELA 8: Dados do hemograma e imunofenotipagem dos pacientes com mielodisplasia..... | 77 |

| | <i>PÁG</i> |
|--|------------|
| FIGURA 1: Curva de sobrevida da SMD pelo IPSS..... | 35 |
| FIGURA 2: Representação esquemática dos eventos apoptóticos..... | 38 |
| FIGURA 3: Eventos mitocondriais e os efeitos do gene BCL-2 na apoptose.... | 39 |
| FIGURA 4: Esquema do sistema apoptótico pela via FAS/FASL | 41 |
| FIGURA 5: Conversão da amifostina (Ethiol) em metabólicos WR-1065 e WR 33278..... | 48 |
| FIGURA 6: Esquema de supressão apoptótica pelo NF _K B..... | 49 |
| FIGURA 7A: DOT PLOT CD45 X SSC de paciente com SMD AR no pré AMF. Células granulocíticas hipogranulares demonstradas pelo SSC baixo..... | 61 |
| FIGURA 7B: DOT PLOT CD45 X SSC de paciente com SMD AR no pós ciclo 2 da AMF. Recuperação da granulação dos granulócitos demonstradas pelo SSC alto..... | 62 |
| FIGURA 8A: DOT PLOT CD34 X SSC..... | 63 |
| FIGURA 8B: DOT PLOT CD95 X CD34..... | 63 |
| FIGURA 8C: DOT PLOT CD95L X CD34..... | 64 |
| FIGURA 9: Relação entre a evolução dos neutrófilos no SP, durante o tratamento com AMF e a percentagem dos linfócitos, na MO, no pré tratamento..... | 72 |
| FIGURA 10A: Gráfico das células CD34 ⁺ desde o pré AMF até o ciclo 6..... | 78 |
| FIGURA 10B: Gráfico da expressão FAS/CD95 nas células CD34 ⁺ desde o pré AMF até o ciclo 6..... | 79 |
| FIGURA 10C: Gráfico da expressão FASL/CD95L nas células CD34 ⁺ desde o pré AMF até o ciclo 6..... | 80 |



RESUMO

Síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças clonais caracterizadas por citopenias periféricas persistentes de uma ou mais linhagens e com possibilidade para transformação leucêmica. Níveis aumentados de apoptose nas células precursoras hematopoéticas (células CD34⁺) foram observados em pacientes com SMD de baixo risco (AR e ARSA), sugerindo esse mecanismo como o responsável pela hematopoese ineficaz nessa doença. A Amifostina (AMF) é considerada um agente citoprotetor, com ação antioxidante, potente estimulador da hematopoese normal e supressor apoptótico nos precursores mielodisplásicos. Analisamos a expressão dos marcadores da apoptose, (Fas e FasL) nas células CD34⁺ em pacientes com SMD de baixo risco, submetidos ao tratamento com a AMF. Foram estudados 17 pacientes, sendo 11 AR e 6 ARSA. A resposta terapêutica em relação ao nível da hemoglobina, ao número de neutrófilos e às plaquetas, aos critérios de inclusão e às respostas foi definida pelo protocolo de tratamento da AMF. Dos 17 pacientes tratados, 10 apresentaram critérios de resposta em pelo menos uma série do hemograma após 2 ciclos de AMF, os quais receberam mais 4 ciclos adicionais. Quatro pacientes (3 não respondedores e um respondedor) apresentaram evolução da SMD (aumento de blastos medulares) durante ou após o tratamento. As atipias celulares na medula óssea (MO) e o número de células CD34⁺ diminuíram nos pacientes respondedores após o ciclo 2. No grupo dos não respondedores não houve alterações significativas em nenhum desses parâmetros. Os pacientes que responderam à amifostina tinham, antes do tratamento, uma percentagem menor de expressão de Fas e FasL nas células CD34⁺ e de linfócitos na medula óssea em relação aos que não responderam. A percentagem de linfócitos aumentou ainda mais após o tratamento neste último grupo. Esse resultado sugere que, no grupo que não respondeu à amifostina o sistema imune pode estar impedindo a resposta ao tratamento. Esses resultados favorecem a hipótese de que a resposta à AMF é influenciada pela expressão dos marcadores apoptóticos e/ou pela percentagem de linfócitos na MO. A resposta à AMF não depende apenas da supressão apoptótica. Um seguimento maior de pacientes é necessário para observar a durabilidade de resposta.



INTRODUÇÃO

SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

Síndromes mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas clonais que se originariam em uma célula tronco hemopoética (Stem Cell ou célula CD34⁺). São caracterizadas por distúrbio na proliferação e perda da maturação celular, podendo ocorrer em adultos jovens e em crianças, mas com incidência maior em idosos (BERIS, 1989; ARIAS et al., 1998; MAGALHÃES et al., 1999).

Embora a medula óssea (MO) esteja normo ou hipercelular, os pacientes portadores de SMD possuem citopenias periféricas persistentes de uma ou mais linhagens. Contudo, apresentam infecções constantes, processos hemorrágicos e/ou anemias, decorrentes da deficiência de maturação celular na hematopose desses pacientes (BENNETT, 1986; YOSHIDA, 1993; GALLAGHER et al., 1997).

Os clones SMD são instáveis na capacidade de diferenciação celular. Estima-se que cerca de 20 a 30% dos casos de leucemias mieloides agudas (LMA) em adultos sejam precedidas por uma fase pré-leucêmica. Essa fase é induzida pelo uso da quimioterapia e da radioterapia, envolvendo mudanças genéticas nos clones anormais, contribuindo para o aparecimento cada vez mais frequente da LMA e da SMD secundária (KOIDES & BENNETT, 1996).

A SMD é, atualmente, classificada através da morfologia, pelo grupo cooperativo franco-americano-britânico (FAB), que compreende 5 grupos que avaliam os aspectos hematológicos quantitativos e qualitativos dos elementos no sangue periférico (SP) e na medula óssea (MO). As anormalidades qualitativas mais comuns na MO são a assincronia maturacional núcleo citoplasmática e a fragmentação nuclear dos eritroblastos, dos sideroblastos em anel, dos bastonetes gigantes, dos neutrófilos hipersegmentados ou com anomalia de pseudo Pelger-Huet e dos micromegacariócitos (BENNETT et al., 1982).

A frequência dos 5 subtipos tem variado muito nos diversos relatos da literatura. Embora a classificação seja muito simples e facilmente reproduzível para estudos posteriores de mielodisplasia, alguns pontos têm sido discutidos (GREENBERG et al., 1997). O comitê da organização mundial da saúde (OMS), para classificação de neoplasias

do tecido linfóide e hemopoético, propôs uma modificação da classificação FAB original, relatada por HARRIS et al. (2000). Segundo este comitê, a proposta reconhece 8 categorias. A leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) é excluída das SMDs e classificada, juntamente com a leucemia mielóide crônica atípica e a leucemia mielomonocítica juvenil, num grupo de desordens mielodisplásicas/mieloproliferativas. O subtipo AREB-t é excluído e o percentual de células blásticas estabelecido para o diagnóstico de leucemia aguda passa a ser de 20%. Essa nova classificação permite o agrupamento de categorias mais homogêneas, reduz o número de casos não classificáveis e associa-se ao sistema internacional de escore (IPSS). Esse sistema de pontuação considera a percentagem de blastos, as anormalidades cariotípicas e o grau das citopenias periféricas (Tabela 1). A sobrevida dos pacientes com SMD é variável (Fig 1): nos subtipos AR e ARSA, a sobrevida média dos pacientes é em torno de 4 anos; enquanto nos AREB e AREB-t, a sobrevida média cai para 12 meses, segundo RIBIZZI et al (2000).

Tabela 1. IPSS para pacientes com SMD

| Valores prognósticos | | Valores | | | |
|--------------------------|-----|---------------|--------------|-------|-------|
| | | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| Blastos na MO(%) | <5 | 5-10 | -- | 11-20 | 21-30 |
| Cariótipo | Bom | Intermediário | Desfavorável | -- | -- |
| Número citopenias | 0/1 | 2/3 | -- | -- | -- |

O valor para a determinação do grupo de risco é a somatória dos valores obtidos. Assim, quatro grupos foram identificados:

Baixo risco: somatória dos valores igual a zero

Risco intermediário 1: somatória dos valores 0.5 - 1.0

Risco intermediário 2: somatória dos valores: 1.5 – 2.0

Alto risco (desfavorável): somatória dos valores maior ou igual a 2.5

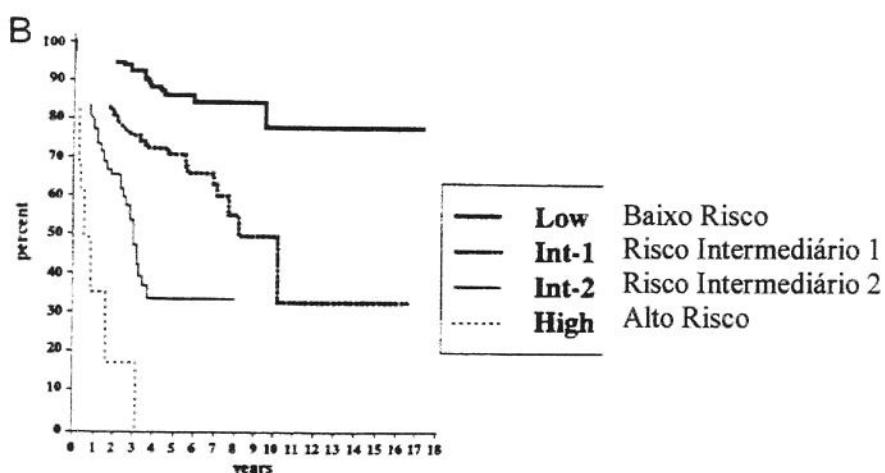


Figura 1: Gráfico representativo de sobrevida dos pacientes com SMD pelo escore do IPSS

CITOGENÉTICA

As anormalidades citogenéticas mais frequentes na mielodisplasia com bom prognóstico compreendem deleção do cromossomo Y, del(5q), del(20q) e cariótipo normal, sendo que no prognóstico de risco intermediário estão a trissomia do cromossomo 8 (+8) e outras anomalias simples. Já as SMDs que apresentam alterações complexas e anomalias do cromossomo 7 apresentam curso agressivo da doença.

APOTOSE

A morte celular pode ser conduzida de modo não-fisiológico e patológico (necrose) ou de modo fisiológico (apoptose). A necrose, em nível morfológico, é caracterizada por inchaço celular com comprometimento das organelas no citoplasma, em especial as mitocôndrias, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Posteriormente, a célula se rompe devido ao desequilíbrio hidroeletrolítico, eliminando no tecido vizinho o conteúdo intracitoplasmático contendo proteases e substâncias tóxicas que, além de causar toxicidade direta para as células adjacentes, atrai células do sistema imunológico, causando intensa reação inflamatória.

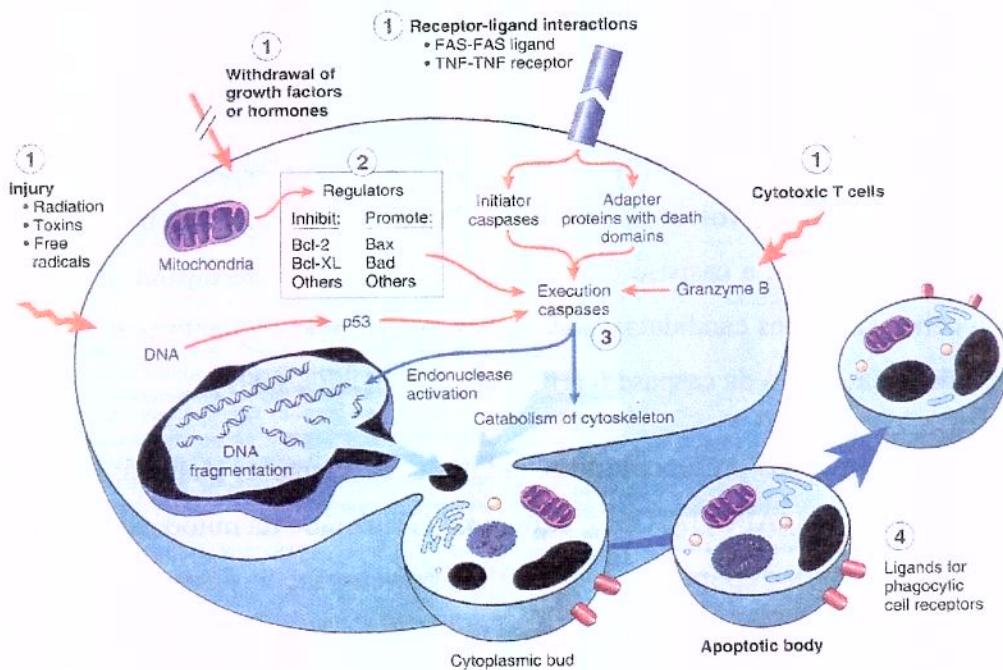
A apoptose é um fenômeno de morte celular totalmente distinto da necrose, na qual não há inchaço da célula, ao contrário, há o encolhimento. Ela apresenta bolhas na membrana plasmática da célula, mas não se rompe. Enquanto as organelas se mantêm intactas, o núcleo sofre mudanças dramáticas, onde a cromatina forma um ou mais aglomerados nas bordas internas da membrana nuclear, levando a célula à morte. As células que demoram mais para morrer apresentam também o núcleo partido e dividem-se em estruturas (corpos apoptóticos) contendo porções do núcleo inconfundíveis ao microscópico eletrônico. Em geral as células apoptóticas são reconhecidas por macrófagos e são fagocitadas, sem causar inflamação como na necrose (YOSHIDA, 1993; BERGAMASCHI, et al., 1994; HORTA, 1999).

A apoptose ou morte celular programada é definida como um fenômeno de “suicídio” celular que requer mecanismos especializados. Esse fenômeno tem sido essencial em muitos processos fisiológicos como no desenvolvimento embrionário, no controle de tumores, na regulação do sistema homeostático e de populações celulares do sistema imune. Contudo, alterações dos genes e proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, responsáveis pelo controle do mecanismo de morte celular programada, estão envolvidas em diversas patologias (SHIBUYA et al., 1995; IRVINE et al., 1998; HORTA, 1999; YOSHIDA & MUFTI, 1999).

Há dois elementos chaves na cascata apoptótica localizados no citoplasma das células: a mitocôndria e as caspases (proenzimas inativadas), que são denominadas caspase 1, caspase 2, e assim sucessivamente até a 14. As caspases (nome derivado de cisteína-protease que cliva - “corta”) têm papel central na apoptose, em todo o tipo de célula e em todo organismo multicelular estudado. A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (interleukin-1 β converting enzyme), hoje a caspase 1. Uma caspase pode clivar outras e esse “corte” parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em sequência, até chegar a uma caspase executora. Esta caspase destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. A ativação dessas proteases não segue hierarquias e, quando envolvidas, podem se diferir, dependendo do modo de indução da apoptose. Por exemplo, a caspase 8 e a caspase 10, dependendo do tipo de estímulo que a célula recebe, são fortes candidatas às caspases iniciadoras, enquanto que a ativação das 3 e 7 precedem a ativação da caspase 6 (HORTA & YOUNG, 1999).

As proteínas pró-apoptóticas, indutoras da apoptose, incluem: antígeno (Ag) de superfície celular Fas (APO-1/CD95), citocromo C (liberado da mitocôndria liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e à pró-caspase 9, formando os apoptossomos que, consequentemente, ativarão as caspases), Bax (forma poros na membrana da mitocôndria com liberação do citocromo C e, quando se liga ao bcl-2, inibe a ação supressora da apoptose), fator de necrose tumoral alfa (TNF α - citocina reguladora da hematopoiese, induz a formação de radicais livres de oxigênio e a expressão do Ag Fas). O gene p53 *wild-type*, os íons Ca $^{2+}$ (alteram permeabilidade mitocondrial, facilitando a saída do citocromo C), o c-myc (oncogene) e, por fim, as ceramidas (estimulam liberação do citocromo C da mitocôndria) também são fatores estimuladores da apoptose (SACHS & LOTEM, 1993; GREEN & REED, 1998, ORMEROD, 1998; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; GREENBERG, 1998; HETTS, 1998; HORTA & YOUNG, 1999, figs. 2 e 3).

Destacam-se como agentes supressores dos eventos apoptóticos o gene bcl-2 e o gene p-53 mutado (não reconhece células com lesão no DNA). Expressões anormais de oncoproteínas anti-apoptóticas (supressoras da apoptose) e proteínas pró-apoptóticas (indutoras) podem desencadear os eventos apoptóticos.

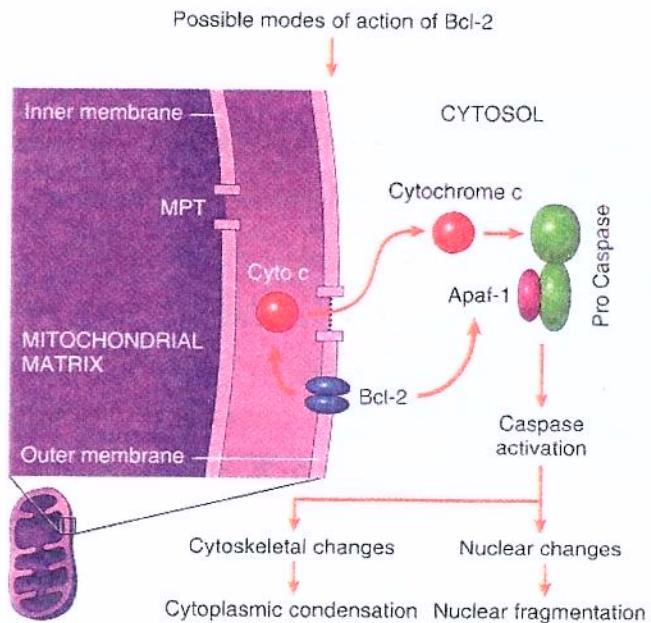


Ramzi, Vinay, Tucker- Robbins, 1999

Figura 2: Representação esquemática dos eventos apoptóticos

Os fatores estimuladores da apoptose, incluem: específicos ligantes do receptor da morte (TNF, Fas ligante), remoção de fatores de crescimento, hormônios, agentes prejudiciais, radiação, radicais livres e toxinas, além dos linfócitos T citotóxicos. Estes indutores da morte celular agem de maneiras diferentes, ativando as caspases iniciadoras ou executoras, por envolvimento mitocondrial, envolvendo citocromo C e comprometimento do DNA (1). O controle e regulação desse mecanismo apoptótico são influenciados por membros da família bcl-2 de proteínas, os quais podem inibir ou promover a morte das células (2). As caspases executoras ativam endonucleases citoplasmáticas latentes e proteases, degradando assim o citoesqueleto e as

proteínas nucleares. Contudo, gera-se uma cascata de degradação intracelular, incluindo fragmentação da cromatina nuclear e colapso do citoesqueleto (3). O resultado final é a formação de corpos apoptóticos contendo várias organelas e outros componentes citosólicos. Estes corpos apoptóticos também expressam novos ligantes para se unirem e serem captados por células fagocitárias (4).



Ramzi, Vinay, Tucker Robbins, 1999

Figura 3: Eventos mitocondriais e os efeitos do bcl-2 na apoptose.

Agonistas da morte celular causam mudanças na membrana interna da mitocôndria, resultando na transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) e liberando o citocromo C dentro do citosol. A liberação do citocromo C rompe a ligação entre o gene bcl-2 e as proteases pró-apoptóticas, ativando o fator Apaf-1. Posteriormente, uma caspase iniciadora é ativada, a qual inicia os eventos proteolíticos que eventualmente matarão a célula. Desse modo, o bcl-2 causa supressão do mecanismo da apoptose por inibir a liberação do citocromo C.

SISTEMA FAS/FASL

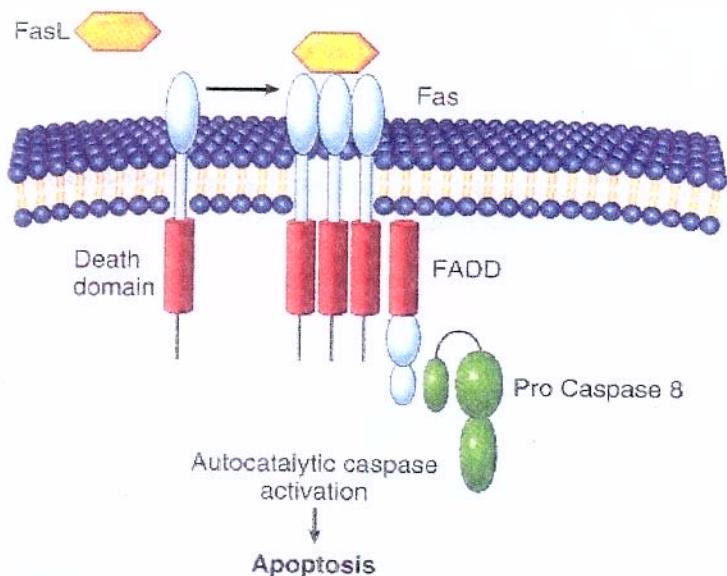
Fas é uma proteína de membrana pertencente à família do receptor TNF e é expresso em vários tecidos incluindo timo, fígado, coração e rim (WATANABE-FUKUNAGA et al, 1992; SMITH et al, 1994; NAGATA & GOLSTEIN, 1995). Fas media a apoptose seguida da interação com seu ligante natural, o Fasligante (FasL) (WATANABE-FUKUNAGA et al, 1992; SUDA et al, 1993; VIGNAUX et al, 1995; SUDA et al, 1995; KOJI et al., 1995).

O FasL é uma proteína transmembrana funcionalmente relacionada com o TNF- α (SUDA & NAGATA, 1994) e está proeminentemente expresso na membrana dos linfócitos T ativados, (SUDA et al, 1993; SUDA et al, 1995), nas células mieloides e tumorais, e em forma solúvel (O'CONNELL et al, 1996; BADLEY et al, 1996; HAHNE et al, 1996; LILES et al, 1996; KIENER et al, 1997; GERSUK et al., 1998). Contudo, o FasL é uma proteína transmembrana que induz a apoptose nas células que expressam Fas em suas membranas. Os抗ígenos Fas e FasL estão comumente presentes também em blastos mieloides, em células maduras mieloides, em eritroblastos, em megacariócitos e em células displásicas em aspirado de MO. O bcl-2, proteína supressora da apoptose, está indetectável nas células eritróides nucleadas e granulócitos, entretanto está altamente expresso em mieloblastos e em linfócitos. Nestas células, os níveis de expressão variam de acordo com o estado maturacional , que decrescem na medida em que amadurecem (CD10 positivo, marcador linfóide B). Esses dados conferem a importância do Fas e do bcl-2 na hematopoiese normal, conferindo uma menor ou maior sobrevida celular (MOLICA et al., 1996; DIGIUSEPPE et al., 1996; GUPTA et al., 1999) (Tabela 2).

O sistema Fas/FasL está envolvido em fenômenos fisiológicos importantes, como na desativação das reações imunes pela deleção das células T ativadas no final de uma resposta imune, na indução à morte de células cancerosas por células linfóides T citotóxicas, natural killer (NK) ou de células inflamatórias em algum processo isolado, ou infectadas por vírus (STALDER et al, 1994; NAGATA & GOLSTEIN, 1995; PETER & KRAMMER, 1998; ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Distúrbios no sistema Fas/FasL estão associados às desordens linfoproliferativas e aceleram doenças auto imunes causando destruição celular (NAGATA & GOLSTEIN, 1995; MILLER & MARX, 1998). Em nossos

estudos utilizamos os anticorpos anti-CD95 e anti-CD95L para analisar o sistema Fas/FasL que tem um papel importante na indução da apoptose em células CD34⁺ da MO de pacientes com SMD (MUNKER et al., 1996). Estes marcadores estão aumentados também em células da MO e SP nas anemias aplásicas (CALLERA et al., 1997).

A ligação Fas com seu ligante ativam a pró-caspase 8 através de um domínio da morte FADD (Fas-associated death domain), ocorrendo, assim, a apoptose celular pela caspase efetora (caspase 9)(fig. 4). Apoptose é um processo celular ativo que regula a quantidade de células pelo aumento da sobrevida celular. Há células que têm, em suas membranas, os receptores da morte que detectam a presença de sinais da morte extracelulares e, consequentemente, ativam o maquinário apoptótico. Os receptores da morte pertencem ao gene receptor da superfamília do TNF, destacando o CD95 (Fas/Apo1) e um dos receptores de TNF (TNFR 1).



