



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERTO IEMITSU TATAKIHARA

**Possíveis implicações da lactato desidrogenase e
presença do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes com
leucemia mielóide crônica submetidos à
quimioterapia**

LONDRINA
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T216p Tatakihara, Roberto Iemitsu.
Possíveis implicações da lactato desidrogenase e presença do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos à quimioterapia / Roberto Iemitsu Tatakihara. – Londrina, 2009.
51 f. : il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Leucemia mielóide de fase crônica – Estudos experimentais – Teses. 3. Plasma sanguíneo – Teses. 4. Desidrogenase láctica – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica Ehara. II. Universidade Estadual de

ROBERTO IEMITSU TATAKIHARA

**Possíveis implicações da lactato desidrogenase e
presença do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes com
leucemia mielóide crônica submetidos à
quimioterapia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe

Londrina
2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina

Prof^o. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Londrina
2009

DEDICATÓRIA

“A minha esposa e filhos, aos
meus amigos,
companheiros de todas as
horas e para a humanidade
com este ínfimo grão de
areia para que possamos
construir um mundo
melhor.”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Angelica Ehara Watanabe, serei sempre grato por me mostrar que ensinar é acreditar que se pode contribuir para a formação de um caráter; é compartilhar de sua própria existência.

Aos queridos amigos de laboratório, Julie Massayo Maeda Oda, Karen Brajão de Oliveira; Marla Karine Amarante; Mateus Nóbrega Aoki e Thiago Cezar Fujita, pela infinita prestatividade, pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão, por serem como vocês são