Ramzi, Vinay, Tucker Robbins, 1999

Figura 4: Esquema do sistema apoptótico pela via Fas/FasL

Tabela 2. Expressão da proteína bcl-2 e do AgFas em subpopulações de indivíduos normais

| Tipo Celular | FAS (mesf x 10⁻³) | BCL-2 (mesf x 10⁻³) |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Linfócitos | 12* | 28 |
| Monócitos | 28 | 11 |
| Granulócitos | 15 | 1 |
| CVNs | 14 | 1 |
| Blastos | 8 | 29 |

CVNs: células vermelhas nucleadas; MESF: molécula de fluorocromo solúvel equivalente

*Linfócitos B expressam intensidade menor que em células T CD4⁺ e CD8⁺

APOPTOSE NA SMD

Estudos “in vitro” utilizando células de pacientes com SMD e bloqueando a ligação Fas/FasL, demonstraram uma supressão apoptótica observada com o aumento do número de unidades formadoras de colônias granulocíticas e monocíticas (CFU-GM), sugerindo a importância do sistema Fas/FasL na apoptose celular (NAGATA & GOLSTEIN, 1995; GERSUK et al., 1996; PETER & KRAMMER, 1998; ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

Em um estudo piloto (RIBEIRO et al., 2001) foram encontrados níveis aumentados de apoptose nas células CD34⁺, quando comparados a controles normais (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão dos marcadores apoptóticos CD95 e CD95L em amostras de MO normal e de pacientes com SMD (Ribeiro. E.; Lima, C.S.P.; Metze, IL- (Leukemia Research submitted)

| Expressão CD95 e CD95L | | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| | CD34 ⁺ (nº abs) | CD95/CD34(%) | CD95L/CD34(%) |
| MO Normal | 271(169 -787) | 28,5(19,5-29,6) | 17,2(15,5-21,2) |
| MO AR/ARSA | 245(16 – 839) | 57(0,6 – 88,9) | 28(0,8 - 90) |

Valores representados em número absoluto (nº abs) e percentagem (%) em mediana das células apoptóticas (CD95 e CD95L positivas) medidas fenotipicamente em população de células precursoras (CD34⁺).

A presença da apoptose excessiva na SMD pode ser um dos mecanismos responsáveis pela hematopoese ineficaz observada nessa doença (BOUSCARY et al., 1997; BOGDANOVIC et al., 1997; GREENBERG, 1998; GUPTA et al., 1999; YOSHIDA & MUFTI, 1999).

Vários estudos sugerem a morte celular programada como o mecanismo responsável pelo paradoxo da hipercelularidade da MO e das citopenias periféricas na SMD. Em um deles, foram utilizadas células granulocíticas periféricas de pacientes com SMD, incubando-as por 5 horas a 37°C. Após avaliação de hora em hora, observou-se fragmentação nuclear na maioria das células cultivadas, caracterizando, morfologicamente, uma célula em apoptose. Esses resultados sugerem uma forte susceptibilidade das células granulocíticas à morte celular programada (HAMADA et al., 1998).

No caso da série vermelha, a eritropoiese é ineficiente devido ao defeito no crescimento e à diferenciação das células progenitoras eritróides na SMD. Por isso, foi realizado um estudo com células glicoforina A positivas (proteína característica das células eritróides) mielodisplásicas, às quais foram submetidas a sinais pró-apoptóticos (Fas/CD95) e anti-apoptóticos. Observou-se que os primeiros sinais tiveram efeito maior sobre as células que o segundo, considerando a predominância da via pró-apoptótica sobre as células eritróides mielodisplásicas (FONTENAY –ROUPI et al., 1999).

No caso da série vermelha, a eritropoese é ineficiente devido ao defeito no crescimento e à diferenciação das células progenitoras eritróides na SMD. Por isso, foi realizado um estudo com células glicoforina A positivas (proteína característica das células eritróides) mielodisplásicas, às quais foram submetidas a sinais pró-apoptóticos (Fas/CD95) e anti-apoptóticos. Observou-se que os primeiros sinais tiveram efeito maior sobre as células que o segundo, considerando a predominância da via pró-apoptótica sobre as células eritróides mielodisplásicas (FONTENAY –ROUPI et al., 1999).

Em relação à série megacariocítica, há uma proliferação e uma diferenciação tipicamente anormal na mielodisplasia. O mecanismo é desconhecido, mas possivelmente envolve defeitos no receptor da trombopoetina (TPO), o c-mpl, ou na via sinalizadora pós receptor nas células progenitoras megacariocíticas. Além disso, a megacariopoese pode estar afetada pela incidência da morte celular prematura nos megacariócitos e pelo efeito inibidor das citocinas, como o TNF- α . Vários estudos não têm correlacionado o defeito do receptor de TPO com a anormalidade dos megacariócitos na síndrome mielodisplásica (HOFMANN et al., 2000).

A apoptose excessiva em células CD34 $^{+}$ na MO de pacientes com SMD pode ser consequência da ação de citocinas inibitórias, que estão em níveis alterados no soro e na MO desses pacientes. O desequilíbrio entre citocinas estimuladoras e inibidoras da medula óssea, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 6, IL-8, Fator Stem Cell (SCF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), entre outras, está relacionada com a apoptose excessiva na SMD. O TNF- α , em especial, se encontra em altos níveis nessa doença, na qual ela é capaz de: regular negativamente a hematopoiese, promovendo a apoptose celular através da indução ao aumento da expressão do Ag Fas nas células CD34 $^{+}$; estimular a produção de radicais livres de oxigênio nas células da MO, além de provocar a oxidação do DNA e de proteínas celulares. Além disso, o TNF- α induz a morte celular programada em células maduras, causando pancitopenia de um lado e estimulando a proliferação das células progenitoras primitivas, promovendo, assim, uma hipercelularidade medular (PETER & KRAMMER, 1998). Uma outra resposta para esse paradoxo seria a apoptose aumentada na SMD que estimularia as células monócitos/macrófagos a fagocitarem os corpos apoptóticos formados no final do processo de apoptose celular, e que secretariam as citocinas, em particular o TNF- α .

A patogênese precisa da SMD ainda é desconhecida. A expressão do bcl-2 e do Fas correlacionam-se com os estágios e com a progressão da doença, sobrevida celular além do fator prognóstico (TSOPOLOU et al., 1999). A SMD de baixo risco (AR e ARSA), e os casos AREB com percentagem baixa de blastos (<10%) apresentam altos índices de apoptose em contraste com a baixa expressão do bcl-2 nas células CD34⁺ mielodisplásicas, comparados aos estágios mais avançados da SMD, à leucemia mielóide aguda e em indivíduos normais (KRATZKE et al., 1999). Nos estágios mais avançados ou na LMA secundária à SMD, ocorre o inverso, onde a apoptose decresce e o gene bcl-2 é expresso mais fortemente, correlacionando com o acúmulo de blastos e, consequentemente, piorando o prognóstico (PARKER et al., 1997; BOUSCARY et al., 1997; PARKER et al., 1998; YOSHIDA & MUFTI, 1999; SHIMAZAKI et al., 2000; PARKER et al., 2000).

Contudo, a inibição de mecanismos apoptóticos podem induzir à transformação leucêmica (SHIMAZAKI et al., 2000; PARKER et al., 2000).

TRATAMENTO PARA PACIENTES COM SMD

A conduta terapêutica nos pacientes com subtipos FAB AR/ARSA da SMD, grupo de baixo risco para transformação leucêmica, era muito restrita antigamente. Resumia-se a transfusões sanguíneas quando necessárias, ao uso de fatores de crescimento, ao G-CSF ou ao GM-CSF e à eritropoetina (EPO) para estimular a hematopoeise da série branca e a diferenciação e maturação das células da série vermelha, respectivamente, além dos antibióticos. Contudo, esses métodos terapêuticos não previnem infecções nem prolongam a expectativa de vida, mas apenas amenizam a fadiga e a taquicardia causadas pela anemia, hemorragias e petéquias ocorridas pelas plaquetopenias e infecções. Além disso, a sobrecarga de ferro, ocasionada pelas transfusões de hemácias, pode provocar alterações funcionais no coração e no fígado e, por isso, é necessário utilizar um quelante de ferro nos casos em que a ferritina está alta. Outras terapias de baixa intensidade, como a amifostina (AMF), têm sido utilizadas em casos de AR e ARSA.

Os subtipos AREB, AREB-t e LMMC utilizam terapias mais agressivas, como a poliquimioterapia em baixas e altas doses e o transplante alógênico de medula óssea (TMO). Atualmente, o TMO é a única modalidade terapêutica curativa, mas está reservado a pacientes mais jovens com MO compatível e apenas em casos de pancitopenias mais graves. O potencial de cura está em torno de 30 a 50% (DANSEY, 2000; RIBIZZI et al., 2000; TABAK, 2000).

Dentre as terapias de baixa intensidade, a AMF é um medicamento que parece inibir o mecanismo da apoptose nas células CD34⁺ que, no entanto, está aumentada na SMD de baixo risco.

A AMF é condicionada a pacientes com SMD AR e ARSA, pois observou-se nos pacientes classificados como AREB e AREB-t, uma aceleração para o quadro de LMA após o uso da amifostina, com consequente piora do quadro inicial (SCHUCHTER., 1996; LIST et al., 1997; GROSSI et al., 2000). Métodos inibidores da apoptose podem induzir à leucemização, segundo SHIMAZAKI et al., 2000. LIST et al (1996), em um estudo “in vitro”, demonstraram que o ethiol confere uma citoproteção às células progenitoras hematopoéticas da citotoxicidade causada por antineoplásicos, e foi capaz de estimular a produção de células progenitoras (BFU-E e CFU-GM) em MO normal. Em outro estudo, agora “in vivo”, LIST et al (1997), demonstraram um aumento na dosagem de Hb ou uma redução transfusional, além do aumento dos números de neutrófilos e plaquetas (abaixo de 1,0 x10³ /ml e 50,0 x 10⁹ /l, respectivamente no pré tratamento) em pacientes mielodisplásicos tratados com AMF.

SANTINI & GILES (1999), “in vivo”, demonstraram uma ação citoprotetora da AMF em tratamentos que utilizam drogas alquilantes e a base de cisplatina, além da ótima resposta na série granulocítica periférica em relação à eritrocitária e plaquetária para tratamento das citopenias periféricas nas mielodisplasias de baixo risco.

RIBIZZI et al (2000) estudaram, “in vitro”, o ciclo celular das células mielodisplásicas submetidas à AMF. Houve diminuição da fase S, aumento da fase G0/G1 e aumento de fragmentação do DNA (presença de debris), evidenciando uma indução à apoptose dessas células tratadas. Já GALANOPPOULOS et al (2001) observaram aumento das colônias BFU-E e CFU-E na maioria dos pacientes com SMD tratados com AMF em relação ao pré tratamento.

Em resumo, os estudos “in vivo” e “in vitro” já citados demonstraram que a AMF pode estimular o crescimento das células progenitoras hematopoéticas tanto em MO normal como na mielodisplásica, atuando como um citoprotetor de pele, de tecidos e de células progenitoras da MO submetidos à radiação ou às altas doses de QT à base de cisplatina sem interferir na atividade antitumoral (SCHUCHTER & GLICK, 1993; VAN DER VIJGH & KORST, 1996; SANTINI & GILES, 1999).

Nos trabalhos clínicos, os autores observaram uma aceleração para a transformação leucêmica, principalmente nos casos AREB, após o tratamento com AMF.

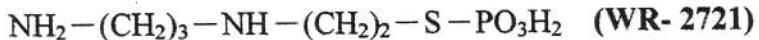
AMIFOSTINA

A amifostina (AMF) ou Ethiol é uma pró-droga que foi desenvolvida inicialmente para proteger as células dos tecidos e da MO, seletivamente, contra danos celulares induzidos por radioterapia ou quimioterapia à base de cisplatina, já que nesses tratamentos não se é possível distinguir entre células normais e malignas.

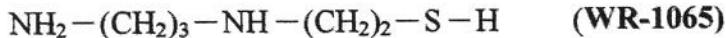
A AMF, etanoetiol (forma bioquímica WR-2721- metabólito inativo), é convertida pela fosfatase alcalina para o tiol livre (WR-1065- metabólito ativo) que, consequentemente, sofrerá uma oxidação para o metabólito dissulfeto (WR-33278) (Fig 5).

A proteção dos tecidos e das células sadias pode ocorrer por dois mecanismos: 1) o tiol livre se liga e inativa as espécies reativas dos agentes platina, neutralizando o efeito tóxico desse quimioterápico no DNA da célula; 2) o tiol livre age prevenindo ou reparando o DNA celular comprometido pela ação dos radicais livres através da doação de pontes de hidrogênio. Os agentes antitumorais e a radiação ionizante promovem a formação de radicais livres de oxigênio e ânions superóxido, induzindo as células à morte celular (SCHUCHTER & GLICK, 1993; VAN DER VIJGH & KORST, 1996; SANTINI & GILES, 1999). As células dos tecidos normais possuem uma quantidade de fosfatase alcalina superior e de pH neutro em relação às tumorais, o que favorece a conversão do WR-1065 e a absorção desse metabólito para o interior das células normais, proporcionando o efeito citoprotetor (WASSERMAN et al., 1981; VAN DER VIJGH & KORST, 1996).

ETHIOL



↓ Fosfatase Alcalina



↓ Oxidação

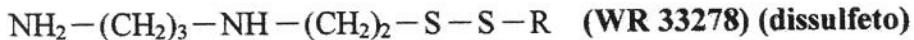


Figura 5: Conversão da amifostina (Ethiol) em metabólitos WR-1065 e WR 33278

FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR NF_KB

A AMF possui um mecanismo antiapoptótico sobre os precursores hematopoéticos. Ela pode inibir a apoptose celular através da ativação do fator nuclear Kappa B (NF_KB) que está inativo no citoplasma das células, com exceção dos linfócitos B nos quais este fator está sempre ativo (HORTA, 1999; ROMANO, et al., 1999; GALANOPPOULOS et al., 2001).

O NF_KB é uma molécula chave na resistência das células à morte celular programada, principalmente quando mediada pela citocina TNF. Esta citocina, as radiações ionizantes e alguns alquilantes quimioterápicos ativam tanto o processo de apoptose quanto o fator de transcrição NF_KB. Este fator é ativado quando fica livre de uma proteína inibidora, o I_KB, degradada por proteosomas (complexo proteolítico que degrada o I_KB). Ativo, ele transloca-se para o núcleo da célula e induz a transcrição de genes que codificam proteínas protetoras contra a apoptose. Há um equilíbrio entre a vida e a morte, e a célula sobrevive (fig 6). O papel fundamental deste fator de transcrição, resume-se em: 1) células normais pré-tratadas com um ativador do NF_KB que não induz a apoptose; a morte é bloqueada, ao serem submetidas depois à citocina TNF, contudo, essas células não serão bloqueadas para a morte se já expressavam um mutante do I_KB (“super-repressor” que sem o sítio de fosforilação necessário para degradar enzimaticamente o I_KB não ativa o NF_KB);

2) um inibidor de proteosoma aumenta significantemente a morte de células normais submetidas ao TNF; 3) a co-expresão do NF_κB em células que contêm o “super-repressor” anula o efeito protetor da inibição do NF_κB. Entretanto, o mecanismo exato de resistência das células ao TNF, das radiações ionizantes e dos agentes anticâncer ainda não é conhecido. O fato de a inibição da síntese de proteínas aumentar a morte mediada por TNF e outros agentes apoptóticos sugere que o NF_κB seja um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de um gene ou de um grupo de genes que codificam (ordenam a síntese) as proteínas protetoras contra a morte celular. Estudos evidenciaram que agentes anticâncer podem ser menos efetivos se ativarem ao mesmo tempo a apoptose e o NF_κB (HORTA, 1999).

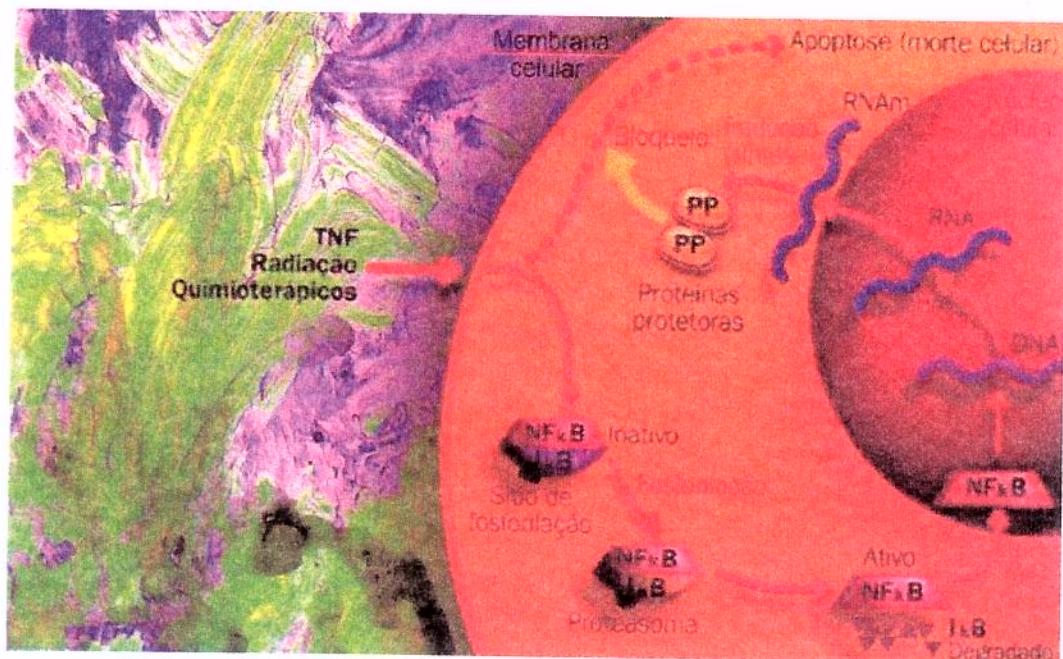


Figura 6: Esquema de supressão apoptótica pelo NF_κB.



OBJETIVOS

Considerando a importância de se estudar a expressão aumentada dos抗ígenos Fas e FasL nas células CD34⁺ na MO dos pacientes com SMD AR e ARSA, além de se determinar um protocolo para tratamento das SMD de baixo risco, o trabalho teve como finalidade observar:

- 1) As alterações morfológicas das células da MO após o uso da amifostina (AMF)
- 2) A eficiência do tratamento com o medicamento AMF
- 3) no quadro hematológico periférico
- 4) As alterações, em número absoluto, das células CD34⁺ e em percentagem, as células CD34⁺ que expressaram Fas/CD95 e FasL/CD95L após o uso da medicação em relação ao pré tratamento.
- 5) Este estudo foi realizado no âmbito de um protocolo clínico controlado com o uso da AMF no tratamento da SMD de baixo risco (AR e ARSA).



MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES

Pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, portadores de SMD com classificação FAB AR e ARSA, foram submetidos à terapêutica com AMF, conforme protocolo clínico introduzido em junho de 1999, atendidos no Hemocentro da Unicamp. Cada paciente foi avaliado antes e após a administração terapêutica (Ficha de inclusão e critérios de exclusão-Anexos).

A medula óssea de doadores para transplante alogênico foi utilizada como controle normal para os marcadores apoptóticos.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE PACIENTES NO ESTUDO (ANEXOS)

- *Aceitação de participação no estudo (termo de consentimento -Anexos);
- *estado clínico satisfatório;
- *pacientes com os subtipos AR e ARSA da classificação FAB;
- *Hb menor do que 10 g/dl ou anemia dependente da transfusão de eritrócitos;
- * número de neutrófilos menor do que $1,0 \times 10^3 \mu\text{l}$;
- *número de plaquetas menor do que $50,0 \times 10^3 \mu\text{l}$;

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE PACIENTES NO ESTUDO (ANEXOS)

- *não aceitação de participação no estudo;
- *estado clínico insatisfatório;
- *gestação;
- *hipotensão arterial sistêmica: pressão diastólica < 70,0mmHg;
- *miocardiopatias;
- *hepatopatias: bilirrubina total ou igual a 1,5 mg/dl;
- *nefropatias: creatinina > ou igual a 1,5 mg/dl;

ESQUEMA TERAPÉUTICO COM AMIFOSTINA

Amifostina: 400 mg/m²/ dose, diluída em 100ml de soro fisiológico 0,9% em infusão intravenosa durante 15 minutos, 3 vezes por semana, durante 3 semanas. Fazer intervalo de 2 semanas para descanso e repetir o mesmo esquema.

CRITÉRIOS DE RESPOSTA AO TRATAMENTO

*aumento da concentração de Hb > do que 1,5 g/dl sem transfusão de eritrócitos por 4 semanas ou redução da necessidade transfusional em pelo menos 50%;

*aumento do número de neutrófilos em 50% ou mais do número pré-tratamento;

*aumento do número de plaquetas em 50% ou mais do número pré-tratamento ou redução da necessidade transfusional em pelo menos 50%.

REAÇÕES COLATERAIS

Todos os pacientes foram submetidos a uma pré-medicação de succinato sódico de metilprednisolona (Solumedrol) e cloridrato de ondansetrona (Nausedron) para prevenir náuseas e vômitos que pudessem ocorrer durante ou após o procedimento de infusão da AMF. Esses sintomas foram identificados pela classificação WHO (Anexos).

AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Sangue periférico

Foram considerados os hemogramas de cada paciente, realizados no laboratório de hematologia do Hemocentro-UNICAMP. A dosagem da hemoglobina (Hb), o número absoluto e percentual dos leucócitos, dos neutrófilos e das plaquetas foram fornecidos pelo contador automatizado de células (Cell-Dyn 1700, USA).

MEDULA ÓSSEA

O estudo citológico da MO foi feito em esfregaços corados pelo Leishman e pela coloração do Azul da Prússia. Este exame foi realizado no diagnóstico, após os ciclos 2 e 6 nos pacientes respondedores. Nos casos suspeitos de transformação leucêmica o mielograma também foi avaliado. O diagnóstico da SMD e a identificação dos seus subtipos obedeceram os critérios da classificação FAB (Tabela 4).

Foram contadas 300 células, nas quais se considerou a percentagem de blastos, eritroblastos, granulócitos, sideroblastos em anel, relação granulócitos/eritroblastos (G:E) e, por fim, as atipias nas 3 séries: eritrocitária, granulocítica e plaquetária.

Tabela 4 : Aspectos hematológicos dos subtipos da SMD de acordo com a classificação FAB.

| | BLASTOS | | Corpúsculo de Auer | Monócitos SP ($1 \times 10^9 / l$) | Sideroblastos em anel $>15\% MO$ |
|---------------|---------|-------|-----------------------|---|-------------------------------------|
| | MO(%) | SP(%) | | | |
| AR | < 5 | <1 | -- | -- | -- |
| ARSA | <5 | <1 | -- | -- | + |
| AREB | 5-20 | <5 | -- | -- | + ou - |
| AREB-t | 20-30 | >5 | + | + ou - | + ou - |
| LMMC | <20 | <5 | - | + | + ou - |

AR: anemia refratária; **ARSA:** anemia refratária com sideroblastos em anel; **AREB:** anemia refratária com excesso de blastos; **AREB-t:** anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMC:** leucemia mielomonocítica crônica, **MO:** medula óssea; **SP:** sangue periférico

IMUNOFENOTIPAGEM

As células da MO foram suspensas e lavadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em solução tampão fosfatado (PBS) com azida, soro fetal bovino e pH 7,4, na concentração de 5×10^6 cels/ml. Amostras de 100 μl foram incubadas com tripla marcação, utilizando 5 μl de anticorpo monoclonal CD34 anti-humano conjugado com ficoeritrina (PE), CD95 anti-humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD45 anti-humano conjugado com proteína peridina de clorofila (PERCP) e os controles isotípicos IgG1 anti-humano conjugados com FITC, PE e PERCP, sendo que todos os anticorpos anteriormente citados foram adquiridos da Becton Dickinson-San Jose CA. Os anticorpos primários, coelho normal IgG e Fas-L (Q-20) coelho IgG (sc-956), e o anticorpo (Ac) secundário anti-coelho IgG de fluoresceína (FITC) (200 μg , diluição 1:20) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology.

Utilizamos as seguintes combinações: Tubo 1: IgG1FITC/PE/PERCP; Tubo 2: CD95/CD34/CD45; Tubo 3: coelho normal IgG/Anti-coelho IgG1-FITC/IgG1-PE/CD45; Tubo 4: FasL/Anti-coelho IgG-FITC/CD34/CD45. Primeiramente, foram incubados os Ac primários por 20 minutos (tubos 3 e 4) e depois adicionado o anticorpo secundário. Em seguida os Ac conjugados foram colocados em todos os tubos para a segunda incubação de 20 minutos. Os eritrócitos foram lisados adicionando 2 ml em cada tubo de solução lisante da BD na concentração de 1:10 por 10 minutos. Todo o procedimento ocorreu em temperatura ambiente e no escuro. Os tubos foram então centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos, lavados e ressuspensos em 1ml de PBS. A análise foi feita no aparelho citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), usando o programa Cell Quest. Foram adquiridos 30.000 eventos para cada tubo.

Utilizamos a citometria de fluxo para calcularmos a percentagem dos granulócitos e eritroblastos, além da relação G:E, comparando, posteriormente, com os resultados do mielograma. Para obtenção da percentagem dos granulócitos foi selecionada a população dos granulócitos (SSC alto com CD45 positivo) em um dot plot CD 45 x SSC. A percentagem dos eritroblastos, utilizando o mesmo dot plot anterior. Entretanto, o CD45

para os eritroblastos é negativo e o SSC é baixo (DIGIUSEPPE et al, 1996, figs 7A e 7B).. A população de linfócitos foi quantificada no pré tratamento e após 2 ciclos da amifostina pelo dot plot CD45 x SSC, sendo que essas células são fortemente positivas para o marcador pan leucocitário com baixa granularidade celular (figs.7A e 7B).

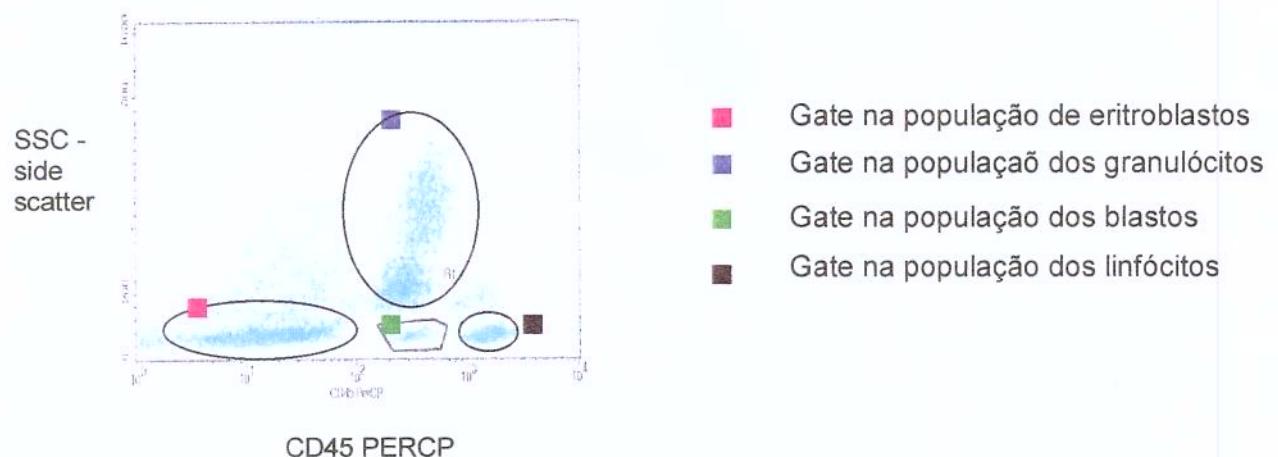


Figura 7A: Análise da MO de paciente com SMD AR antes do tratamento com AMF. Dot plot CD45 (marcador leucocitário) x SSC (side-scatter- granularidade celular). A população dos granulócitos, na gate azul, demonstra hipogranulação destas células pelo SSC baixo no citômetro de fluxo.

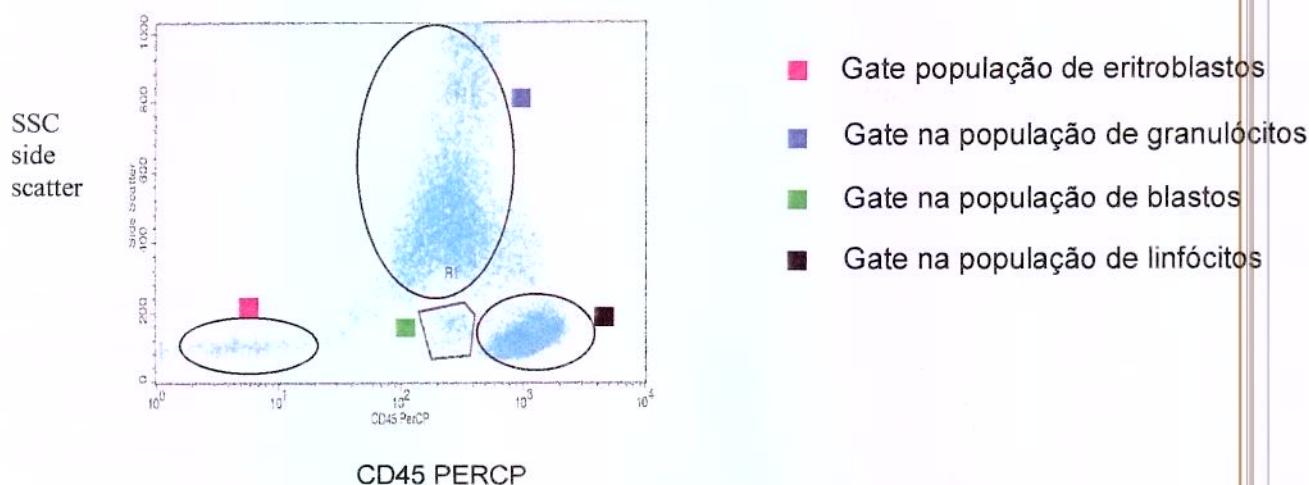


Figura 7B: Análise da MO da mesma paciente após segundo ciclo da AMF. Dot plot CD45 x SSC demonstrando recuperação da granulação na população dos granulócitos observado pelo aumento do SSC.

ANÁLISE DA APOPTOSE PELA IMUNOFENOTIPAGEM

Os marcadores CD34, CD95 e CD95L foram observados em amostras de MO em pacientes com SMD AR e ARSA. A análise imunofenotípica foi feita no pré e após 2 ciclos de AMF para todos os pacientes, e após 6 ciclos para os pacientes respondedores, de acordo com o protocolo de tratamento da AMF. Doadores para transplante alógênico de MO foram utilizados como controles negativos.

Normalmente, a análise de células blásticas em MO utiliza dot plot correlacionando CD45 (marcador pan leucocitário) com baixo SSC (ITO et al., 2001). A população blástica tem uma intensidade de fluorescência menor que a população de linfócitos e maior que a dos eritroblastos existentes na amostra da MO. Contudo, utilizamos o dot plot CD34 x SSC (Fig. 8A) considerando as células CD34 fortemente positivas (células CD34 sem diferenciação celular) para estudarmos o grau de apoptose. Blastos na MO em SMD são frequentemente CD34 positivos, apesar de não haver correlação desse marcador com número de blastos (ELGHETANY, 1998). Esse comportamento

imunofenotípico sugere anormalidades persistentes da expressão de CD34 nas células em maturação.

Para análise dos marcadores apoptóticos nas células precursoras mielodisplásicas, utilizamos dot plot CD95/CD34 e CD95L/CD34. Avaliamos o número absoluto de células CD34⁺ e a percentagem duplo positiva das células apoptóticas (fig. 8B e 8C).

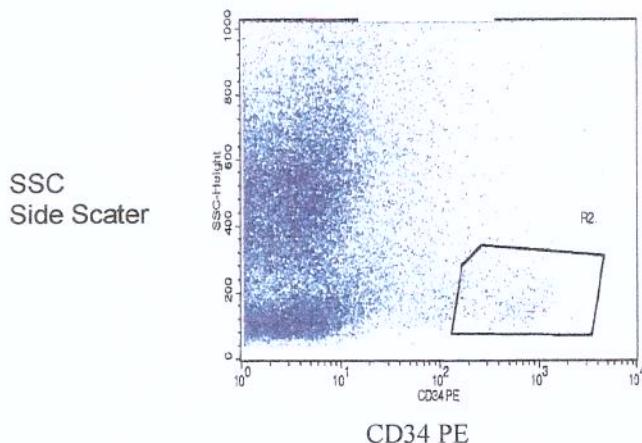


Figura 8A: MO de paciente com SMD AR apresentando número de células CD34 fortemente positivas (R1). Semelhante à MO normal. Dot plot CD34 (célula precursora hematopoética) x SSC (granularidade celular). Região R1 : 144 eventos (células) - 1,12%.

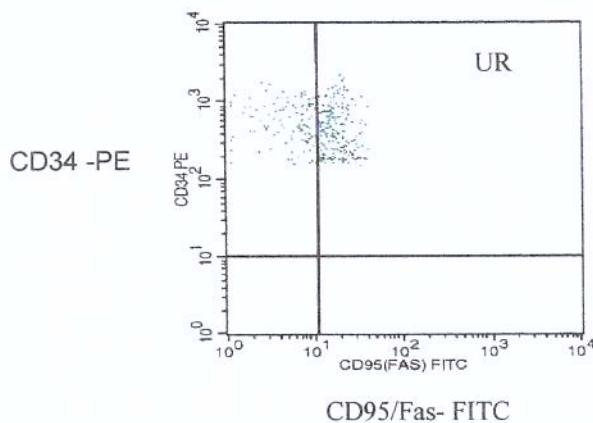


Figura 8B: Expressão duplo positiva, quadrante UR (upper right- mais acima e à direita), do marcador apoptótico CD95 x CD34 em paciente com SMD AR. Expressão aumentada em relação à MO normal. 202 eventos- 60,3

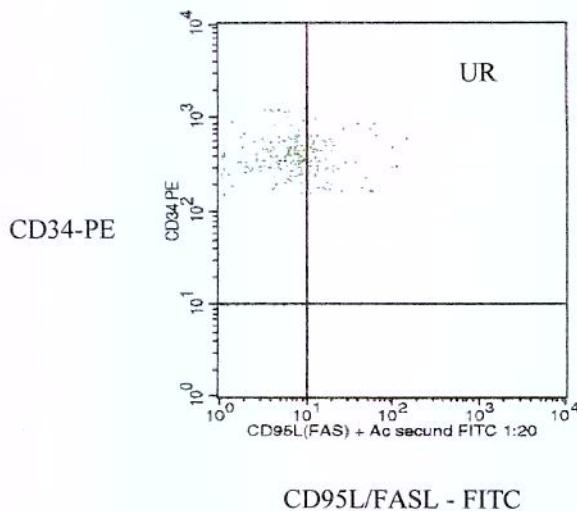


Figura 8C: Expressão duplo positiva do marcador apoptótico CD95L x CD34 em paciente com SMD AR. Expressão aumentada em relação à MO normal. 81 eventos- 32,9%

CARIÓTIPO

Em todos os pacientes foi colhido aspirado de MO para análise cariotípica. Essa análise foi realizada no pré, pós ciclo 2, e pós ciclo 6, nos pacientes respondedores, e nos casos suspeitos de SMD em transformação leucêmica. A análise das metáfases foi realizada pela técnica básica descrita por ROONEY & CZEPUKOWSKY (1992) e modificada por SWANSBURY (1997). As metáfases foram observadas também por um sistema computadorizado (Cytovision, Applied imaging Corporation) que facilita o pareamento dos cromossomos e a identificação das anormalidades.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva foi realizada considerando-se as medianas para dados clínicos, mielograma, hemograma (hemoglobina, granulócitos e plaquetas), CD34 (número absoluto) e marcadores apoptóticos (percentagem CD95 e CD95L), ao diagnóstico e após dois ciclos de tratamento com AMF. Considerou-se dois grupos, os pacientes que atingiram os critérios de resposta (respondedores) e os que não atingiram (não respondedores).

As diferenças do hemograma, do mielograma, do CD95 e do CD95L para os respondedores e não respondedores foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

Os dados do mielograma convencional e os obtidos por citometria de fluxo foram correlacionados pelo teste de Spearman. Foram considerados valores significativos de r quando $p < 0,05$. Este teste também foi usado para correlacionar dados do hemograma com os marcadores apoptóticos.



RESULTADOS

PACIENTES

Foram analisados 17 pacientes, sendo 11 casos AR e 6 ARSA (Tabela 5) que apresentaram critérios de inclusão no protocolo de tratamento. Os resultados individuais dos pacientes tratados com AMF estão nas fichas 1-17 (Anexos).

Tabela 5: Tipo FAB, idade e análise cariotípica da MO nos pacientes com SMD no início do tratamento com AMF.

| CASOS | FAB | IDADE | CARIÓTIPO |
|----------------|------|-------|-----------|
| Caso 1 | AR | 42 | NR |
| Caso 2 | AR | 51 | 46;XX |
| Caso 3 | ARSA | 79 | 46;XX |
| Caso 4 | AR | 60 | 46;XX |
| Caso 5 | AR | 55 | 46;XX |
| Caso 6 | AR | 76 | 46;XY |
| Caso 7 | AR | 78 | NR |
| Caso 8 | ARSA | 40 | 45,XX,-7 |
| Caso 9 | AR | 69 | NR |
| Caso 10 | ARSA | 53 | 46,XX |
| Caso 11 | AR | 71 | 45,X,-Y |
| Caso 12 | AR | 53 | 47,XY,+6 |
| Caso 13 | AR | 41 | NR |
| Caso 14 | ARSA | 59 | NR |
| Caso 15 | AR | 64 | 46,XY |
| Caso 16 | ARSA | 78 | 46,XX |
| Caso 17 | ARSA | 67 | 46,XY |

NR: não realizado

CARIÓTIPOS

Dos 12 cariótipos analisados no pré tratamento, 9 foram considerados normais, 1 com nulissomia do cromossomo Y, 1 caso com monossomia do cromossomo 7 (100% das metáfases analisadas) e outro caso com trissomia do cromossomo 6 (ver Tabela 5). Após o ciclo 2 da AMF, tivemos apenas 5 cariótipos analisados, sendo que no único anormal não houve alteração em relação ao pré (Ficha 8 - Anexos)

HEMOGRAMA

O resultado dos hemogramas no pré e após o ciclo 2 da AMF em todos os casos, e após o ciclo 6, nos pacientes que atingiram os critérios de resposta (respondedores) e já terminaram o tratamento, estão na tabela 8.

Dos 17 pacientes tratados, os quais obtinham $< 10,0 \text{ g/dl}$, $< 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ e plaquetas $< 50,0 \times 10^9/\text{l}$ (Anexos), 10 (58,8%) foram considerados respondedores em pelo menos uma série do hemograma após 2 ciclos de AMF (casos 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17) quando comparados aos valores pré tratamento.

Houve aumento da hemoglobina em $\geq 1,5 \text{ g/dl}$ em um paciente (5,88%), aumento no número de neutrófilos $\geq 50\%$ em 8 pacientes (47,05%) e aumento do número de plaquetas $\geq 50\%$ em 2 (11,76%). O caso 9 respondeu tanto nas plaquetas como nos neutrófilos.

O caso 5, com anemia inicial, apresentou resposta na série granulocítica após o segundo ciclo de tratamento com a AMF. A normalização da hemoglobina foi observada somente após o término do sexto ciclo.

O caso 6 apresentando inicialmente neutropenia e plaquetopenia no SP obteve aumento $> 50\%$ no número de neutrófilos após o ciclo 2 da AMF. Após o sexto ciclo a plaquetopenia persistiu mas manteve os valores da série branca.

O caso 8, que apresentava anemia discreta e plaquetopenia severa no início do tratamento, terminou o ciclo 6 com melhora apenas das células granulocíticas.

O caso 9, inicialmente com pancitopenia no SP, terminou o ciclo 2 com aumento no número das plaquetas e dos neutrófilos de acordo com o protocolo. Contudo, permaneceu anêmico, necessitando de transfusão de hemácias esporadicamente. Após o ciclo 6, a anemia persistiu.

O caso 10 iniciou o tratamento devido à anemia. Após o ciclo 2 o paciente apresentou aumento da hemoglobina de acordo com os critérios de resposta continuando o tratamento. Entretanto, após 6 ciclos da amifostina, a paciente manteve os valores normais da série branca, leucócitos e neutrófilos, e plaquetas, mas a hemoglobina permaneceu abaixo dos valores normais (Anexos -ficha 10).

O caso 11 iniciou o tratamento apresentando um quadro hematológico de pancitopenia periférica. A resposta inicial, após o ciclo 2, ocorreu nos granulócitos. Entretanto, após o ciclo 6, o paciente apresentou novamente neutropenia e não teve alterações nas séries eritrocitária e plaquetária do hemograma.

O caso 13, com quadro hematológico semelhante ao anterior, obteve resposta inicial com o aumento de 50% no número de plaquetas após o ciclo 2 em relação ao pré tratamento. Após os 6 ciclos o paciente obteve aumento de 50% nos neutrófitos e nas plaquetas em relação ao início do tratamento. O paciente recebe em média 1 transfusão de concentrado de hemácias ao mês.

O caso 14 apresentou quadro de anemia com necessidade transfusional antes de iniciar a AMF. Após 2 ciclos de tratamento o paciente obteve aumento de 50% no número de neutrófilos. Após os 6 ciclos a anemia persistiu, com necessidade transfusional de concentrado de hemácias em torno de 1 a 2 vezes por mês. Contudo, houve aumento de 50% no número de granulócitos e plaquetas em relação ao início do tratamento.

O caso 15, com pancitopenia periférica no pré tratamento, apresentou resposta na série granulocítica após os 2 ciclos. Contudo, logo após o quarto ciclo, o paciente veio a óbito devido a uma pneumonia bilateral

O caso 17, com anemia e neutropenia no início do tratamento, apresentou resposta satisfatória somente nos granulócitos após os 2 ciclos.

Os outros 6 casos (1, 2, 3, 4, 7, 12, 16) foram considerados pacientes não respondedores, por não apresentarem resposta em nenhuma série do hemograma após 2 ciclos de AMF, segundo o protocolo clínico de tratamento com amifostina. Portanto, esses pacientes foram conduzidos a tratamentos alternativos.

Em resumo, não encontramos diferença estatística significativa entre os dois grupos de respondedores e não respondedores quanto ao grau de citopenias periféricas (Tabela 6). Entretanto, observamos uma diferença altamente significativa na percentagem de linfócitos na MO no grupo de pacientes não respondedores comparado aos não respondedores no pré AMF ($p = 0,04$); enquanto após 2 ciclos a percentagem dos linfócitos, nos respondedores que já era menor, caiu quase que pela metade; sendo que, no outro grupo, aumentou mais ainda ($p = 0,008$) (Tabela 6).

Pacientes que tiveram maior número de neutrófilos após o tratamento tinha percentagem menor de linfócitos no pré tratamento (fig 9).

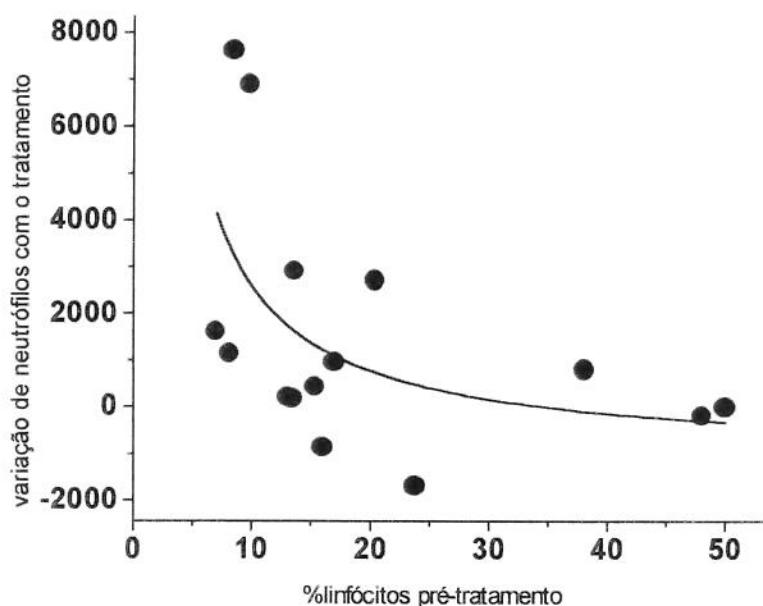


Figura 9: Relação entre a evolução dos neutrófilos no SP, durante o tratamento com AMF e a percentagem dos linfócitos, na MO, no pré tratamento.

MIELOGRAMA

A relação G:E (Granulócitos:Eritroblastos) foi obtida pelo mielograma convencional (citologia) e pelo aparelho citômetro de fluxo. Os dados foram comparados antes do tratamento e após o segundo ciclo da AMF em todos os casos e após o sexto ciclo nos respondedores (tabela 7). Houve correlação entre os dois métodos com $r = 0,94$ ($p < 0,0001$) ao diagnóstico (pré tratamento), e $r = 0,68$ ($p = 0,02$) após o ciclo 2 da AMF pelo teste de Spearman.

No grupo dos pacientes respondedores, as principais alterações do mielograma convencional foram a diminuição do grau de atipias e o aumento da relação G:E na maioria dos casos.

Contudo, nos pacientes não respondedores as atipias e a relação G:E, observados no pré e comparados ao término do ciclo 2 da AMF, não tiveram alterações significativas (Tabela 7).

No mielograma, os pacientes respondedores e não respondedores não tiveram relação G:E diferente ($p = 0,5$). No entanto, após 2 meses de tratamento, a percentagem dos granulócitos nos respondedores foi maior ($p = 0,04$), mas a percentagem dos eritroblastos não foi diferente ($p = 0,38$). Por isso, a relação G:E não foi diferente nos 2 grupos ($p = 0,42$). Na análise da MO pela citometria de fluxo os achados foram semelhantes ao da citologia convencional.

Em relação ao aumento de blastos no mielograma convencional, os casos 1 e 17 apresentaram 20% e 7,0% de blastos na MO, respectivamente, logo após o término do ciclo 2 (Anexos- fichas 1 e 17). Na citometria de fluxo as células CD34⁺ estiveram aumentadas apenas no caso 1.

Tabela 6: Comparação das características dos pacientes respondedores e não respondedores no pré e após 2 ciclos de tratamento com AMF.

| Pré Amifostina | Respondedores | Não Respondedores | P |
|--|---------------|-------------------|-------|
| Idade (anos) | 61,5 | 56,5 | NS |
| Hemoglobina (g/dl) | 7,85 | 8,55 | NS |
| Neutrófilos ($10^9/l$) | 1,1 | 1,2 | NS |
| Plaquetas ($10^9/l$) | 135,5 | 62,0 | NS |
| CD34⁺(nº abs) | 352,5 | 290,5 | NS |
| CD95/CD34(%) | 53,0 | 87,0 | 0,01 |
| CD95L/CD34(%) | 17,0 | 75,5 | 0,03 |
| % de Blastos (citologia) | 2,5 | 2,5 | NS |
| % Linfócitos (CF) | 14,5 | 27,4 | 0,04 |
| Após 2 ciclos de Amifostina | | | |
| Hemoglobina (g/dl) | 8,6 | 8,15 | NS |
| Neutrófilos ($10^9/l$) | 2,98 | 1,0 | 0,02 |
| Plaquetas ($10^9/l$) | 165,0 | 35,0 | NS |
| CD34⁺(nº abs) | 141,0 | 313,5 | NS |
| CD95/CD34(%) | 55,0 | 76,0 | NS |
| CD95L/CD34(%) | 24,0 | 75,0 | NS |
| % de Blastos (citologia) | 2,0 | 1,5 | NS |
| % Linfócitos (CF) | 9,3 | 47,6 | 0,008 |

NS: Não Significativo; CF:Citômetro de fluxo

Tabela 7: Mielograma pré e após 2 ciclos de tratamento com amifostina em todos os pacientes, e após 6 ciclos nos respondedores

| Casos | PRÉ AMIFOSTINA | | | | | | POS CICLO 2 AMIFOSTINA | | | | | | PÓS CICLO 6 AMIFOSTINA | | | | | |
|-------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------|-------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------|-------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|-----------|-------------------|---------------------------|----------------------------|--------------|
| | Relação G.E Mielograma | Relação G.E Cionomi- | % Siderob. em anal | % Blastos | Ajuia Megacar- | Ajuia Grau- lócitos | Relação G.E Mielogra-ma | % Siderob. em anal | % Blastos | Ajuia Megacar- | Ajuia Grau- lócitos | Relação G.E Mielogra-ma | % Siderob. em anal | % Blastos | Ajuia Megacar- | Ajuia Grau- lócitos | Relação G.E Mielogra-ma | |
| 1 | 4,8* | - | - | 5* | - | Aus | 4,0* | - | 0* | 20* | Aus | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 7,7 | - | 0 | 2,5 | Hipolob. | P. Pelger | 14,1 | - | - | 1 | Hipolob. | P. Pelger | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 2,0 | - | 66 | 3 | Raros | P. Pelger, Hipogr. | 1,13 | - | 54 | 3 | Hipolob. | Hipogr. | - | - | - | - | - | - |
| 4* | 9,6* | 49,6* | - | 0* | Raros | - | 11,6 | 10,8 | 0 | 0 | Raros | Aus | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 4,0 | 10,2 | 1 | 2 | Raros | P. Pelger, Hipogr. | 2,0 | 15,7 | 1 | 0 | Aus | Aus | 5,2 | 56,3 | 0 | 2 | Raros | Aus. |
| 6 | 0,9 | 1,45 | 0 | 3,5 | Freq. | Hipogr. | 2,5 | 62,2 | - | 4,5 | Aus | Aus | 1,8 | 9,8 | 0 | 2 | Raros | Hipogr. |
| 7 | 0,4 | 1,05 | 0 | 0 | Aus. | Ausente | 0,1 | 1,51 | 0 | 0 | Aus | Aus | * | - | - | - | - | - |
| 8 | 1,3 | 1,85 | 20 | 2 | Freq. | P. Pelger | 9,8* | 4,2* | - | 2* | - | - | 2,0 | 4,8 | 0 | 3 | Hipol. | P. Pelger |
| 9 | 3,0 | 6,94 | 0 | 4 | Freq. | P. Pelger, Hipogr. | 1,2 | 2,4 | 0 | 1 | Aus | P. Pelger | 1,2 | 1,8 | 0 | 3 | Raros | Hipogr. |
| 10 | 5,7 | 15,3 | 26 | 0 | Hiperlob. | P. Pelger | 15,2 | 6,9 | 35 | 0 | Aus | Aus | 7,9 | 2,3 | - | 0,5 | Raros | P. Pelger |
| 11 | 6,0 | 8,8 | 0 | 2 | Aus. | Hipogr. | 26,0 | 28,5 | - | 0 | Aus | Aus | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | 0,6 | 3,5 | 0 | 2 | Aus | Aus | - | - | - | - | - | - |
| 13 | 1,8 | - | 0 | 3,5 | Hipolob. | Hipogr. | 5,3* | - | - | 2* | - | * | * | * | 1* | * | * | * |
| 14 | 1,1 | 1,2 | 78 | 3 | Freq. | P. Pelger, Hipogr. | 1,9* | 2,1* | 0 | 3* | - | - | * | 1,58 | * | 1 | * | * |
| 15 | 20,0 | 20,7 | 0 | 2,5 | Freq. | P. Pelger | 13,0 | 76,4 | - | 2,5 | - | P. Pelger | - | - | - | - | - | - |
| 16 | 1,2 | 2,7 | 72 | 3,5 | Aus. | Hipogr. | 3,3 | 5,4 | 38 | 0 | Aus. | Aus. | - | - | - | - | - | - |
| 17 | 3,0 | 1,65 | 32 | 4,5 | Freq. | Aus | 45,0 | 3,6 | 18,9 | 7,0 | Freq. | Hipogr. | - | - | - | - | - | - |

P.Pelger: Pseudo Pelger (deficiência de fragmentação nuclear nos granulócitos); Hipogr.: Hipogranulação dos prónucleos; MO diluída em SP; Aus.: Ausentes; micronegacartocítos hipolobulados; * MO diluída em SP.

ESTUDO DA APOPTOSE

Os dados da quantificação de CD34, CD95 e CD95-L durante o tratamento com AMF estão na tabela 8.

Antes do tratamento, os dois grupos, pacientes respondedores e não respondedores, não se distinguiram pelo número de células CD34 (tabela 6). Entretanto, após o ciclo 2 em relação ao pré tratamento, no grupo dos respondedores, houve diminuição do número de células CD34 observado pelo teste χ^2 ($p<0,001$). Já no dos não respondedores, 4 mantiveram número inalterado destas células, mas houve aumento de 50% em 3 outros (Fig. 10A). Houve diferença significativa entre os 2 grupos ($p = 0,03$) em relação ao CD34.

No caso 1 houve aumento das células CD34⁺ logo após o ciclo 2. Antes do tratamento, a quantificação dessas células já estava alta, mas o mielograma não acusou o aumento na contagem de blastos, provavelmente pela má condição do material (Ficha 1-Anexos).

Em relação aos marcadores apoptóticos, não houve um padrão uniforme de alterações (Fig. 10B e 10C). De um modo geral os respondedores tiveram uma percentagem de Fas e FasL menor no diagnóstico que os não respondedores (Tabela 6). Entretanto, a percentagem de linfócitos aumentada no grupo dos não respondedores podem ter contribuido para uma expressão maior desses抗ígenos no pré tratamento. Após o tratamento, não houve mudança da percentagem destes marcadores em nenhum dos 2 grupos.

Tabela 8: Dados do Hemograma e Imunofenotipagem dos Pacientes

| Casos | Hb g/dl | N mm ³ | Pl x10 ³ | Pré Amifostina | | | | Pós ciclo 2 Amifostina | | | | Pós ciclo 6 Amifostina | | | | |
|-------|------------|----------------------|------------------------|----------------|--------------------|------------|----------------------|------------------------|---------------|----------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|---------------|----------------|
| | | | | CD34 nºabs | CD95/ CD34 % | Hb g/dl | N mm ³ | Pl x10 ³ | CD34 nºabs | CD95/C D34% | CD95/L/ CD34 % | Hb g/dl | N mm ³ | Pl x10 ³ | CD34 nºabs | CD95/C D34% |
| 1 | 6,6* | 0,7 | 24,0 | 2936 | - | 8,3 | 0,5 | 20,0 | 7084 | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 9,7* | 1,5 | 355,0 | 433 | - | 6,8 | 1,7 | 408,0 | 736 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 8,9* | 2,02 | 164,0 | 335 | - | 10,5 | 1,16 | 163,0 | 401 | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 6,9* | 2,7 | 100,0 | 246 | 84 | 7,9 | 1,0 | 47,0 | 226 | 76 | 16 | - | - | - | - | - |
| 5 | 8,0 | 2,7 | 164,0 | 100 | 58 | 8,6 | 10,3 | 118,0 | 145 | 56 | 27 | 13,4 | 4,4 | 180 | 40 | 07 |
| 6 | 12,5 | 1,3 | 25,0 | 380 | 44 | 17 | 10,8 | 8,2 | 18,0 | 74 | 69 | 35 | 10,4 | 6,1 | 29 | 177 |
| 7 | 8,2* | 0,9 | 16,0 | 68 | 87 | 70 | 9,3 | - | 23,0 | 57 | 37 | 75 | - | - | - | 24 |
| 8 | 10,1 | 1,5 | 4,0* | 437 | 67 | 34 | 11,5 | 4,2 | 3,0* | 482 | 54 | 17 | 10* | 4,4 | 05* | 407 |
| 9 | 6,7* | 0,19 | 88,0 | 335 | 44 | 09 | 8,6 | 3,1 | 136,0 | 261 | 71 | 27 | 9,0* | 1,54 | 156 | 238 |
| 10 | 8,7* | 6,2 | 331,0 | 49 | 45 | 17 | 9,1 | 9,0 | 279,0 | 47 | 51 | 40 | 9,1* | 9,4 | 245,0 | 76 |
| 11 | 8,8* | 0,8 | 148,0 | 158 | 52 | 65 | 8,2 | 1,6 | 194,0 | 137 | 50 | 19 | 7,4* | 0,53 | 145,0 | 404 |
| 12 | 9,9* | 0,9 | 24,0* | 16 | 89 | 81 | 8,0* | 0,9 | 21,0* | 58 | 87 | 83 | - | - | - | 17 |
| 13 | 6,6* | 0,9 | 123,0 | 487 | 35 | 30 | 7,0* | 1,33 | 200,0 | 388 | 33 | 28 | 8,3* | 1,61 | 200,0 | 591 |
| 14 | 7,7* | 1,9 | 194 | 136 | 65 | 27 | 8,7* | 2,87 | 202,0 | 37 | 72 | 47 | 8,2* | 8,2 | 337,0 | 46 |
| 15 | 4,8* | 0,8 | 50,0 | 505 | 55 | 17 | 7,8* | 2,4 | 44,0 | 121 | 18 | 16 | - | - | - | 54 |
| 16 | 8,9 | 1,69 | 255,0 | 245 | 29 | 13 | 10,0* | 1,85 | 177,0 | 160 | 42 | 52 | - | - | - | - |
| 17 | 4,0* | 1,10 | 321,0 | 370 | 54 | 26 | 7,6* | 2,24 | 262,0 | 390 | 57 | 21 | - | - | - | - |

Hb: hemoglobina; **N:** contagem de neutrófilos em valores absolutos; **Pl:** plaquetas* hemoglobina ou plaquetas com transfusão em período menor que 3 meses

CD34 (Número Absoluto)

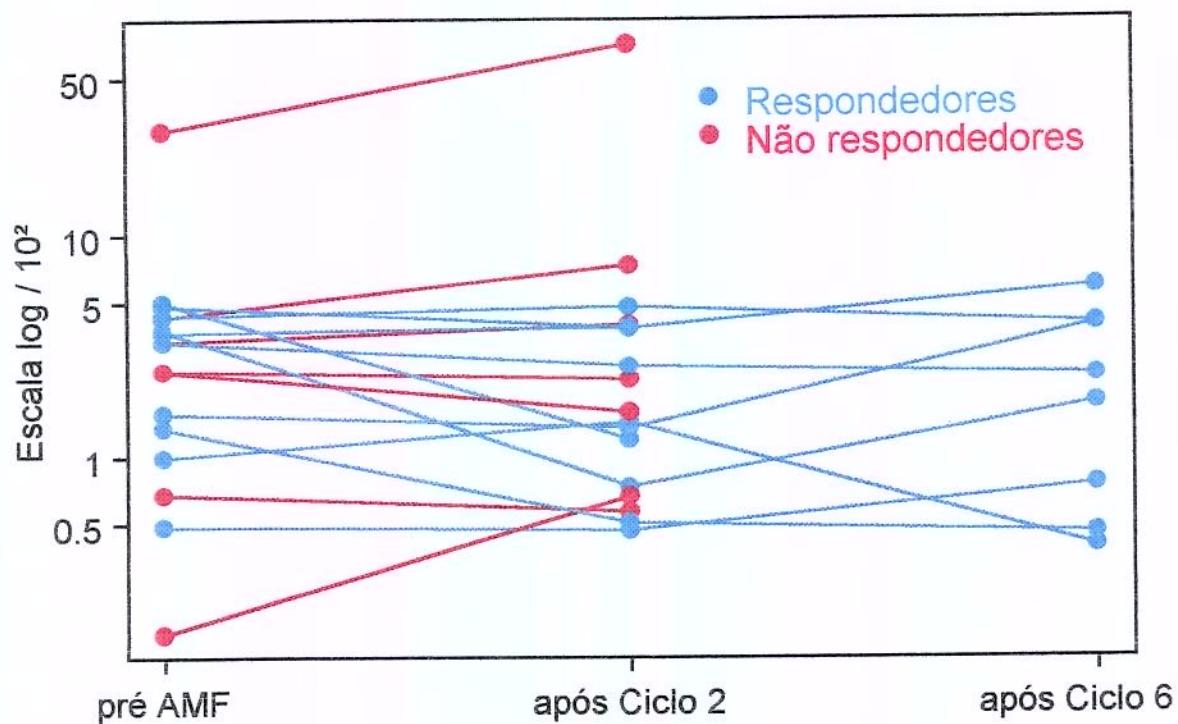


Figura 10A: Representação esquemática da expressão das células CD34⁺ (células precursoras hematopoéticas) em 17 pacientes, com SMD AR e ARSA, no pré e após 2 ciclos de AMF, e em 8 dos 10 respondedores após 6 ciclos de AMF. Dos 10 pacientes respondedores após o ciclo 2, 6 deles apresentaram diminuição das células CD34⁺, enquanto nos outros 4 não houve alteração em relação ao pré tratamento. No grupo dos não respondedores, 4 pacientes mantiveram as células CD34⁺ inalteradas, mas houve aumento de 50% nos 3 pacientes restantes. Após os 6 ciclos, os pacientes respondedores apresentaram, em relação ao ciclo 2, quadro variável com aumento das células precursoras em 4 pacientes, diminuição em 1 e sem alteração nos outros 3.

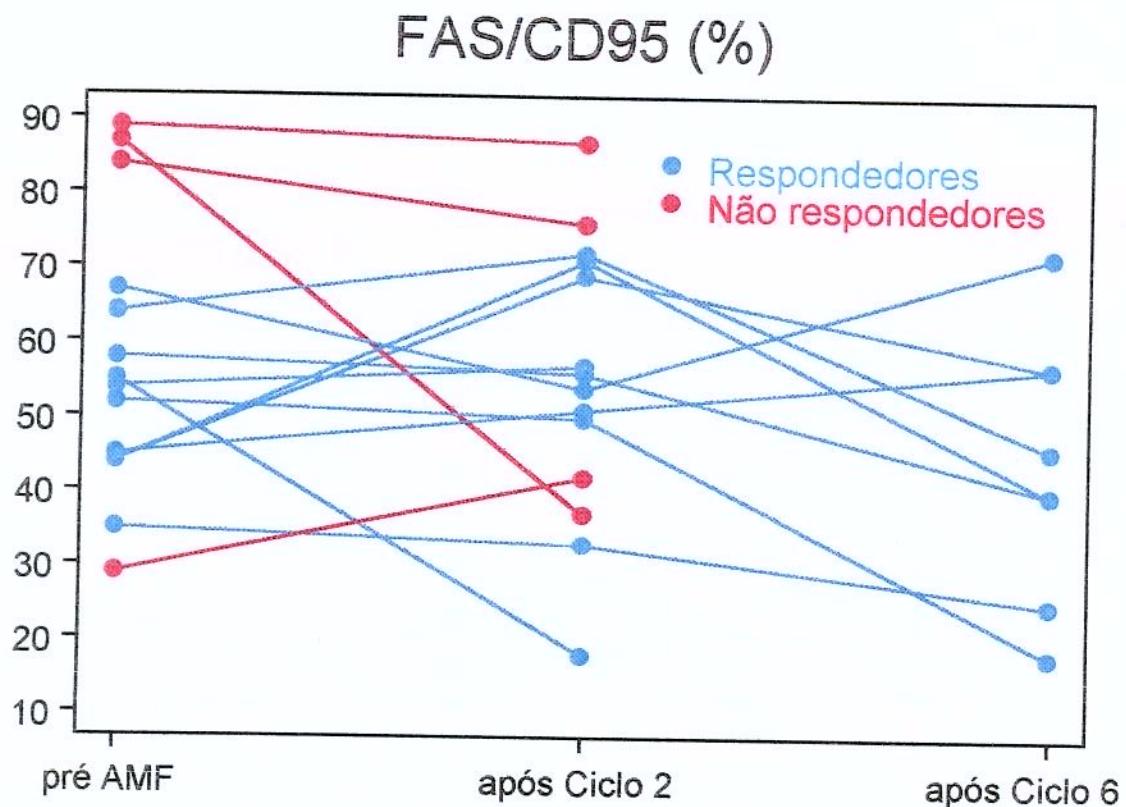


Figura 10B: Representação esquemática da expressão do marcador apoptótico Fas/CD95, em porcentagem (escala aritmética) nas células CD34⁺ dos pacientes com SMD AR e ARSA em 14 pacientes analisados no pré e após 2 ciclos de AMF, e em 8 dos 10 respondedores após 6 ciclos de AMF. Os pacientes respondedores apresentaram porcentagem de Fas/CD95 variável no pós ciclo 2 em relação ao pré tratamento. Houve aumento de CD95/Fas em 3 pacientes, diminuição em outros 2, e nos 5 restantes o marcador permaneceu inalterado. Em relação ao grupo dos não respondedores, no qual 4 foram analisados, houve aumento em 1, diminuição em um outro e sem alteração percentual nos outros 2. Após os 6 ciclos da AMF, em comparação com os 2 ciclos de tratamento, o Fas/CD95 apresentou percentagem aumentada em 2, em 5 diminuída e em 1 paciente não houve alterações.

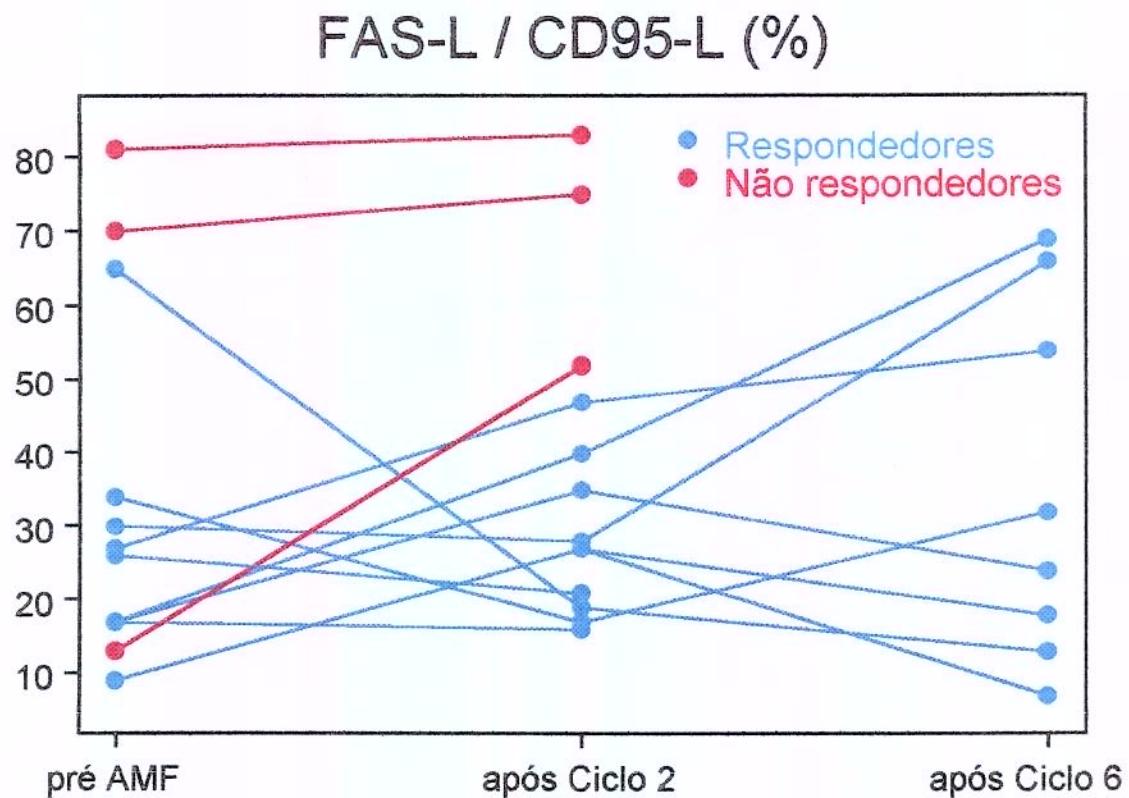


Figura 10C: Representação esquemática da expressão do marcador apoptótico FasL/CD95L em percentagem (escala aritmética) nas células CD34⁺ em 12 pacientes com SMD AR e ARSA analisados no pré e após 2 ciclos de AMF, e em 8 dos 10 respondedores após 6 ciclos de AMF. Os pacientes respondedores apresentaram percentagem de FasL/CD95L variável sendo que 4 deles tiveram aumento, 2 diminuíram e 3 mantiveram seus valores. Já os 3 casos de pacientes não respondedores que tiveram o FasL/CD95L analisado houve 1 caso em que houve aumento da percentagem enquanto nos outros 2 sem alterações. Após os 6 ciclos de AMF dos 8 respondedores, 4 tiveram aumento de FasL e diminuição nos outros 4.

REAÇÕES COLATERAIS

Todos os pacientes foram submetidos à pré-medicação, utilizando succinato sódico de metilprednisolona (Solumedrol) e cloridrato de ondansetrona (Nausedron), para prevenir náuseas e vômitos que pudessem ocorrer durante o procedimento de infusão da AMF. Esses sintomas, pela classificação Who (Anexos), foram identificados como grau I em 5 pacientes, grau II em 2 e grau III em 2 pacientes. Hipotensão arterial e hipocalcemia foram discretas em 11 e 10 pacientes, respectivamente.

Um dado ainda não relatado por estudos anteriores, mas que observamos em nossos pacientes, foi a presença de hipertensão arterial em 3 deles durante o uso da AMF. A pressão arterial foi observada e controlada após o término de cada infusão. Os pacientes foram liberados após a normalização da mesma.

ADESÃO E DIFICULDADES DE INCLUSÃO NO ESTUDO

A partir do segundo semestre de 1999, ao final de 2001, foram diagnosticados no ambulatório do Hemocentro da Unicamp 31 pacientes com mielodisplasia dos subtipos FAB AR e ARSA. No entanto, apresentaram critérios de inclusão, de acordo com o protocolo para o tratamento com AMF, 26 pacientes. Por motivos de idade avançada, falta de confiança na medicação, dificuldades de acesso ao local do tratamento ou por encaminhamento para transplante alogênico de medula óssea nos casos com pancitopenia grave, 9 não aderiram ao tratamento com a AMF.

No segundo semestre do ano de 1999, 3 pacientes preencheram os critérios de inclusão para adesão ao protocolo da AMF. No ano de 2001, a adesão dos pacientes com critérios foi maior que nos anos anteriores. Provavelmente, devido às baixas reações colaterais, pelo tempo (um ano) de uso desse protocolo de tratamento e pelos resultados satisfatórios em alguns casos tenham favorecido a adesão de outros pacientes em um prazo mais curto no segundo ano de estudo.

EVOLUÇÃO DOS PACIENTES RESPONDEDORES E NÃO RESPONDEDORES APÓS O TÉRMINO DO TRATAMENTO COM AMF

Os casos 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 foram considerados respondedores, enquanto os não respondedores incluem os casos 1, 2, 3, 4, 7, 12, 16.

Nos casos 1 e 17 houve progressão (aumento de blastos) após o término do segundo ciclo da AMF.

O caso 2, com quadro de anemia persistente e dependência de transfusões, fez uso de fatores de crescimento, como EPO e G-CSF durante 1 ano após a AMF. O número de transfusões não diminuiu, sendo então suspenso o tratamento. Utilizou ciclosporina, mas acabou progredindo para LMA 28 meses após o tratamento com AMF.

O caso 3, com quadro semelhante ao anterior, faz uso de EPO e G-CSF, com boa resposta. As transfusões sanguíneas diminuíram.

No caso 4, a paciente apresentou aumento de blastos na MO e circulantes após 10 meses do término do segundo ciclo. Faleceu em decorrência da LMA secundária.

O caso 5 não tem feito transfusões de hemácias e tem mantido a Hb normal (Hb = 15,0 g/dl) 20 meses após o término do ciclo 6 com AMF. Atualmente usa o medicamento Desferal (quelante de ferro) devido à ferritina alta.

O caso 6 não apresentou melhora do hemograma após o sexto ciclo da AMF. Atualmente trata-se com corticóides.

O caso 7, apesar de não se ter observado nenhuma resposta no SP após o ciclo 2, apresenta, atualmente, contagens periféricas estáveis e independência transfusional há 11 meses após o uso de EPO e G-CSF com uso contínuo. Os níveis leucocitários estão normais e as plaquetas estão com $142,0 \times 10^9/l$ (Anexos-ficha 7)

O caso 8, apesar da resposta após segundo ciclo, continua dependente de transfusões esporádicas de hemácias e frequente de plaquetas. Apresenta atualmente sangramentos gengivais e petéquias nos membros inferiores. Utilizou Globulina anti-timócito (ATG) e ciclosporina, não obtendo resultados significativos. Atualmente utiliza como tratamento EPO, G-CSF e FK506 .

O caso 9, após os 6 ciclos da AMF, apresentou leucopenia seguida de neutropenia e anemia. Atualmente está fazendo uso de G-CSF e recebendo uma transfusão de hemácias mensal.

No caso 12, até 3 semanas após o término do ciclo 2, o paciente apresentou número de leucócitos e granulócitos normais, temporariamente. Houve queda em todas as séries do hemograma com necessidade transfusional de hemácias e plaquetas regularmente.



DISCUSSÃO

Apesar da SMD ainda ter a fisiopatologia pouco conhecida, vários estudos têm sido realizados com o intuito de se estabelecer o mecanismo causador das citopenias periféricas.

A incidência excessiva da apoptose em SMD foi demonstrada primeiramente por avaliação ultraestrutural e morfológica das células mielodisplásicas pela técnica de TUNEL (avaliação das quebras do DNA) por KITAGAWA et al (1998) e pelo índice apoptótico (IA), observando a presença dos corpos apoptóticos (BOGDANOVIC et al., 1997). Essas técnicas avaliam o comprometimento nuclear individual das células em apoptose tardia através da microscopia óptica e eletrônica. Entretanto, a técnica da citometria de fluxo tem sido muito utilizada para a determinação de marcadores específicos da apoptose, quantificando-os de maneira mais sensível e rápida. Entre esses marcadores, destacam-se: a Annexina V que identifica, com alta afinidade, a fosfatidilserina, um fosfolipídio que da região interna transloca-se para a superfície externa da membrana plasmática quando a célula está entrando em apoptose; Iodeto de propídio (IP), que caracteriza uma célula em apoptose tardia (MERCHANT et al., 2001); os抗ígenos de superfície Fas e FasL; citocinas, como TNF- α e TGF- β ; oncoproteínas anti e pró apoptóticas e análise do DNA (presença de população hipodiplóide) pelo ciclo celular.

A falha da MO na SMD pode ser consequência de um processo autoimune mediado pela citocina TNF- α que está aumentada no soro e na MO dos pacientes mielodisplásicos, provavelmente derivado do número aumentado de linfócitos T citotóxicos circulantes, e possivelmente desencadeando uma resposta imunossupressora na MO dos pacientes mielodisplásicos (EPPERSON et al., 2001). Entretanto, nos dois grupos de pacientes tratados com a amifostina, respondedores e não respondedores, observou-se um número maior de linfócitos na medula óssea no segundo grupo quando comparado com o primeiro, antes de iniciar o tratamento. Esse resultado sugere que, no grupo que não respondeu à amifostina e apresentou um número maior de linfócitos, o sistema imune pode estar mediando a falha medular, e a terapia imunossupressora seria a mais indicada. Contudo, após o ciclo 2 da AMF essas células diminuíram no grupo respondedor enquanto no outro grupo os linfócitos aumentaram quase que 50% em relação ao pré tratamento.

Na literatura, não se tem observado correlações da atuação da AMF sobre a população linfocitária na medula óssea de pacientes mielodisplásicos.

As caspases que participam dos eventos da cascata apoptótica na SMD (MUNDLE et al, 2000) podem ser ativadas pelo citocromo C após ser liberado da mitocôndria; a caspase 3, especificamente pode ser ativada por enzimas lizossomais após tratamento com quimioterápico ectoposide (HISHITA, et al., 2001) e a caspase 8 pode ser ativada pelo sistema Fas/FasL ou por drogas como Taxol ou Epirubicina, utilizadas em tratamentos para neoplasias com comprometimento dos linfócitos B, independentemente do sistema Fas/FasL (WIEDER et al., 2001). Apesar da apoptose ser desencadeada por diversos fatores, o sistema Fas/FasL, mediado pelo TNF- α , parece ser a principal via de ativação da morte celular programada na SMD. Por isso, vários estudos têm sido realizados com o intuito de confirmar a importância deste sistema na apoptose e como o causador das citopenias na mielodisplasia.

Os抗ígenos Fas e FasL em células linfóides são identificados pelos anticorpos anti-CD95 e anti-CD95L, respectivamente, pelo método da citometria de fluxo, sendo a chave reguladora do fenômeno da apoptose no sistema imune (KRAMER et al., 1994; FRIESEN et al., 1996). Destacam-se 2 fatores da morte: o FasL e TNF, que se ligam aos seus receptores (Fas e TNFR, respectivamente), ativando o mecanismo da apoptose nas células envolvidas, levando-as à morte em poucas horas (NAGATA, 1997).

Estudo *in vitro* realizado por TAKENAKA et al (1996), utilizando aspirado de MO normal, demonstraram baixa incidência do Ag Fas sobre as células CD34 $^{+}$. NAGAFUJI et al (1995), em um estudo *in vitro*, demonstraram que, adicionando TNF- α e TGF- β , (citocinas inibitórias), houve aumento da expressão do antígeno Fas nas células CD34 $^{+}$. Quando se utilizou o anticorpo anti-Fas, nessas mesmas células, também observou-se o aumento da expressão Fas, desencadeando a apoptose com consequente decréscimo no número das células viáveis. Além disso, foram observadas alterações morfológicas e indução da fragmentação do DNA. Os resultados deste estudo sugerem a importância do Ag Fas e do TNF- α na indução da apoptose (TAKENAKA et al, 1996).

Na SMD, o Fas está hiperexpresso, juntamente com seu ligante (FasL), nas células CD34⁺ (KITAGAWA et al, 1998; ELGHETANY, 1998; DEEG et al, 2000), sendo que o TNF também se encontra em níveis aumentados, tanto na MO como no soro dos pacientes mielodisplásicos (SHETTY et al, 1996). A expressão alterada de oncoproteínas pró-apoptóticas (c-myc, gene p53) e anti-apoptóticas (gene bcl-2) nas células CD34⁺ da MO desses pacientes também fazem parte de um dos mecanismos envolvidos nas citopenias da SMD.

O Ag Fas e o gene bcl-2 parecem ter um papel importante na diferenciação das células hematopoéticas em medula óssea normal segundo TAKENAKA et al (1996). As células mieloides maduras ou diferenciadas apresentam o primeiro mas não o segundo, enquanto que nas células CD34⁺ ocorre o contrário. Esses resultados indicam que a diferenciação das células precursoras levam subsequentemente à ativação do processo de suicídio celular. Entretanto, o Fas e o bcl-2 podem se expressar de maneira diferente quando estão em contato com fatores de crescimento, como EPO e G-CSF. Esses fatores de crescimento parecem promover o aumento do bcl-2 enquanto os níveis de Fas nas células CD34⁺ da MO na SMD diminuem, podendo explicar a boa resposta dos pacientes não respondedores à AMF, ao tratamento alternativo utilizando EPO e G-CSF (TAKENAKA et al., 1996; GREENBERG, 1998).

Fatores prognósticos podem ser propostos nesta doença relacionando o grau de apoptose com o gene bcl-2. Os índices de apoptose nos grupos de baixo risco da SMD (AR e ARSA) quando comparados aos de alto risco (AREB, AREB-t, LMMC) são maiores enquanto que o gene bcl-2 se comporta de forma inversa (SCHMITT-GRAEFF et al., 2000). Esses dados sugerem a associação da hematopoeia ineficaz com a alteração da sobrevida das células precursoras para a presença das citopenias periféricas na SMD. Além disso, a progressão da SMD para LMA ocorre concomitantemente com o decréscimo da apoptose e o aumento dos níveis de sobrevida das células neoplásicas, (alta expressão de bcl-2), contribuindo para o acúmulo e a expansão subsequente das células precursoras anormais (RAJAPAKSA et al., 1996; DIGIUSEPE et al, 1996; PARKER et al., 1998; GREENBERG, 1998; YOSHIDA et al., 1999; SCHMITT-GRAEFF et al., 2000). Entretanto, a correlação inversa do grau de apoptose com o número de blastos sugere que

os blastos leucêmicos perdem expressão de Fas com a progressão da mielodisplasia (KITAGAWA et al., 1998, RIBEIRO et al, 2001).

A citometria de fluxo é um método utilizado para analisar a expressão de抗ígenos celulares através de anticorpos monoclonais específicos de linhagem e grau maturacional. Este método tem sido muito usado nas neoplasias hematológicas para auxiliar no diagnóstico das leucemias agudas e SMD de alto risco que possuem uma população de blastos em alta porcentagem. Os marcadores imunofenotípicos são analisados pela correlação do CD45 x SSC, que distinguem eficientemente a população de células blásticas da linfóide, eritrocitária e das células granulares mais diferenciadas. Em nosso estudo, utilizamos pacientes diagnosticados com SMD de baixo risco (AR e ARSA) que apresenta < 5% de blastos no mielograma convencional de acordo com a classificação FAB. Contudo, analisamos os marcadores apoptóticos Fas e FasL nas células precursoras na população fortemente positiva para o CD34. Com isso, eliminamos as células imaturas que permaneciam na região de blastos pelo CD45 x SSC, mas que já estavam em processo de diferenciação avançado e já não expressavam esse marcador de imaturidade. Além disso, vários estudos (NAGAFUJI et al, 1995; RAJAPAKSA et al, 1996, TAKENAKA et al, 1996, PETERS et al., 1998) utilizaram a população de células CD34⁺ para analisar marcadores apoptóticos e oncoproteínas, com resultados satisfatórios. Os blastos na medula óssea da SMD são frequentemente positivos para CD34, mas podem apresentar persistência de expressão anômala desse marcador sobre células em maturação na medula óssea e no sangue periférico. O número de células da MO aumentado que expressam o marcador de imaturidade pode correlacionar com pior prognóstico devido à presença de transformação leucêmica (ELGHETANY, 1998). Contudo, a citometria de fluxo parece ser um método mais sensível na questão de progressão leucêmica que a citologia. O caso 1 de nosso estudo, por exemplo, apresentou aumento considerável de células CD34⁺ no pré tratamento enquanto no mielograma não se observou aumento no número de blastos.

A detecção da hipogranulação (alteração morfológica da série granulocítica característica na SMD) pelo CD45 x SSC, também pode ser observada pela citometria de fluxo. Pudemos observar a recuperação da granulação, principalmente nas células granulocíticas mais maduras, comparando a MO do pré tratamento e após 2 ciclos de AMF

pela relação G:E. Essa relação obtida no citômetro e comparada com a do mielograma convencional foi altamente significativa em nossos pacientes para o diagnóstico e após o segundo ciclo com AMF.

Em relação ao tratamento das SMDs com a AMF, estudos foram feitos baseando-se no mecanismo de ação relacionado com os possíveis efeitos anti-apoptóticos. Os primeiros estudos, primeiramente *in vitro*, feito por KLIMECKI et al (1997), demonstraram um decréscimo da apoptose em células CD34⁺ após exposição à AMF. Um outro estudo, mas *in vivo*, realizado por LIST et al (1997), apresentou uma melhora nas proporções das citopenias existentes no sangue periférico dos pacientes mielodisplásicos, além de estimular a hematopoese após o tratamento com esse medicamento. A AMF tem um efeito de supressão (inibição) apoptótica nas células progenitoras hematopoéticas por ativar o fator de transcrição NF_KB responsável pela inibição da apoptose celular, observado por LIST et al (1998), ROMANO et al (1999) e GALANOPPOULUS et al. (2001). Esse mecanismo pode ter ocorrido naqueles casos em que o número das células CD34 permaneceu constante (as células precursoras não entraram mais em apoptose) ou aumentou (as células além de não morrerem prematuramente a AMF proporcionou a estimulação da hematopoese) após o tratamento.

MORONI et al (1999) demonstraram, em um estudo utilizando a técnica de TUNEL, a redução de células apoptóticas na MO de paciente com SMD ARSA após tratamento com AMF. Esses autores puderam comprovar a atuação antiapoptótica do etiol.

A AMF parece atuar na MO normal como inibidor das respostas aos sinais apoptóticos. Contudo, esse medicamento pode agir de outra forma, segundo RIBIZZI et al (2000), promovendo citotoxicidade no clone mielodisplásico e sendo capaz de restaurar a MO desses pacientes com células normais. Os tratamentos que utilizam quimioterapia produzem alterações discretas na cinética do ciclo celular, enquanto a AMF estimula as células a vários estágios do ciclo celular (RIBIZZI et al, 2000). Observou-se por esses autores um aumento na porcentagem de células em fase G0/G1 e diminuição na Fase S do ciclo celular, além da presença de população hipodiplóide demonstrando a indução apoptótica pela AMF. RIBIZZI et al. (2000) observaram *in vitro* o comportamento das células CD34⁺ da MO de pacientes com SMD, após incubação com concentrações

diferentes de AMF. Os autores observaram duas populações na SMD: uma população monoclonal que adquiriu uma vantagem proliferativa e responsável pela progressão para LMA em 30% dos casos, e a normal. A presença das células anormais induz a apoptose na população normal da MO, provavelmente devido à produção de citocinas promovida pela primeira, como TNF- α e TGF- β (RAZA et al., 1996). Por isso, houve casos em que as células CD34 aumentaram em número (células normais foram estimuladas pela AMF devido ao desaparecimento do clone monoclonal e da influência das citocinas produzidas por ele) ou apresentaram queda (células monoclonais foram induzidas à apoptose e a população normal ficou estável) após o segundo ciclo de tratamento com a AMF.

Estes resultados mostram a atuação controversa da AMF na MO mielodisplásica. No nosso estudo, observamos que, embora o grupo de pacientes respondedores não diferisse significativamente dos não respondedores em relação ao grau de citopenias e ao número de células CD34 $^{+}$, o primeiro grupo apresentou menor expressão dos抗ígenos Fas e FasL antes do tratamento. Após o segundo ciclo da AMF, o número das células precursoras se manteve estável nos que responderam, enquanto que nos respondedores houve uma diminuição das mesmas.

Em relação ao hemograma obtivemos uma correlação positiva entre a percentagem de Fas e o número absoluto de neutrófilos. Esse dado sugere a influência da morte celular programada, pelo receptor Fas, nos casos de neutropenia na SMD.

Estudos clínicos (LIST et al., 1997; GROSSI, et al., 2000; GUALANOPPOULUS et al., 2001) mostraram que nos casos em que as plaquetas apresentavam contagens inferiores a $50,0 \times 10^9/l$ no hemograma inicial, a AMF não tinha uma ação significativa, igualmente observado em nossos resultados. O que se percebe é que o aumento em número da população plaquetária não dependeu apenas da estimulação da hematopoesie, da supressão ou da indução da apoptose promovida pela AMF, já que não houve aumento nem diminuição considerável dessas células após o tratamento.

Os pacientes apresentaram grandes oscilações nas contagens periféricas durante o tratamento, com diminuição em número das séries do hemograma durante o intervalo de 15 dias entre um ciclo e outro, mas com recuperação no decorrer dos ciclos. Além disso, a expressão do Fas e FasL diminuiu após o sexto ciclo em alguns casos, amenizando as citopenias em outros, o que indica a importância dos 6 ciclos de tratamento com AMF.

LIST et al (1997) também observaram que o efeito positivo da AMF cessa com a descontinuação da droga, sugerindo que o tratamento prolongado é mais eficaz.

Utilizamos a dose de 400 mg/m² para que não houvesse maiores efeitos colaterais constatados em doses superiores (LIST et al, 1997). O tratamento com AMF não provocou intercorrências significativas em nossos pacientes, apresentando efeitos colaterais como náuseas e vômitos toleráveis, hipocalcemia discreta e hipotensão transitória. Apesar das reações colaterais observadas terem sido toleráveis, o alto custo da medicação e a necessidade de internação prejudica a factibilidade do tratamento prolongado com a AMF.

Nos casos estudados, assim como na literatura (LIST et al, 1997; HOFFMAN et al, 2000; GROSSI et al, 2000), a série granulocítica foi a primeira a responder e a que apresentou melhor resposta em relação aos valores absolutos do hemograma. Entre os nossos pacientes, para cada caso individual, a variação foi bastante heterogênea. No entanto, embora houvesse uma tendência à queda da expressão do Fas/FasL esta não foi significativa.

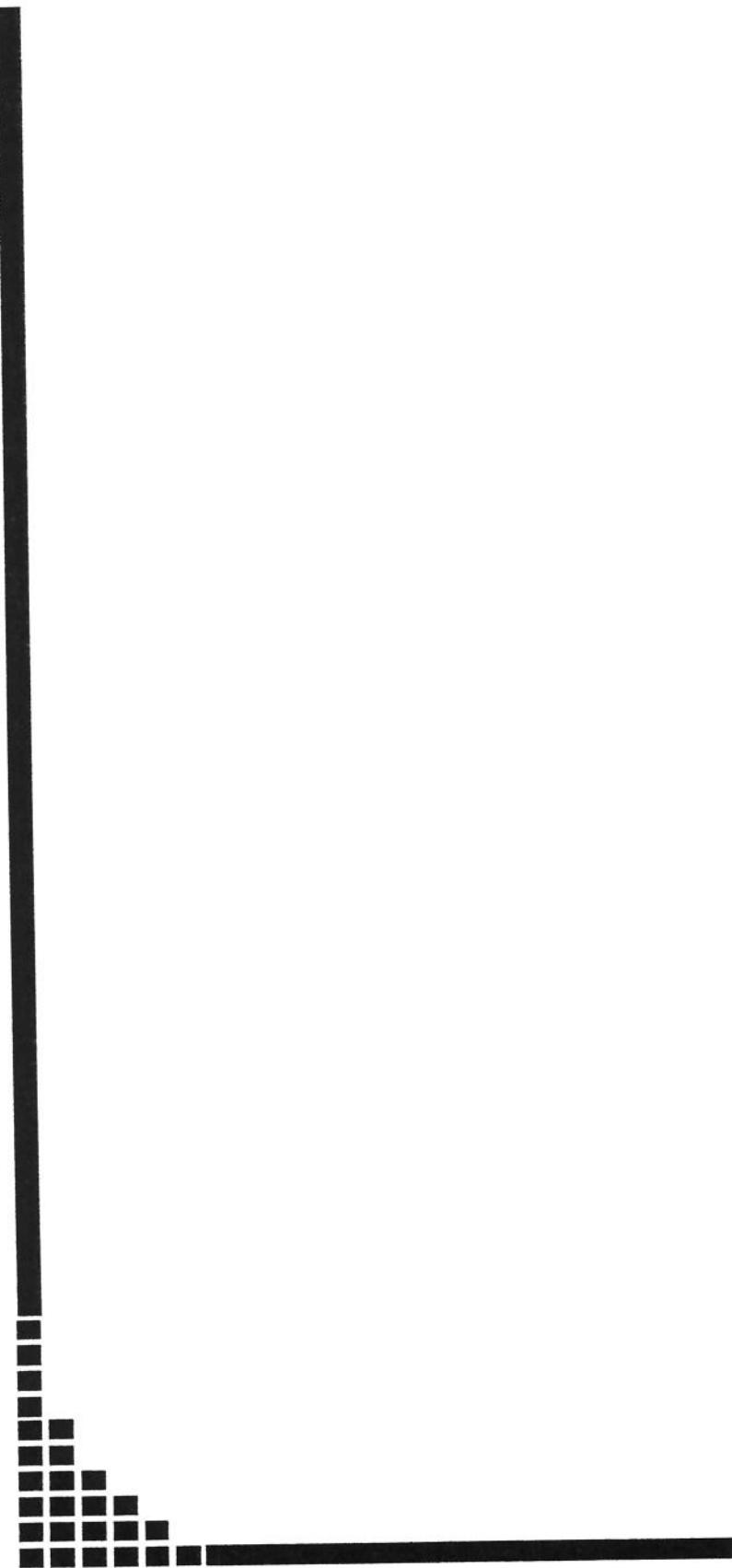
Dos 17 pacientes estudados, 4 (23,5%) apresentaram transformação leucêmica durante ou após o tratamento com AMF. Esta proporção é muito alta para SMD de baixo risco. Num estudo brasileiro (MAGALHÃES, 2001), a taxa de transformação leucêmica de SMD AR/ARSA foi de 9,5%. Poderíamos levantar 2 hipóteses para esse fato: o tratamento com AMF poderia ter facilitado esse quadro leucêmico modificando o equilíbrio do clone neoplásico ou, embora os casos tratados fossem de SMD AR e ARSA, os critérios de inclusão usados no protocolo terapêutico poderiam ter selecionado os casos mais graves com maior chance de transformação leucêmica. Seriam necessários estudos randomizados, tendo os 2 grupos de pacientes com as mesmas características para estabelecer com segurança se a AMF seria capaz de induzir o quadro leucêmico ou não.

SHIMAZAKI et al (2000) sugeriram, em seus estudos, que a inibição dos mecanismos apoptóticos pode induzir à transformação leucêmica. LIST et al (1997), utilizando a AMF para estimulação da hematopoese em SMD, observaram um aumento do número de blastos em casos AREB com cariotipo anormal após o tratamento. SANTINI & GILES (1999) e GROSSI et al (2000), em seus estudos, também apresentaram pacientes

mielodisplásicos com transformação leucêmica após o uso da AMF. Diante de todos esses estudos seria necessário uma avaliação minuciosa sobre a atuação da AMF em relação à alteração do quadro de SMD, no intuito de não utilizar esse medicamento em casos de alteração cariotípica ou em SMD de alto risco.

Vários estudos foram feitos para tentar compreender a atuação da AMF em pacientes com SMD. Os protocolos diferentes adotados por cada autor, em relação à doses da droga, número de ciclos, tempo de tratamento, critérios de resposta e inclusão de pacientes com SMD de alto risco, dificultaram as correlações entre os estudos.

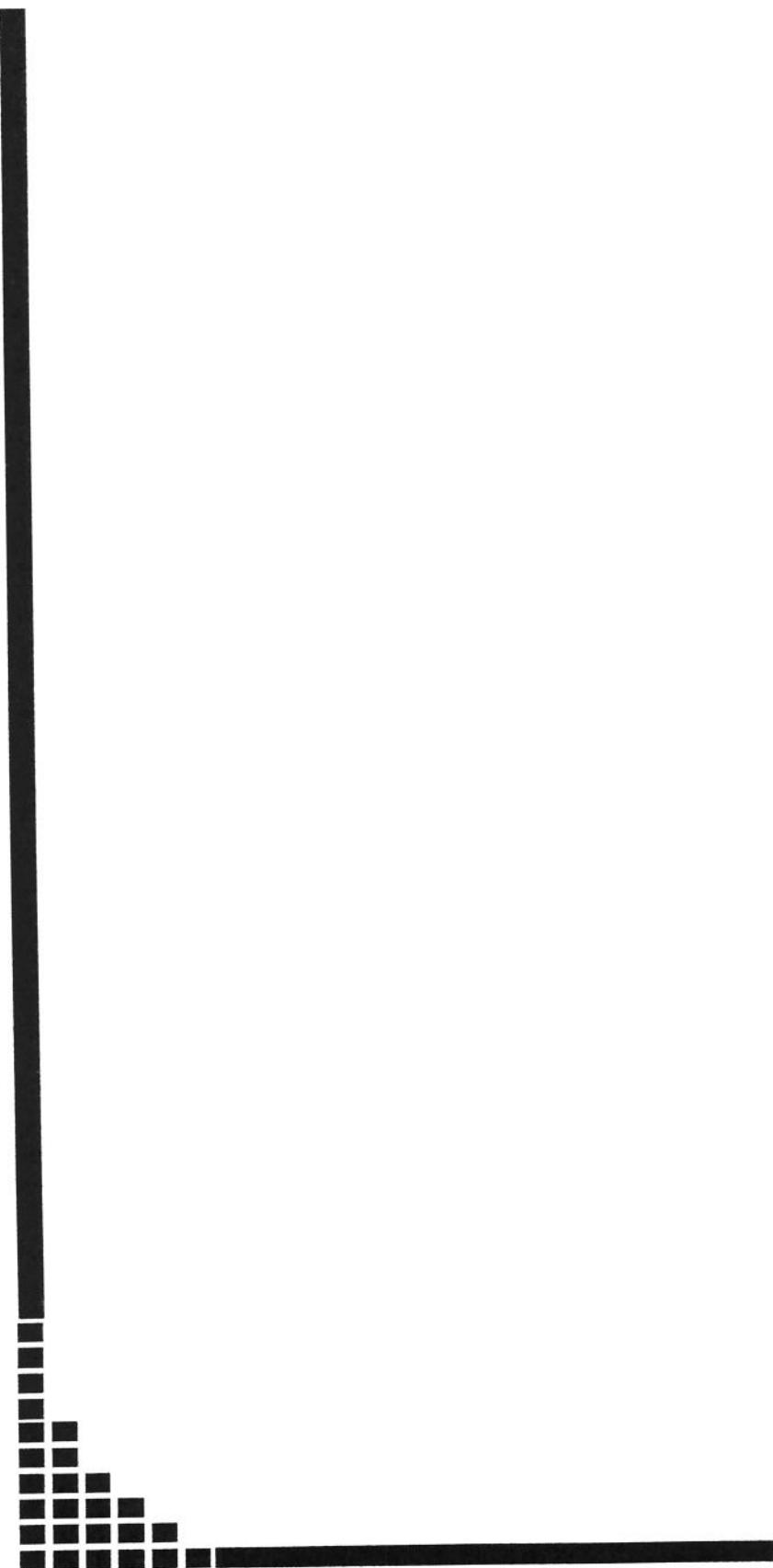
Contudo, para concluirmos a eficácia da amifostina nas citopenias periféricas, na influência sobre as células normais e nos clones anormais da SMD, além da apoptose excessiva existente nessa doença, seria necessário estudar um maior número de casos.



CONCLUSÕES

Nos 17 casos tratados com AMF, pudemos observar:

- 1) Com a dose e esquema utilizados foi possível obter critérios de resposta em pelo menos uma das 3 séries em 10 casos (58,8%), o que demonstra resultados satisfatórios e semelhantes quando comparados a outros estudos;
- 2) A série granulocítica no sangue periférico foi a que mais respondeu ao medicamento, como já demonstrado em outros estudos clínicos;
- 3) Observamos o aumento de células CD34⁺ e/ou blastos no mielograma de 4 casos: um deles no início do ciclo 2, após 28 meses, em um outro ao final e o quarto caso 10 meses depois. Com isso, é possível que a droga tenha influenciado na transformação leucêmica;
- 4) Número de células CD34⁺ antes do tratamento não teve caráter preditivo para resposta. Contudo, o grau da apoptose sugere que a AMF seja eficaz em casos de SMD com menor desregulação da cinética celular, já que a expressão dos receptores Fas e FasL, no grupo dos respondedores, apresentou-se com menor expressão comparado aos não respondedores;
- 5) A resposta no sangue periférico após o tratamento com a AMF esteve associada à diminuição do número de células CD34⁺, o que pode indicar uma supressão do clone anormal da SMD.
- 6) Pacientes não respondedores apresentaram número de linfócitos medulares maior, tanto no pré como no após 2 ciclos da AMF, comparado aos respondedores. No entanto, é possível que nos não respondedores a amifostina não conseguiu reverter a atuação do sistema imunológico mediando a falha medular.



SUMMARY

Amifostine has been used in the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS) aiming to reduce apoptosis in bone marrow (BM) precursor cells that is increased in these disorders. Patients with low risk MDS (RA and RARS by FAB criteria) were treated with amifostine 400 mg/m² (3x/week, 3 weeks, 2 weeks interval). Expression of Fas and FasL in CD34+ cells in BM was studied before and after treatment and correlated with changes in peripheral blood and BM after therapy. Seventeen patients entered the study (11 RA and 6 RARS). After 2 months, 8 patients (47%) showed a rise of neutrophil count >50%. Hemoglobin raised in 1 patient and platelets in 2 patients. Four patients presented a raise in bone marrow blasts during or after treatment. According to pretreatment parameters, responders had a significant lower expression of Fas (median 53%) and FasL (median 17%) on CD34+ cells than non-responders (median 87% and 75,5% respectively). The percentage of BM lymphocytes was significantly lower in responders (median 14,5% for responders and median 27,4% for non responders). In responders the number of CD34+ cells decreased but Fas and FasL did not show significant changes. There was an inverse correlation between change in peripheral neutrophil count after treatment and the percentage of BM lymphocytes before treatment. Response to amifostine was observed in patients with a lower expression of Fas/FasL in CD34+ cells and a lower percentage of BM lymphocytes. A more severe immunological reaction in BM prevented response to amifostine.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ARIAS, V.; Lorand-Metze, I.; Lima, C.S P.; Soares, F.A. – Síndrome mielodisplásica: Aspectos histopatológicos; *Ámbito Hospitalar* 9:44-48, 1998
- ASHKENAZI, A. & Dixit, V.M. - Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281:1305-08, 1998.
- BADLEY, A.D.; McElhinny, J.Á.; Leibson, P.J.; Lynch, D.H.; Alderson, M.R.; Paya, C.V. – Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes, *Journal of Virology*, 70:199-206, 1996.
- BEG, A.A. & Baltimore, D. – An essential role for NFKB in preventing TNF- α - Induced cell death. *Science*, 274:782-784, 1996.
- BENNETT, J.M. - Classification of myelodysplastic syndromes. *Clinical Haematol*; 15 (4):909-23, 1986.
- BENNETT, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.; R. & Sultan, C. - The French-American-British cooperative group: Proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *British Journal Haematology*, 51:189-99, 1982.
- BERGAMASCHI, C.; Rosti, V.; Danova, M.; Lucotti, C. & Cazzola, M. - Apoptosis: biological and clinical aspects. *Haematologica*, 79, 86-93, 1994.
- BERIS, P. - Primary clonal myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*, 26:216 -33. 1989.
- BOGDANOVIC, A.D.; Trpinac, D.P.; Jankovic, G.M.; Bumbasirevic, V.Z.; Obradovic, M.; Colovic, MD. – Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment, *Leukemia*. 11(5):656-59, 1997.
- BOUSCARY, D.; De Vos, J.; Guesnu, M.; Jondeau, K.; Viguer, F.; Melle, J.; Dreyfus, F. & Fontenay-Roupie, M. - Fas/Apo-1(CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 11:839-45, 1997.

CALLERA, F.; Aglair, B.G.; Falcão, R.P., – Fas - mediated apoptosis with normal expression of bcl-2 and p53 in lymphocytes from aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, 100:698-703, 1997.

DANSEY, R. Myelodysplasia. **Curr Opin Oncol**, 12:13, 2000

DEEG, H.J; Cassandra, B; Loken, M.; R; Bryant, E; Lennikova, M; Shulman, H; Gooley, T. – Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome, **Leukemia Research**, 37(3-4): 405-14, 2000.

DIGIUSEPPE, J.A.; Lebeau, P.; Augenbraun, J.; Borowitz, M.J. – Multiparameter flow cytometry analysis of bcl-2 and fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis. **Hematopathology**,(106):345-51, 1996

ELGHETANY M.T. - Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndromes, **Haematologica**, 83:1104-15, 1998.

EPPERSON, D.E.; Nakaruma, R.; Saunthararajah, Y.; Melenhorst, J.; Barret, ^aJ. – Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: evidence for an autoimmune process. **Leukemia Research**, 25:1075-83, 2001.

FRIESEN, C.; Herr, I.; Krammer, P.H.; Debatin, K.M. - Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells, **Nature Medicine**, 2: 574-77, 1996.

FONTENAY-ROUPI, M.; Bouscary, D.; Guesnu, M.; Picard, F.; Melle, J.; Lacombe, C.; Gisselbrecht, S.; Mayeux, P.; Dreyfus, F. - Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. **British Journal Haematology**. Aug,106(2):464-473, 1999.

GALANOPOULOS, A; Kritikou-Griva, E.; Gligori, J.; Michalis, E.; Grigoraki, V.; Marinakis, T.; Kakkas, J.; Tasiopoulou, A; Anagnostopoulos, N.I. - Treatment of patients with myelodysplastic syndrome with amifostine. **Leukemia Research**, 25, 665-71, 2001.

GALLAGHER, A.; Darley, R.L. & Padua, R. - The molecular basis of myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, 82:191-204, 1997.

GERSUK, G.M.; Lee, J.W.; Beckham, C.A.; Anderson, J. & Deeg, H.J. - Fas (CD95) receptor and fas-ligand expression in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. **Blood**, 88:1122-23, 1996.

GERSUK, M.G.; Beckham, C.; Loken R.M.; Kiener, P.; Anderson, E.J.; Farrand, A.; Troutt, B.; Ledbetter, A.J.; Deeg, J.H. - A role for tumor necrosis factor-alfa, Fas and Fas-ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndromes **British Journal of Haematology**, 103:176-88, 1998.

GREEN, D.R. & Reed, J.C. - Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281:1309 -12, 1998.

GREENBERG, PL.; Cox, C.; Lebeau, M.M.; Fenaux, P.; Morel, P.; Sanz, G.; Sanz, M.; Vallespi, T.; Hamblin, T.; Oscier, D.; Ohyashiki, K.; Toyama, K.; Aul, C.; Mufti, G.; Bennett, J. – International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, **Blood**, 89:2079-88, 1997.

GREENBERG, P.L. – Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. **Leukemia Research** 22(12):1123-36,1998.

GROSSI, A; Fabri, A.; Santini, V.; Leoni, F.; Nozzoli, C.; Longo, G.; Pagliai, G.; Ciolfi, S.; Ferrini, P.R. - Amifostine in the treatment of low-risk myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, 85:367-71, 2000.

HETTS, S.W. - To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. **Jama**, 279(4):300-07, 1998.

GUPTA, P.; Niehans, G.A.; Leroy, S.C.; Gupta, K.; Morrison, V.A.; Schultz, C.; Knapp, D.J.; Kratzke, R. – Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival. **Leukemia**, 13(1):44-53, 1999.

HAHNE, M.; Rimoldi, D.; Schroter, M.; Romero, P.; Schereier, M.; French, L.E.; Scheneider, P.; Bornand, T.; Fontana, A.; Lienard, D.; Cerottini, J.; Tschopp, J. - Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. **Science**, 274:1363-66, 1996.

HAMADA, K.; Takahashi, I.; Matsuoka, M.; Saika T.; Mizobuchi, N.; Yorimitsu, S.; Takimoto, H. - Apoptosis of peripheral leukocytes in patients with myelodysplastic syndromes. **Rinsho Ketsueki** 39(11):1079-84. (short communication), 1998.

HARRIS, N.L.; Jeffe, E.S.; Diebold, J.; Flandring, G.; Muller-Hermelink, H.K.; Vardiman, J. - The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. **Histopathologic**, 36:69-87, 2000.

HISHITA, T.; Tada-Oikawa, S.; Miura, Y.; Nishihara, T.; Tohyama, Y.; Yoshida, Y.; Uchiyama, T.; Nawanishi.; S. - Caspase-3 activation by lisossomal enzymes in cytocrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. **Cancer Research**, 61:2878-84, 2001.

HOFFMANN, W.K.; Kalina, U.; Koschmieder, S.; Seipelt, G.; Hoelzer, D.; Ottmann, O.G. Defective Megacaryocytic Development in myelodysplastic syndromes **Leukemia**, 38(1-2):13-19, 2000. Review

HORTA, M.F.M. - A indução da célula ao suicídio na luta contra o câncer, **Ciência Hoje**, 22: 12-14, 1999.

HORTA, M.F.M. & Young, JD. - Apoptose. Quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, 25:38-45, 1999.

IRVINE, A.E.; Magill, MK.; Somerville, L.E.; McMullin, MF. - Spontaneous intramedullary apoptosis is present in disorders other than myelodysplasia, **Experimental Hematology**, 26:435-39, 1998.

ITO, S.; Ishida, Yoji.; Murai, K.; Luriya, S. – Flow cytometric analysis of aberrant antigen expression of blasts using CD45 blast gating for minimal residual disease in acute leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome, **Leukemia Research**, 25:205-11, 2001.

KIENER, P.A.; Davis, P.M.; Starling, G.C.; Mehlin, C.; Klebanoff, S.J.; Ledbetter, J.A.; Liles, W.C. - Differential induction of apoptosis by Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages, **Journal of Experimental Medicine**, 185:1511-16, 1997.

KITAGAWA, M.; Yamaguchi, S.; Takahashi, M.; Tanizawa, T.; Hirokawa, K.; Kamiyama, R. – Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. **Leukemia**, 12:486-92, 1998.

КОЈI, N.; Tsunefumi, S.; Mine, H.; Shin-ichi, M.; Katsuto, T.; Toshiro, M.; Takashi, O., Hisashi, G.; Yoshiyuki, N. - Functional Expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells. **Blood**, 86: 883-89, 1995.

KOUIDES, P.A. & Bennett, J.M. - Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. **Seminars in Hematology**, 33(2):95-110, 1996.

KRAMMER, H.P.; Dhein, J.; Walczak, H.; Behrmann, I.; Mariani, S.; Matiba, B.; Fath, M.; Daniel, P.T.; Knipping, E.; Westendorp, M.O.; Kirstin, S.; Baumler, C.; Hellbardt, S.; Germer, M.; Peter, ME.; Debatin, K.M. – The role of Apo-1 mediated apoptosis in the immune system, **Immunological Reviews**, 142: 175-91, 1994

KRATZKE, R.A. - Fas-ligand expression in bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anaemia and predicts survival. **Leukemia**, 13: 44-53, 1999.

LILES, W.C.; Kiener, P.A.; Ledbetter, J.Á.; Aruffo, A.; Klebanoff, S.J. – Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils, **Journal of Experimental Medicine**, 184:429-40, 1996.

LIST, A.F.; Heaton, R.; Glisman-Gibson, B.; Capizzi, R. – Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity. **Seminars in Oncology**, 23(4):58-63, 1996.

LIST, A.F.; Brasfield, F.; Heaton, R.; Glisman-Gibson, B.; Crook, L.; Taetle, R. & Capizzi, R.L. - Stimulation of hematopoiesis by amifostine in patients with myelodysplastic syndrome. **Blood**, 90: 3364-69, 1997.

LIST, A.F.; Heaton, R.; Glisman-Gibson, B.; Capizzi, R.L. – Amifostine stimulates formation of multipotent and erytroid marrow progenitors. **Leukemia**, 12: 1596-1602, 1998.

MAGALHÃES, S.M.M.; Filho, F.D.R.; Ponte, L.P. – Síndromes mielodisplásicas. **Clínica Médica**, 4(3):17-21, 1999.

MAGALHÃES, S.M.M. - Nódulos linfóides medulares em pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas: Incidência, caracterização morfológica, imunohistoquímica e associação com critérios clínico - laboratoriais, progressão da doença e sobrevida, 2001. (Dissertação - doutorado - Universidade Estadual de Campinas).

MERCHANT, S.H.; Gonchoroff, N.J.; Hutchison, R.E. – Apoptotic index by annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Cytometry**, 46:28:32, 2001.

MILLER, L.J. & Marx, J. - Apoptosis. **Science**, 281: 301, 1998.

MOLICA, S.; Mannella, A; Datillo, A; Levato, D.; Iuliano, F.; Peta, A.; Consarino, C. & Magro, S. – Differential expression of Bcl-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemia bone marrow cells. A flow cytometric analysis. **Haematologica**. 81(4):302-09, 1996.

MORONI, M.; Porta, C.; Invernizzi, R; Inzoli, A.; Bobbio-Pallavicini, F.; Bobbio-Pallavicini, E. - “ TUNEL” evidence of reduced bone marrow cells apoptosis in refractory anaemia patient treated with amifostine. **British Journal of Haematology**, 104:420-26, 1999.

MUNDLE, S.D.; Shetty, V.T.; Raza, A.- Caspases and apoptosis in myelodysplastic syndromes. **Experimental Hematology**, 28:1310-14, 2000.

MUNKER, R.; Midis, G.; Owen-Schaub, L. & Andreff, M. - Soluble Fas (CD95) is not elevated in the serum of patients with myeloid leukemias, myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, 10:1531-33, 1996.

NAGAFUJI, K.; Shibuya, T.; Harada, M.; Mizuno, S.; Takenaka, K.; Miyamoto, T.; Okamura, T.; Gondo, H.; Niho, Y. – Functional expression of Fas antigen (CD95) on hematopoietic progenitor cells, **Blood**, 86:883-89, 1995.

NAGATA, S. & Golstein, P. - The Fas death factor, **Science**, 267:1449-56, 1995.

NAGATA, S. - Apoptosis by death factor, **Cell**, 88:355-65, 1997

O'CONNELL, J.; O' Sullivan, GC.; Collins, J.; Shanahan, F. – The Fas counterattack: Fas mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. **Journal of Experimental Medicine**, 184:1075-82, 1996.

ORMEROD, M.G. - The study of apoptotic cells by flow cytometry. **Leukemia**, 12: 1013-25, 1998.

PARKER, J.E.; Fishlock, K.L.; Mijovic, A.; Pagliuca, A. & Mufti, G.J. - Leukemic progression in myelodysplastic syndromes (MDS) is associated with decreased apoptosis and reduced ratio of pro versus anti- apoptotic Bcl-2 related proteins. **Blood**, 90: 520a, 1997.

PARKER, J.E.; Fishlock, K.L.; Mijovic, A.; Czepulkowski, B.; Pagliuca, A.; Mufti, G.J. - “Low Risk” myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ration of pro-versus anti-apoptotic bcl-2 related proteins. **British Journal Haematology**, 103(4):1075-82, 1998.

PARKER, J.E.; Mufti, G.J.; Rassol, F.; Mijovic, A.; Devereux, S.; Pagliuca, A. - The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. **Blood**, 96(12): 3932-38, 2000.

PETER, M.E. & Krammer P.H. – Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis.
Current Opinion in Immunology, 10: 545-51, 1998.

PETERS, R.; Leyvraz, S.; Perey, L. – Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. **Blood**, 92:2041-52, 1998.

RAJAPAKSA, R.; Ginzton, N.; Rott, L.S.; Greenberg, P.L. – Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. **Blood**, 88:4275-87, 1996.

RAZA, A.; Mundle, S.; Shetty, V.; Alvi, S.; Chopra, H.; Span, L.; Parcharidou, A.; Dar, S.; Venugopal, P.; Borok, R.; Gezer, S.; Showel, J.; Loew, J.; Robin, E.; Rifkin, S.; Alston, D.; Hernandez, B.; Shar, R.; Kaizer, H.; Gregory, S. – Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. **Int J Hematol**, 63:265-78, 1996.

RIBEIRO, E.; Lima, C.S.P.; Lorand-Metze, I. – Relation between apoptosis and prognostic factors in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, 25, Suppl. 01, P115, 2001.

RIBIZZI, I.; Darnowski, W.; Goulett, F.A. - Amifostine cytotoxicity and reduction of apoptosis in a human myelodysplastic cell line. **Leukemia Research**, 24: 519-25, 2000.

RAMZI, S.C.; Vinay, K.; Tucker C. – Robbins – Pathologic basis of disease. 6 ed. 1999

ROMANO, M.F.; Lamberti, A.; Bisogni, R.; Garbi, C.; Pagnano, A.M.; Auletta, P.; Tassone, P.; Turco, MC.; Venuta, S. – Amifostine inhibits hematopoietic progenitor cell apoptosis by activating NF-κ B/Rel transcription factors. **Blood**, (94): 4060-66, 1999.

ROONEY, DE. & Czepulkowsky, BH. - **Human cytogenetics. A practical approach**, New York, Oxford University Press. 2:1-293, 1992.

SACHS, L. & Lotem, J. - Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. **Blood**, 7:63-73, 1993.

SANTINI,V. & Giles, J.F. - The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. **Haematologica**, 84 (11): 1035 - 42, 1999.

SCHMITT-GRAEFF, A.; Mattern, D.; Kohler, H.; Hezel, J.; Lubbert, M. – Myelodysplastic syndromes (MDS). Aspects of hematopathologic diagnosis. **Pathologe**, 21(1):1-15, 2000.

SCHUCHTER, L.M. & Glick, J.H. – The current status of WR-2721 (Amifostine): A chemoterapy and radiation therapy protector. **Biologic Therapy Cancer** (3): 1-10, 1993.

SCHUCHTER, L.M. – Guidelines for the Administration of Amifostine. **Seminars in Oncology**, 23: 40-43, 1996.

SHETY, V.; Mundle, S.; Alvi, S.; Showel, M.; Broady-Robinson, L.; Dar, S.; Borok, R.; Showel, J.; Gregory, S.; Rifkin, S.; Gezer, S.; Parcharidou, A.; Venugopal, P.; Shah, R.; Hernandez, B.; klein, M.; Alston, D.; Robin, E.; Dominquez, C.; Raza, A. - Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**, 20 (11/12):891-900, 1996.

SHIBUYA, T.; Takenaka, K.; Thompson, C.B. - Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, **Science**, 267: 1456-62, 1995.

SHIMAZAKI,K.; Ohshima, K.; Suzumiya, J.; Kawasaki, C.; Kikushi, M. – Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes. **British Journal Haematology**, 110(3):584-90, 2000.

SMITH, C.A.; Farrah, T.; Goodwin, G. – The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation, and death. **Cell**, 76:959, 1994.

STALDER, T.; Hahn, S.; Erb, P. - Fas antigen Is the major Target Molecule for CD4⁺ T Cell-Mediated Cytotoxicity. **The American Association of Immunologist**, 1127-33, 1994.

- SUDA, T.; Takahashi, T.; Golstein, P.; Nagata, S. – Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**, 75: 1169, 1993.
- SUDA, T & Nagata, S. – Purification and characterization of the Fas ligand that induces apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, 179:873-79, 1994.
- SUDA, T.; Okazaki, T.; Naito, Y.; Yokota, T.; Arai, N.; Ozaki, S.; Nakao, K.; Nagata, S. – Expression of the Fas ligand in cells of the T cell lineage. **J Immunol**, 154: 3806, 1995.
- SWANSBURY, G.J. – Cytogenetic techniques for human leukemias, **Methods in Molecular Biology**, Totowa, NJ, Human Press Inc. 323-39, 1997
- TABAK, D.G. - Mielodisplasias: Opções Terapêuticas. **Ser. Monogr.Esc. Bras. Hematol.** 7:63-82, 2000.
- TAKENAKA, K.; Nagafuji, K.; Harada, M.; Mizuno, SI.; Miyamoto, T.; Makino, S.; Gondo, H.; Okamura, T.; Niho, Y. – In vitro expansion of hematopoietic progenitor cells induces functional expression of Fas antigen (CD95). **Blood**, 88:2871-77, 1996.
- THORNBERRY, N.A. & Lazebnik, Y. - Caspases: Enemies within. **Science**, 281: 1312-16, 1998.
- TSOPOLOU, P.; Kouraklis-Symeonidis, A.; Thanopoulou, E.; Zikos, P.; Orphanos, V.; Zoumbos, N.C. – Apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes: differential involvement of marrow cells in “good” versus “poor” prognosis patients and correlation with apoptosis-related genes. **Leukemia**, 13: 1554-63, 1999.
- VAN DER VIJGH., W.J.F. & Korst, A.E.C. – Amifostine (Ethyol): Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects *In Vivo*. **European Journal of Cancer**. 32A, Suppl 4: 26-30, 1996.
- VIGNAUX, F.; Vivier, E.; Malissen, B.; Depraetere, V.; Nagata, S.; Golstein, P. – TCR/CD3 coupling to Fas-based, cytotoxicity, **Journal of Experimental Medicine**, 181:781-86, 1995.

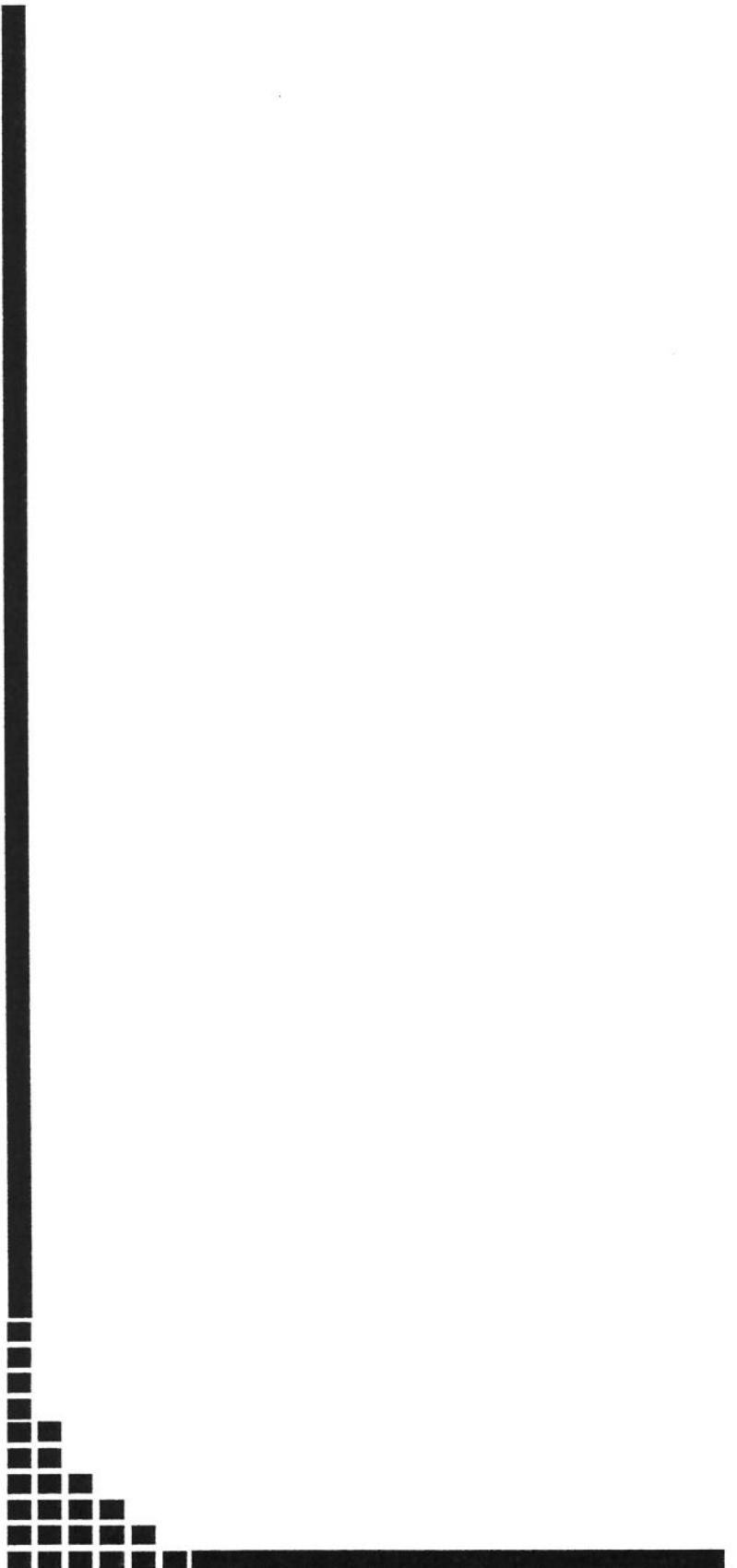
WASSERMAN, T.H.; Theodore, L.P.; Glenda, R.; Lawrence, JK. – Differential protection against cytotoxic chemotherapeutic effects on bone marrow CFUs by WR-2721. **Cancer Clin. Trials** 4: 3-6, 1981.

WATANEBE-FUKUNAGA, R.; Brannan, C.I.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Nagata,S. – Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis, **Nature**, 356:314, 1992.

WIEDER, T.; essman, F.; Prokop, A.; Schmelz, K.; Schulze-Osthoff, K.; Beyaert, R.; Dorken, B.; Daniel, P.T. – Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor- ligand interaction and occurs downstream of caspase -3. **Blood**, 97(5):1378:87, 2001.

YOSHIDA, Y. - Hypothesis: Apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myeloplastic syndrome. **Leukemia**, 7: 144-146, 1993

YOSHIDA, Y. & Mufti, G.J. - Apoptosis and its significance in MDS: controversies revisited. **Leukemia Research**, 23: 777-85, 1999.



ANEXOS

(FICHA 1) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD Instit.: UNICAMP Caso: 01 Amifostina

Paciente: J. H

SMD-AR

SC:1,7 m²

| Ciclo | Data InicioTerapia | Hb G/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutr. x10 ⁶ | Plaq Hms | Transfusões no período Plaq | % bl | Mielograma % Siderobl. | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|----------------|--------------------|---------|--|-------------------------|----------|----------------------------------|-------------------|------------------------|---------------------|--------------------|---|
| PRÉ 1 | 21/06/99 | 6,6 | 2,2 | 31,8%(0,7) | 24,0 | 02/07/99: 2 UCH | 5% Diluído em SP | 0 | Material inadequado | 25 CFU – GM/ml | CD34: número absoluto: 2936 eventos (4,89%) |
| | 08/07/99 | 9,0 | 2,2 | 27,3%(0,6) | 26,0 | | | | | | |
| 20/07/99 – ICH | | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | 26/07/99 | 7,4 | 2,0 | 30,0%(0,6) | 22,0 | 30/07/99: 1 CH 10/08/99: 3 CH | 20% Diluído em SP | 0 | Material inadequado | Não Realizado (NR) | CD34: número absoluto: 7084 eventos (11,81%) |
| | 13/08/99 | 8,3 | 1,5 | 33,3%(0,5) | 20,0 | | | | | | |
| 24/08/99 2 CH | | | | | | | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X) Paciente veio a óbito com LMA secundaria a SMD-AR

(FICHA 2) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 02 Amifostina

Paciente: O B. F.

SMD-AR

SC: 1,7 m²

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período Plaq | Mielograma % bl | % Siderobi Plaq | Cariótipo | CFU | Imunofenotípagem |
|----------------|---------------------|---------|--|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------------|---|---|---|
| PRÉ 1 | 02/08/99 | 9,7 | 4,7 32,9%(1,5) | 355,0 | 20/08/99 : 1 CH | 2,5% | 0% | (14 Metáfases) 46,XX | 19/04/99 1,0 x10 ³ (sem estímulo) | CFU-GM/ml 1,3 x 10 ³ (com estímulo) | CD34: número absoluto 433 eventos (0,72%) |
| PÓS | 20/08/99 | 5,6 | 2,7 33,0%(0,9) | 328,0 | | | | | | | |
| 30/08/99 :1 CH | | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | 08/09/99 | 6,6 | 3,6 33,4%(1,2) | 401,0 | 10/09/99 : 1 CH 13/09/99 : 1 CH | 1,0% | material inadequado | Material inadequado | NR | CD34: número absoluto 736 eventos (1,23%) | |
| PÓS | 27/09/99 | 6,8 | 4,8 34,5%(1,7) | 408,0 | 01/10/99: 2 CH | | | | | | |

Conduta: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 3) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 03 Amifostina

Paciente: M. S.

SMD-ARSA

SC: 1,44 m²

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB $\times 10^6$ (% e mm ³) | Neutrófilos $\times 10^6$ | Plaq | Transfusões no período | Mielograma | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|----------|---------------------|------------|---|------------------------------|-------|----------------------------------|-----------------|-----------|-------------------|---|
| | | | | | | Hem | % bl % Siderobl | | | |
| PRÉ 1 | 20/08/99 | 8,9 | 4,7 | 43,0%(2,02) | 164,0 | 24/08/99 : 1CH 26/08/99 : 1CH | 3,0% | 66,0% | 10/08/99 46,XX | CFU-GM/ ml 3,2 x 10 ³ (com estimulo) 2,1x 10 ³ (sem estimulo) |
| PÓS | 08/09/99 | 8,3 | 3,6 | 44,0%(1,58) | 139,0 | 16/09/99 : 1CH 17/09/99 : 1CH | | | | CD34: número absoluto 335 eventos (0,59%) |

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB $\times 10^6$ (% e mm ³) | Neutrófilos $\times 10^6$ | Plaq | Transfusões no período | Mielograma | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|----------|---------------------|------------|---|------------------------------|-------|----------------------------------|-----------------|-----------|-------------------|--|
| | | | | | | Hem | % bl % Siderobl | | | |
| PRÉ 2 | 22/09/99 | 10,7 | 3,1 | 36,0%(1,11) | 167,0 | 07/10/99: 1 CH 08/10/99: 1 CH | 3,0% | 54,0% | 25/10/99 46,XX | CD34: número absoluto 401 eventos (0,67%) |
| PÓS | 11/10/99 | 10,5 | 4,1 | 29,0%(1,16) | 163,0 | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratamento(X):

(FICHA 4) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 04 Amifostina

Paciente: I. D. C.

SMD-AR

SC: 1,9 m²

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ³ | Neutrófilos (% e mm ³) | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Hem Plaq | Mielograma % bl | % Siderobl. | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|-------|---------------------|---------|---------------------|------------------------------------|-----------------------|--|----------|---------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| PRÉ 1 | 10/01/00 | 6,9 | 5,9 | 45,7% (2,7) | 100,0 | 14/01/00: 2 CH 17/01/00: 1 CH 26/01/00: 2 CH | 0% | material inadequado | 18/03/97 46,XX | 27 CFU-GM/ml | CD34: n° abs 246 ev. (2,46%) | CD95/34: 207 ev. (84,1%) |
| PÓS | 28/01/00 | 6,4 | 3,4 | 40,0% (1,36) | 77,0 | | | | | | CD95-L/34: NR | |
| | | | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | 14/02/00 | 7,5 | 4,2 | 33,3% (1,4) | 76,0 | 02/02: 2 CH 14/02: 2 CH 28/02: 1 CH | 0% | 0 | Material inadequado | 22 CFU-GM/ml | CD34: n° abs 226 ev. (0,75%) | CD95/34: 172 ev. (76%) |
| PÓS | 02/03/00 | 7,9 | 2,8 | 35,7% (1,0) | 47,0 | | | | | Ausência de auto- proliferação | CD95-L/34: 38 ev. (16%) | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 5A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 05 Amifostina

Paciente: M. A.C. N.

SC: 1,7 m²

SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período | Mielograma % bl | Cariótipo % Siderobl. | CFU* | Imunofenoti pagem |
|-------|---------------------|---------|--|------------------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------------|-------|----------------------------|
| PRÉ 1 | 10/01/00 | 8,0 | 4,6 | 58,2% (2,7) | 164,0 | 14/01: 2 CH | 2% | 40% | 46,XX | CD34: n° abs 100 ev.(1,0%) |
| PÓS | 28/01/00 | 6,7 | 4,2 | 50% (2,1) | 124,0 | 28/01: 2 CH | | | | 95/34: 58 ev (58%) |

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período | Mielograma % bl | Cariótipo % Siderobl. | CFU* | Imunofenoti pagem |
|-------|---------------------|---------|--|------------------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------------|-------|-----------------------------|
| PRÉ 2 | 14/02/00 | 9,0 | 4,0 | 55,0% (2,2) | 388,0 | Sem Transfusão | 0% | 1% em anel | 46,XX | CD34: n° abs 145 ev.(0,48%) |
| PÓS | 02/03/00 | 8,6 | 12,0 | 85,8% (10,3) | 118,0 | | | | | 95/34: 81 ev. (56%) |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 5B) FICHA RESPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 05 Amifostina

Paciente: M. A. C. N.

SC: 1,7 m²

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl | Cariótipo % Siderobi | CFU* | Imunofenotípagem |
|----------|---------------------|---------|--|------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|------------|--|
| PRÉ 3 | 03/04/00 | 9,6 | 5,0 | 70,0% (3,5) | 209,0 | Sem Transfusão Hem Plaquetas | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| | 20/04/00 | 10,1 | 9,9 | 8,8% (8,8) | 183,0 | | | | | |
| PRÉ 4 | 08/05/00 | 10,8 | 3,4 | 67,6% (2,3) | 159,0 | Sem Transfusão Hem Plaquetas | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| | 26/05/00 | 11,3 | 6,8 | 57,3% (3,89) | 245,0 | | | | | |
| PRÉ 5 | 12/06/00 | 12,4 | 4,3 | 55,8% (2,39) | 233,0 | Sem Transfusão Hem Plaquetas | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| | 30/06/00 | 12,0 | 6,7 | 59,7% (3,99) | 67,0 | | | | | |
| PRÉ 6 | 17/07/00 | 13,7 | 4,5 | 53,3% (2,4) | 168,0 | Sem Transfusão Hem Plaquetas | 2% | 46,XX | NR | CD34: n° abs 40 ev. (13%) 95/34: 16 ev. (40%) 95-L/34: 2 ev. (6,9%) |
| | 04/08/00 | 13,4 | 7,0 | 62,8% (4,4) | 180,0 | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 6A) FICHA REPOSTA TERAPEUTICA COM AMIFOSTINA – SMD Instit.: UNICAMP Caso: 06 Amifostina

Paciente: J. F. SMD-AR SC: 1,75 m²

| Ciclo | Data InícioTerapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | Neutrófilos (% e mm ³) | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma %bl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|-------|--|--------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------|-----------|-------|---|
| | | | | | Hem Plaq | | % Siderobl. | | | |
| PRÉ 1 | Sem hemograma do dia 26/06/00 (28/06/00) | 12,5 11,9 | 2,3 5,7 | 56,52% (1,3) 75,43% (4,3) | 25,0 26,0 | | | | | CD34: : n ⁰ abs 380 ev. (1,27%) 95/34:167 ev. (44,0%) 95-L/34:56 ev. (17%) |
| PÓS | A 14/07/00 | | | | | Sem Transfusão | 3,5% | 0% | 46,XY | NR |

| | | | | | | | | | | |
|--------|------------|------|-----|-------------|------|----------------|------|----|----|---|
| Anexos | 31/07/00 | 11,9 | 2,8 | 60,7% (1,7) | 29,0 | Sem Transfusão | 4,5% | 0% | NR | CD34: : n ⁰ abs 74 ev. (0,25%) 95/34:51 ev. (69,0%) 95-L/34:18 ev. (35,0%) |
| PRÉ 2 | A 17/08/00 | 10,8 | 9,6 | 85,7% (8,2) | 18,0 | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 6B) FICHA RESPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 6 Amifostina

| Paciente: J. F. | | | | | | | SMD-AR | | SC: 1,75 m ² | | | |
|-----------------|---------------------------|--------------|--|------------------------------|-----------------------|------------------------|------------|-----------------|-------------------------|------------|--|---|
| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Hem | Mielograma % bl | Siderobl. | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
| PRÉ 3 | 04/09/00 A 22/09/00 | 13,1 10,8 | 3,5 4,6 | 53,28%(1,9) 72,9%(3,4) | 38,0 20,0 | Sem Transfusão | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu | NR | Não colheu |
| PRÉ 4 | 09/10/00 A 27/10/00 | 12,2 11,4 | 2,5 5,28 | 32,0%(0,8) 73,6%(3,89) | 25,0 19,0 | Sem Transfusão | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu | NR | Não colheu |
| PRÉ 5 | 13/11/00 A 01/12/00 | 12,2 11,3 | 2,6 5,7 | 53,8%(1,51) 76,7%(4,36) | 15,0 26,0 | Sem Transfusão | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu | NR | Não colheu |
| PRÉ 6 | 04/11/00 A 21/12/00 | 12,2 10,4 | 5,32 7,3 | 76,7(4,08) 82,8%(6,07) | 30,0 29,0 | Sem Transfusão | 2,0 | 0 | NR | NR | 177 ev.(0,59%) 95/34: n ⁰ abs 101 ev. (57,06%) 95-L/34: n ⁰ abs 26 ev.(23,8%) | CD34: n ⁰ abs 95/34: n ⁰ abs 101 ev. (57,06%) 95-L/34: n ⁰ abs 26 ev.(23,8%) |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 7) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 7 Amifostina

Paciente: L. F.
SMD-AR **SC:** 1,86 **m²**

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb G/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl % Siderobi | Cariotipo | CFU | Imunofenotípagem |
|---|---------------------|---------|--|------------------------------|-----------------------|--|----------------------------|-----------|-----|---|
| PRÉ 1 | 14/08/00 A | 8,2 | 2,4 | 37,6% (0,9) | 16,0 | 16/08: 2 CHFL Aférese | | | | CD34: n° abs 68 ev. (0,23%) 95/34:59 ev. |
| PÓS | 01/09/00 | 8, | 2,2 | 24,3% (0,5) | 4,0 | 23/08:1 CHFL 25/08: 1 CHFL 01/09: 1 CHFL | 0 | 0 | NR | 95-L/34:35 ev. (86,76%) 95-L/34:35 ev. (70,0%) |
| 6/09: 1 CHLF 08/09: 2 CHLF 09/09: 2 CHLF / Aférese | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | 18/09/00 A | 9,0 | 1,6 | 24,9%(0,4) | 3,0 | 20/09: 2 CHLF 24/09: 1 CHLF 25/09: 1 CHLF Aférese | | | | CD34: n° abs 57 ev.(0,19%) 95/34:21 ev. (36,84%) |
| PÓS | 05/10/00 | 9,27 | 1,43 | -- | 23,09 | 29/09: 1 CHLF 01/10: 2 CHLF Aférese | 0 | 0 | NR | 95-L/34:45ev. (75,0%) |

Condução: Continua Amifostina () Muda de Tratamento: (X)

(FICHA 8A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 8 Amifostina

Paciente: E. M. L. P.

SMD-ARSA

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb G/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período Plaq | % bl | Mielograma Siderobl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|---------------------------|---------------------|---------|--|------------------------------|----------|-----------------------------|------|---------------------|-----------|-----|---|
| PRÉ 1 | 28/08/00 A | 10,1 | 4,5 | 32,3% (1,5) | 4,0 | | | | | | CD34: n°abs 437 ev. (1,46%) |
| PÓS | 15/09/00 | 8,8 | 2,2 | 42,0% (2,1) | 2,0 | Sem Transfusão | 2% | 20% | 45,XX,-7 | NR | 95/34: 293 ev. (67,0%) 95-L/34: 155ev. (34,0%) |
| 22/09: (1 Aférese) | | | | | | | | | | | |

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb G/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | Neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período Plaq | % bl | Mielograma Siderobl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|---|---------------------|---------|--|------------------------------|----------|-----------------------------|------|---------------------|-----------|-----|---|
| PRÉ 2 | 02/10/00 A | 11,2 | 3,7 | 34,6% (1,3) | 4,0 | Sem Transfusão | 2% | material inadequado | 45,XX,-7 | NR | CD34: n°abs 482 ev. (1,61%) |
| PÓS | 19/10/00 | 11,5 | 6,8 | 61,2% (4,2) | 3,0 | | | | | | 95/34: 261ev. (54,15%) 95-L/34: 70ev. (16,99%) |
| Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: () | | | | | | | | | | | |

Anexos

133

(FICHA 8B) FICHA RESPOSTA TERAPEUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 8 Amifostina

Paciente: E M L P SMD-AR SC: 1,75 m²

OBS: 12/01: 2 UCHFFI 15/01: 1 UCHFFI 05/01: Inicio Neumega (IL-11) 16/01:1 UCHFFI

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb | GB | Neutrófilos G/dl x10 ⁶ (% e mm ³) | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período Hem Plaquetas | Mielograma % bl %Siderobl. | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|--------------|---------------------------|--------------|--------------|---|--------------------------|---|-------------------------------|------------|------------|------------------|
| PRÉ 3 PÓS | 13/11/00 A 01/12/00 | 11,0 11,5 | 4,03 7,35 | 37,1%(1,5) 57,4%(4,22) | 2,0 4,0 | Sem Transfusão | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 4 PÓS | 18/12/00 A 05/01/01 | 9,4 8,3 | 4,49 3,81 | 50,6%(2,27) 32,7%(1,25) | 5,0 4,0 | 18/12:1 Aférese 7U 26/12:1 Aférese 7U 27/12:1 Aférese 2U 1 UCH | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 PÓS | 22/01/01 A 23/02/01 | 8,0 11,3 | 3,08 3,85 | 43,5%(1,34) 46,7%(1,8) | 31,0 13,0 | 23/02: 1 Aférese | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 6 PÓS | 12/03/01 A 29/03/01 | 10,1 10,0 | 4,93 9,26 | 44,3%(2,18) 47,2%(4,37) | 3,0 5,0 | Sem Transfusão | 3 | 0 | 45,XX,-7 | NR |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

CD34: n⁰ abs
407ev.(1,36%)
95L34: 293ev.
(71,99%)
95L34: 126ev.
(32,06%)

Paciente: R G A SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb G/dl | GB $\times 10^6$ | neutrófilos (% e mm ³) | Plaq $\times 10^6$ | Transfusões no período | Mielograma | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|----------|---------------------|------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|------------|-----|------------------------------------|
| | | | | | | Hem | % bl Plaq | % Sidderob | | CD34: |
| PRÉ 1 | 15/01/01 A | 6,7 | 0,59 | 32,7%(0,19) | 88,0 | 17/01: 1 UCHFI | | | | 335 ev (nºabs) (1,12%) |
| PÓS | 02/02/01 | 9,0 | 1,77 | 50,3%(0,89) | 125,0 | 4,0 | 0 | 46,XY | NR | 95/34: 146 ev (43,58%) |
| | | | | | | | | | | 95-L/34: 32 ev (9,22%) |
| PRÉ 2 | 19/02/01 A | 6,2 | 0,76 | 41,8%(0,32) | 93,0 | 19/02: 1UCH 21/02: 2 UCH | | | | CD34: 261 ev (nºabs) (0,87%) |
| PÓS | 12/03/01 | 8,6 | 4,0 | 77,4%(3,1) | 136,0 | 1,0 | 0 | NR | NR | 95/34: 186 ev (71,26%) |
| | | | | | | | | | | 95-L/34: 85 ev (26,65%) |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 9B) FICHA RESPOSTA TERAPEUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.:UNICAMP Caso: 9 da Amifostina

Paciente: R G A. SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % e mm ³ | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|-------|---------------------|---------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|------------|------------|---------------------------|
| | | | | | Hem Plaquetas | | % Siderob. | | | |
| PRÉ 3 | 26/03/01 | 7,0 | 0,91 | 38,5%(0,35) | 100,0 | 26/03: 1 CHFI | | | | |
| PÓS | 11/04/01 | 7,8 | 3,45 | 76,5%(2,64) | 131,0 | | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 4 | 02/05/01 | 8,0 | 1,33 | 37,8%(0,5) | 139,0 | 04/05: 2 UCHFI | | | | |
| PÓS | 18/05/01 | 9,9 | 3,05 | 50,49%(1,54) | 135,0 | | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 | 04/06/01 | 8,0 | 1,13 | 38,7(0,44%) | 139,0 | 06/06: 1UCH | | | | |
| PÓS | 22/06/01 | 8,3 | 1,88 | 0,96(51,06%) | 134,0 | | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 6 | 10/07/01 | 7,1 | 1,3 | 0,4(30,76%) | 134,0 | 11/07: 1 UCH | 3 | - | NR | CD34; |
| PÓS | 27/07/01 | 9,0 | 3,02 | 1,54(51,1%) | 156,0 | | | | NR | 238 ev (nºabs) (0,79%) |
| | | | | | | | | | | 95/34: 76 ev (39,58%) |
| | | | | | | | | | | 95-L/34: 41 ev (17,2%) |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 10A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 10 Amifostina

Paciente: C.O.D. SMD-ARSA SC: 1,77 m² obs: transfusão fevereiro: 1UCH - Uberaba e 19/02: 2UCH – Hemo-Unicamp

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb G/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl | Siderobl % | Cariotipo | CFU | Imunofenoti pagem |
|-------|---------------------|---------|---------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|-------------|-----------|---------------------------------|--------------------------------------|
| PRÉ 1 | 16/04/01 A | 8,7 | 14,3 | -- | 271,0 | 17/04: 1 UCH/F 20/04: 1 CHF | 0% | 26% em anel | 46,XX | 8,9 x 10 ³ CFU-GM/ml | CD34: 49 ev.(nº absoluto) (0,16%) |
| PÓS | 04/05/01 | 9,9 | 13,67 | 52% (7,1) | 170,0 | | | | | | 95/34: 22 ev. (44,90%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 10 ev. (16,67%) |
| PRÉ 2 | 21/05/01 A | 8,3 | 9,22 | 56% (5,16) | 220,0 | 21/05: 1UCH | 0 | 35% | 46,XX | NR | CD34: 47 ev (0,16%) |
| PÓS | 04/06/01 hemograma | 10,2 | 14,02 | 56% (7,85) | 297,0 | | | | | | 95/34: 22 ev (51,2%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 19 ev (40,4%) |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 10B) FICHA RESPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD Instit.:UNICAMP e FMTM
 Caso: 10 da Amifostina

Paciente: C.O.D. SMD-ARSA SC: 1,77 m²

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | neutrófilos x10 ⁶ | Plaq % bl | Transfusões no período | Mielograma* | Cariótipo* | CFU* | Imunofenotipagem |
|-------|---------------------|---------|--|------------------------------|------------------------------|------------------------|-------------|------------|----------------------|------------------------|
| PRÉ 3 | 13/08/01 A | 7,7 | 2,3 58,0%(5,9) | 263,0 | 24/08: 300ml CHF | | | | | |
| PÓS | 31/08/01 | 10,8 | 4,6 6,6%(2,6) | 250,0 | | | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 4 | 18/09/01 A | - | - | - | Intervalo: 1/09: 2 CHF | | | | | |
| PÓS | 06/10/01 | - | - | - | 1/09: 2 CHF | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 | 23/10/01 A | 10,1 | 14,16 75,9%(9,4) | 236,0 | 01/10: 1 CHF | | | | | |
| PÓS | 10/11/01 | - | - | - | 11/10: 1 CHF | | | | | |
| | | | | | 19/10: 1 CHFI | | | | | |
| PRÉ 6 | 26/11/01 A | - | - | - | Intervalo: 12/10: 300 ml CHF | 0,5 | - | NR | CD34: 76 ev (0,25%) | |
| PÓS | 14/12/01 | 9,1 | 13,4 70,3%(9,4) | 245,0 | | | | | 95/34: 43 ev (57,0%) | 95-L/34: 135ev (69,0%) |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 11A) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 11 Amifostina

Paciente: M. Z SMD-AR**Peso: 77,5 Kg****Alt.: 1,69 cm**

| Ciclo | Data Início Terap | Hb G/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl | Siderobi Plaq | Cariótipo | CFU | Imunofenoti pagem |
|-------|-------------------|---------|---------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|---------------|-----------|-----|-----------------------------------|
| PRÉ 1 | 14/05/01 A | 8,8 | 2,1 | 38,09% (0,8) | 148,0 | 14/05: 1 UCHFI | 2,0 | 0 | 45,X,-Y | NR | CD34: 158 ev. (nº absoluto 0,53%) |
| PÓS | 01/06/01 | 8,8 | 3,62 | 46,8% (1,69) | 204,0 | | | | | | 95/34: 83 ev. (52,53%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 192 ev. (65,08%) |
| PRÉ 2 | 18/06/01 A | 6,9 | 1,75 | 35,3% (0,62) | 204,0 | 18/06: 1 CHFI 20/06: 1 CHFI | 0 | 0 | NR | NR | CD34: 137 ev (nº absoluto 0,46%) |
| PÓS | 05/07/01 | 8,2 | 3,5 | 45,7% (1,6) | 194,0 | | | | | | 95/34: 96 ev (50,5%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 26ev (19,0%) |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

FICHA 11B) FICHA RESPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.:UNICAMP Caso: 11 da Amifostina

Paciente: M Z SMD-AR Peso: 77,5 Kg Alt.: 1,69 cm

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl | GB $\times 10^6$ (% e mm^3) | Plaq $\times 10^6$ | Transfusões no período | Mielograma* % bl | Cariótipo* | CFU* | Imunofenoti pagem |
|-------|---------------------|---------|---------------------------------------|--------------------|--|--|---------------------|------------|--|
| PRÉ 3 | 23/07/01 A | 9,6 | 1,67 31,13%(0,52) | 164,0 | intervalo: 16/07/01 2 CHFI | 01/08: 1CHFI | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 10/08/01 | 8,3 | 2,76 42,5%(1,17) | 172,0 | intervalo: 17/08/01: 1CHFI | 27/08: 1 CHFI 31/08: 1 CHFI 12/09: 1 CHF | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 4 | 27/08/01 A | 7,0 | 1,64 22,8%(0,37) | 152,0 | 13/09: 2 CHF | 01/10: 1 CH 11/10: 1 CH | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 14/09/01 | 8,1 | 3,75 50,6%(1,9) | 183,0 | 19/10: 1 CHFI | 19/10: 1 CHFI | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 | 01/10/01 A | 7,7 | 1,69 0,49(29,1%) | 148,0 | 01/10: 1 CH 11/10: 1 CH | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 19/10/01 | 7,7 | 2,53 1,25(49,3%) | 132,0 | 19/10: 1 CHFI | | | | |
| PRÉ 6 | 05/11/01 A | 7,1 | 1,3 0,4(30,76%) | 134,0 | 05/11: 1 UCH 19/11: 1 CHFI 23/11: 1 CHFI | Material inadequado | Material inadequado | NR | CD34:404 ev (1,35%) 95/34: 74 ev (18,2%) 95-L/34: 33ev (13,0%) |
| PÓS | 23/11/01 | 7,4 | 1,71 0,53(30,7%) | 145,0 | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 12) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD **Instit.: UNICAMP Caso: 12 Amifostina**

Paciente: N. F **SMD-AR**

| Ciclo | Data InícioTerap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma % bl %Siderobl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|----------|------------------|------------|------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|-----|--|
| PRÉ 1 | 28/05/01 A | 9,9 | 2,7 | 33,0%(0,9) | 24,0 | 14/05: 1 UCHFI | 0 | 0 | NR | CD34: 16 ev.(nºabsoluto) (0,05%) 95/34: 16 ev. (89,0%) 95-L/34: 13 ev. (81,0%) |
| PÓS | 15/06/01 | 9,1 | 2,8 | 29,0%(0,8) | 30,0 | | | | | |
| PRÉ 2 | 13/07/01 A | 10,2 | 3,5 | 46,0%(1,6) | 8,0 | 18/07: 6 UCPI 25/07: 6UCPI | 2 | 0 | NR | CD34: 67 ev (nºabsoluto) (0,22%) 95/34: 58 ev (87,0%) 95-L/34: 63ev (83,0%) |
| PÓS | 03/08/01 | 8,0 | 2,6 | 35,0%(0,9) | 21,0 | 30/07: 2 UCHIF | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 13A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 13 Amifostina

Paciente: AVFVE SMD-AR

| Ciclo | Data InícioTerap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período Hem Plaq | % bl | Mielograma* %Siderobi | Cariótipo* | CFU* | Imunofenotipagem |
|-------|------------------|---------|---------------------|---------------|-----------------------|---------------------------------|------|-----------------------|------------|--------------|---------------------------------|
| PRÉ 1 | 10/07/01 A | 6,6 | 2,4 | 38,4%(0,9) | 123,0 | 11/07: 1 CH | 3,5 | 0 | NR | S2 CFU-GM/ml | CD34: 487ev.(nºabsoluto (1,62%) |
| PÓS | 27/07/01 | 9,3 | 4,0 | 43,2%(1,73) | 218,0 | 25/07: 1 UCF | | | | | 95/34: 172 ev. (35,0%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 139 ev. (30,0%) |
| PRÉ 2 | 13/08/01 A | 8,0 | 2,41 | 39,1%(0,94) | 148,0 | 17/08: 1CHFI | 2,0 | Diluído SP | 0 | NR | 64 CFU-GM/ml |
| PÓS | 31/08/01 | 7,0 | 3,28 | 40,4%(1,33) | 200,0 | 31/08: 2 CHF | | | | | 388 ev (nºabsoluto (1,29%) |
| | | | | | | | | | | | 95/34: 133 ev (33,0%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 85 ev (28,0%) |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 13B) FICHA RESPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso 13 da Amifostina

Paciente: A. V.F.V. E. SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terap | Hb g/dl | GB $\times 10^6$ (% e mm ³) | Plaq $\times 10^6$ | Transfusões no período | Mielograma % hb %Siderobl | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
|-------|-------------------|---------|---|--------------------|-------------------------------|---------------------------|------------|------------|---|
| PRÉ 3 | 17/09/01 A | 7,8 | 2,48 37,9%(0,94) | 142,0 | 04/09:1 CHF Intervalo: | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 05/10/01 | 5,7 | 3,19 38,5%(1,23) | 185,0 | 21/09: 1 UCH 5/10: 2 UCHF | | | | |
| PRÉ 4 | 22/10/01 A | 7,1 | 2,07 41,3%(0,86) | 146,0 | 26/10: 2 UCHF 09/11: 1 UCH | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 09/11/01 | 6,4 | 3,20 40,4%(1,29) | 204,0 | | | | | |
| PRÉ 5 | 26/11/01 A | 8,1 | 2,40 32,9%(0,79) | 146,0 | 21/11: 2 UCHF Intervalo: | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 14/12/01 | 9,5 | 3,08 47,4%(1,46) | 174,0 | 10/12: 1UCH | | | | |
| PRÉ 6 | 02/01/02 A | 7,0 | 2,28 34,3%(0,78) | 176,0 | 28/12:1 UCHF 11/01: 2 UCH | 1,0 Diluído SP | - | NR | CD34: 591 n ⁰ abs 1,97-% 95/34: 125 ev. 25,0% 95-L34: 546 ev. 66,0% |
| PÓS | 18/01/02 | 8,3 | 3,94 40,9%(1,61) | 200,0 | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 14A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 14 Amifostina

Paciente: B S F

SMD-ARSA

SC: 2,3

m²

| Ciclo | Data InicioTerap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | % bl | Mielograma %Siderobl | Cariótipo | CFU | Imunofenotípagem |
|-------|------------------|---------|---------------------|---------------|-----------------------|-----------------------------|------|-----------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------------------|
| PRÉ 1 | 10/07/01 A | 7,7 | 3,7 | 52,5%(1,9) | 194,0 | 25/07: 1 CHF | 3,0 | 78% | NR | 4,0X10 ² CFU-GM /ml | CD34: 136 ev.(nºabsoluto) (0,45%) |
| PÓS | 27/07/01 | 8,3 | 4,12 | 62,2%(2,56) | 197,0 | | | | | | 95/34: 89 ev. (64,5%) |
| | | | | | | | | | | | 95-L/34: 37 ev. (27,2%) |
| PRÉ 2 | 13/08/01 A | 7,0 | 3,16 | 46,3%(1,46) | 224,0 | 13/08: 1 UCHF 17/08:1CHF | 3,0 | 94%em diluído SP anel | NR | 51 ev (nºabsoluto) (0,17%) | CD34: |
| PÓS | 31/08/01 | 8,7 | 4,61 | 62,3%(2,87) | 202,0 | 30/08: 2 CHF | | | | 95/34: 37 ev (72,5%) | 95/34: 37 ev. |
| | | | | | | | | | | 95-L/34: 19ev (47,5%) | |

Conduta: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(14B) FICHA RESPOSTA TERAPEUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso 14 da Amifostina

Paciente: B. S. F.
SMD-ARSA

| Ciclo | Data Início Terap | Hb g/dl | GB $\times 10^6$ (% e mm ³) | neutrófilos $\times 10^6$ | Plaq Hem | Transfusões no período | Mielograma %bh% Siderobi | Cariótipo | CFU | Imunofenotí Pagem |
|--------------|---------------------------|------------|---|----------------------------|----------------|--|--------------------------|------------|------------|---|
| PRÉ 3 PÓS | 17/09/01 A 05/10/01 | 8,4 7,9 | 5,17 7,26 | 49,9%(2,43) 59,2%(4,3) | 313,0 321,0 | 03/10: 1 UCHF 05/10: 1 UCHF | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 4 PÓS | 22/10/01 A 09/11/01 | 7,0 8,2 | 4,73 8,6 | 47,4%(2,24) 72,4%(6,26) | 291,0 376,0 | 25/10: 2 UCHF 07/11: 1 CHF | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 PÓS | 26/11/01 A 14/12/01 | 7,5 8,4 | 5,65 5,86 | 45,8%(2,59) 60,8%(3,56) | 343,0 260,0 | 30/11: 1 CHF 07/12: 1 CHF 14/12: 1 CHF | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 6 PÓS | 02/01/02 A 18/01/02 | 7,1 8,2 | 4,76 13,39 | 31,35(1,49) 61,2%(8,2) | 284,0 337,0 | 04/01: 1 CHF | 1,0 | - | NR | CD34: 46 ev. (0,15%) 95/34: 21 ev.- (46,0%) 95-L/34: 49 ev.- (54,0%) |

Conduita: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: (X)

(FICHA 15A) FICHA REPOSTA TERAPÉUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso: 15 Amifostina

Paciente: O F

SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ (% e mm ³) | neutrófilos x10 ⁶ | Plaq Hem | Transfusões no período Plaq | % bl | Mielograma %Siderobi | Cariótipo | CFU | Imunofenotí pagem |
|-------|-------------------|---------|--|------------------------------|----------|--|------|----------------------|-----------|-----|---|
| PRÉ 1 | 10/07/01 A | 4,8 | 2,8 | 29,3%(0,8) | 50,0 | 10/07: 1 CH 11/07: 1 CH | 2,5 | 0 | 46,XY | NR | CD34: 505 ev.(nºabsoluto) (1,68%) 95/34: 258 ev. (55,01%) 95-L/34: 84 ev. (17,0%) |
| PÓS | 27/07/01 | 7,8 | 6,18 | 46,9%(2,9) | 58,0 | 12/07: 1 CHF 13/07: 1 CH 27/07: 2 CHF | | | | | |
| PRÉ 2 | 13/08/01 A | 6,8 | 3,15 | 22,8%(0,72) | 57,0 | 17/08: 1 CHF 29/08: 1 CHF 31/08: 1 CHF | 2,5 | 0 | 46,XY | NR | CD34: 121 ev (nºabsoluto) (0,4%) 95/34: 22 ev (18,0%) 95-L/34: 15ev (16,0%) |
| PÓS | 31/08/01 | 7,8 | 5,25 | 45,8%(2,4) | 44,0 | | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 15B) FICHA RESPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD

Instit.: UNICAMP Caso 15 da Amifostina

Paciente: O F. SMD-AR

| Ciclo | Data Início Terapia | Hb g/dl $\times 10^6$ | GB $\times 10^6$ (% e mm ³) | Neutrófilos $\times 10^6$ | Plaq Hem | Transfusões no período | Mielograma % bl% Siderobl. | Cariótipo | CFU | Imunofenotípagem |
|-------|---------------------|-----------------------|---|---------------------------|----------|------------------------|----------------------------|------------|------------|------------------|
| PRÉ 3 | 17/09/01 A | 9,2 | 4,38 | 34,9%(1,53) | 62,0 | 21/9; 1 UCHFL | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PÓS | 05/10/01 | 7,1 | 8,56 | 56,0%(4,8) | 65,0 | 5/10; 1 UCHFL | | | | |
| PRÉ 4 | 22/10/01 A | 8,7 | 5,26 | 26,1%(1,37) | 55,0 | 26/10; 1 UCHPLF | | | | |
| PÓS | 09/11/01 | 7,4 | 23,8 | 20,68(86,9) | 44,0 | 01/11; 1 CHFFL | Não colheu | Não colheu | Não colheu | Não colheu |
| PRÉ 5 | | | | | | | | | | |
| PÓS | | | | | | | | | | |
| PRÉ 6 | | | | | | | | | | |
| PÓS | | | | | | | | | | |

Conduz: Continua Amifostina () Muda de Tratam/o: ()

(FICHA 16) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD Instit.: UNICAMP Caso: 16 Amifostina

Paciente: M. M. A. SMD-ARSA SC: m²

| Ciclo | Data Início Terap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Mielograma | Cariótipo | CFU | Imunofenoti pagem |
|----------|------------------------|-------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|-----|---|
| PRÉ 1 | 15/10/01 A | 8,9 | 4,13 | 41,0% (1,69) | 255,0 | 17/10:1 CH Hem Plaq | 3,5% (em anel) % bl %Siderob | 46,XX | NR | CD34: 245 ev (nºabs) (0,82%) 95/34: 71 ev (29,0%) 95-L/34: 26 ev- 12,6% |
| PÓS | 01/11/01 | 7,9 | 5,51 | 69,5% (3,83) | 229,0 | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | (19/11/01) 21/11/01 | 7,3 10,0 | 4,3 4,9 | 40,9% (1,8) 37,6% (1,85) | 261,0 177,0 | 23/11: 1 CHF 27/11: 1 CHF 0 | 38% | NR | NR | CD34: 160 ev 0,53% 95/34: 67 ev- 41,9% 95-L/34: 75 ev- 51,7% |
| PÓS | 07/12/01 | | | | | | | | | |

Condução: Continua Amifostina () Muda de Tratamento: (X)

(FICHA 17) FICHA REPOSTA TERAPÊUTICA COM AMIFOSTINA – SMD Instit.: UNICAMP Caso: 17 Amifostina

| Paciente: L.F | | | | | | | | | | SMD-ARSA | SC: | m ² | |
|------------------------------|------------------|---------|---------------------|---------------|-----------------------|---|-----|------|------|----------------------|-----------|----------------|------------------------------------|
| Ciclo | Data InícioTerap | Hb g/dl | GB x10 ⁶ | neutrófilos % | Plaq x10 ⁶ | Transfusões no período | Hem | Plaq | % bl | Mielograma % Siderob | Cariótipo | CFU | Imunofenotipagem |
| PRÉ 1 | 08/10/01 A | 4,0 | 2,6 | 42,3% (1,10) | 321,0 | 08/10:2 CH 10/10:2 CH 15/10:2 CH 17/10:1 CH | | | 4,5% | 32% (em anel) | 46,XY | NR | CD34: 370 ev (nºabs) (1,23%) |
| | 26/10/01 | 6,7 | 3,23 | 56,5% (1,83) | 278,0 | 19/10: 2 CHFI 22/10:1 CHFI 24/10: 1 CHF 26/10:2 CHPLFI | | | | | | | 95/34: 200 ev (54,0%) |
| PÓS | | | | | | | | | | | | | 95-L/34: 111 ev- (26,4%) |
| | | | | | | | | | | | | | |
| Intervalo: 30/10: 1 UCHFI | | | | | | | | | | | | | |
| 06/11: 2 UCHF | | | | | | | | | | | | | |
| PRÉ 2 | 12/11/01 A | 6,7 | 1,93 | 29,4% (0,57) | 137,0 | 12/11: 1 CHF 14/11: 2 UCHF 23/11: 1 CHF | | | 7,0% | 18% (em anel) | NR | NR | CD34: 390 ev (1,30%) |
| | 30/11/01 | 7,6 | 4,17 | 53,2% (2,24) | 262,0 | 30/11: 1 CHF | | | | | | | 95/34: 222 ev- (57,0%) |
| 95-L/34: 58 ev- (21%) | | | | | | | | | | | | | |

Conduita: Continua Amifostina (X) Muda de Tratam/o: ()

FICHA DE INCLUSÃO DO PACIENTE NO ESTUDO

Instituição

Nome:

Data Nasc: Data de Diag.: Data de Início de Terapia:

Diagnóstico: SMD Classif. FAB: AR () ARSA () RAEB () RAEBt () LMMC ()

Fator Causal SMD: Primário () Secundário: Qt / Rt () Genotóxicos () NA ()

Fator de Risco (IPSS): Baixo Risco: () Int1: () Int 2: () Alto Risco () NA ()

Superfície Corporal: m²

Total de Hemácias (últimos 6 meses): Total de Plaquetas (últimos 6 meses):

Exames Laboratoriais antes do início da terapia:

Hemograma: Hb: g/dl GB: x 10⁹/L Plaq: x 10⁹/L Ht: %

Mielograma: Neutrófilos: % Bl: %

Biópsia MO: Hipocel () Normocel () Hipercel ()

% Blastos % sideroblastos em anel

Fibrose: () Ausente () Presente Alip: Ausente () Presente ()

Cariótipo: Não realizado () Normal () Alterado ()

CFU: Auto Proliferação () Ausência de Auto Proliferação () Não realizado ()

Condição clínica (classificação OMS/WHO): 0 () 1 () 2 () 3 () 4 ()

Enviar essa ficha para inclusão do paciente no estudo

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE OUTRAS DOENÇAS QUE DETERMINEM CITOPENIAS

Confirmar ou não se os exames abaixo foram realizados para excluir as doenças que simulam a SMD

Positivo Negativo

- () () Avaliação das carências vitamínicas: dosagens do ferro sérico, transferrina e ferritina, ácido fólico e vitamina B12;
- () () Avaliação da função tireóide: dosagens T4L e TSH;
- () () Avaliação da função renal: uréia, creatinina e clearance da creatinina;
- () () Avaliação da função hepática: transaminases, bilirrubinas, eletroforese de proteínas séricas e do tempo de protrombina;
- () () Avaliação das doenças auto-imunes: células LE, fator anti-núcleo, fator reumatóide, fator anti-DNA, Coombs direto e indireto;
- () () Avaliação das doenças infecciosas: sorologias para toxoplasmose, mononucleose infecciosa, hepatites B e C, HIV e citomegalovírus;
- () () Investigação de doenças neoplásicas: raio-X tórax e ultrasonografia abdominal;
- () () Investigação da hemoglobinúria paroxística noturna: testes de Ham e da sacarose.

Esta ficha deve acompanhar a Ficha de Inclusão do protocolo

Ficha de ELEGIBILIDADE para AMIFOSTINA

Critérios de Inclusão:

SIM/ NÃO

Critérios:

- — Termo de Consentimento Assinado
- — Estado clínico satisfatório (OMS-WHO < ou igual a 2)
- — Pacientes com subtipos: AR e ARSA (classificação FAB)
- — Hb menor do que 10 g/dl ou anemia dependente de transfusão de eritrófilos
 - e/ou número de neutrófilos menor do que $1,0 \times 10^3/\text{ul}$ e/ou
 - número de plaquetas menor do que $50,0 \times 10^3/\text{ul}$

Todos devem ser SIM

Critérios de Exclusão:

SIM/ NÃO

Critérios:

- — Não aceitação de participação no estudo
- — Estado clínico insatisfatório (OMS-WHO >2)
- — Hipotensão arterial sistêmica: pressão diastólica < 70,0 mmHg
- — Gestação
- — Miocardiopatias
- — Hepatopatias: bilirrubina total > ou igual a 1,5 mg/dl
- — Nefropatias: creatinina > ou igual a 1,5 mg/dl

Se tiver um SIM o paciente estará excluído do estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a ser obtida de pacientes para participação do
projeto de estudo intitulado

“PROTOCOLO DE TRATAMENTO PARA PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA” – Esquema com Amifostina

Nome do paciente:

Idade: anos RG: HC:

Endereço:

Nome do responsável legal (se paciente incapacitado).....

.....
RG: Grau de parentesco:

Endereço:

Eu aceito participar do estudo proposto, no qual receberei o medicamento amifostina , que tem como função o controle da minha doença. Este medicamento será administrado por via endovenosa, três vezes por semana, por três semanas consecutivas. Poderei receber este tratamento por duas ou seis vezes, dependendo da resposta que eu apresentar a ele. Estou ciente que posso apresentar hipotensão arterial e diminuição do calcio sérico durante a infusão do medicamento. Estou ciente que deverei fornecer amostras de sangue para realizar os exames denominados: hemograma, dosagem de calcio sérico, uréia, creatinina, transaminases e bilirrubinas e de medula óssea para mielograma, citogenética, cultura de

células e imunofenotipagem. Serei também submetido a raio X de tórax e eletrocardiograma para avaliar a função do coração. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Carmen Silvia Passos Lima no Hemocentro – UNICAMP, a rua Carlos Chagas no 420, Campus da Cidade Universitária; CEP: 13081-970. Tel: 788-8740 e 788-8022; Fax: 788 8750. Se tiver reclamações sobre quaisquer dos procedimentos do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP; Tel 788-7232; Fax: 788 8925.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Assinatura do paciente

Assinatura do responsável legal

Pesquisador legal
Dra. Carmen Silvia Passos Lima
RG: 9.675.366

Campinas _____ / _____ / _____

TOXICIDADE (CRITÉRIOS: WHO)

| TOXICIDADE | GRAU 0 | GRAU 1 | GRAU 2 | GRAU 3 | GRAU 4 |
|---|---|--|--|---|---|
| Hematológica (adulto) Hemoglobina g/100ml Leucócitos 1000/mm ³ Granulócitos 1000/mm ³ Plaquetas 1000/mm ³ Hemorragia | $\geq 11,0$ $\geq 4,0$ $\geq 2,0$ ≥ 100 nenhuma | 9,5 - 10,9 3,0 - 3,9 1,5 - 1,9 75 - 99 petéquias | 8,0 - 9,4 2,0 - 2,9 1,0 - 1,4 50 - 74 perda leve de sangue | 6,5 - 7,9 1,0 - 1,9 0,5 - 0,9 25 - 49 perda significativa de sangue | < 6,5 < 1,0 < 0,5 < 25 debilidade por perda de sangue |
| Gastrointestinal Bilirrubina TGO / TGP Fosfatase Alcalina ORAL Náuseas / vômitos Diarréia | $\leq 1,25 \times N$ $\leq 1,25 \times N$ $\leq 1,25 \times N$ nenhuma nenhuma nenhuma | 1,26 - 2,5 x N 1,26 - 2,5 x N 1,26 - 2,5 x N irritação local/eritema náuseas transitória < 2 dias | 2,6 - 5 x N 2,6 - 5 x N 2,6 - 5 x N eritema, estomatite; pode ingerir alimentos sólidos vômitos transitórios tolerável, ≥ 2 dias | 5,1 - 10 x N 5,1 - 10 x N 5,1 - 10 x N estomatite; necessidade de dieta líquida vômitos que requerem terapia intolerável, requer terapia | > 10 x N > 10 x N > 10 x N impossibilidade de se alimentar vômitos intratáveis desidratação |
| Renal-Vesical Uréia sérica Creatinina sérica Proteinúria Hematúria | $\leq 1,25 \times N$ $\leq 1,25 \times N$ nenhuma nenhuma | 1,26 - 2,5 x N 1,26 - 2,5 x N 1 + $< 0,3 \text{ g/dl}$ microscópica | 2,6 - 5 x N 2,6 - 5 x N 2 - 3 + 0,3 - 1,0 g/dl macroscópica | 5,1 - 10 x N 5,1 - 10 x N 4 + $> 1,0 \text{ g/dl}$ macroscópica + coágulos | > 10 x N > 10 x N síndrome nefrótica uropatia obstrutiva |
| Pulmonar | nenhuma | sintomas leves | dispnéia de esforço | dispnéia em repouso | necessidade de repouso absoluto no leito |
| Febre induzida pela droga | nenhuma | febre < 38°C | febre 38 - 40°C | febre > 40°C | febre com hipotensão |
| Alérgica | nenhuma | edema | Broncoespasmo NÃO precisando de terapia parenteral | Broncoespasmo Precisando de terapia parenteral | Anafilaxia |
| Cutânea | nenhuma | Eritema | descamação seca, vesiculação, prurido | Descamação úmida, Ulceração | dermatite exfoliativa, necrose requerendo cirurgia |
| Cabelo | nenhuma | perda mínima de cabelo | alopecia escamosa moderada | alopecia completa porém reversível | alopecia não reversível |
| Infecção (especificar o local) | nenhuma | infecção leve | infecção moderada | infecção grave | infecção grave com hipotensão |
| Cardíaca Ritmo Função Pericardite | Nenhuma Nenhuma Nenhuma | taquicardia sinusal >110 bpm / repouso assintomática, porém com sinais anormais derrame assintomático | EVs unifocais, arritmia atrial disfunção sintomática transitória, terapia desnecessária sintomática, não há necessidade de drenagem | EVs multifocais Disfunção sintomática que responde à Terapia Tamponamento cardíaco, drenagem necessária | Taquicardia Ventricular disfunção sintomática refratária à terapia tamponamento cardíaco, necessidade de cirurgia |

| | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|--|---|--|--------------------------|
| Neurotoxicidade | | | | | |
| Estado de consciência | Atento | letargia transitória | sonolência <50% do tempo que fica acordado | sonolência ≥50% do tempo que fica acordado | Estado de coma |
| Periférica | Nenhuma | parestesia e/ou redução dos reflexos dos tendões | parestesia severa e/ou pequena redução motora | parestesia intolerável e/ou perda acentuada da capacidade motora | Paralisia |
| Constipação** | nenhuma | leve | moderada | distensão abdominal | distensão e vômitos |
| Dor *** | nenhuma | leve | Moderada | severa | Intratável |
| Medula Óssea | normal | Discretamente hipocelular (até 25%) | Moderadamente hipocelular (até 50%) | marcadamente hipocelular (até 75%) | Aplasia |
| Eletrólitos | | | | | |
| Sódio | 135 - 145 | 146-149 / 130-134 | 150-155 / 125-129 | 156-164 / 116-124 | >165 / < 115 |
| Potássio | 3,5 - 5,4 | 5,5-5,9 / 3,1-3,4 | 6,0-6,4 / 2,6-3,0 | 6,5-6,9 / 2,1-2,5 | > 7,0 / < 2,0 |
| Cálcio | 8,5 - 10,5 | 10,6-11,2 / 7,8-8,4 | 11,3-11,9 / 7,0-7,7 | 12,0-12,9 / 6,1-6,9 | > 13,0 / < 6,0 |
| Magnésio | 1,5 - 2,0 | 1,2 - 1,4 | 0,9-1,1 | 0,5 - 0,8 | < 0,5 |
| Peso Corpóreo | Estável | perda < 5 % | perda de 5 a 10% | perda de 10 a 20 % | perda > 20 % |
| Performance ** (Karnofsky) | 0 = normal (90/100) | 1 = média restrição (70 - < 90) | 2 =restrição+intensa (50 - < 70) | 3 = cama ou cadeira de rodas (30 - < 50) | 4 =total dependência |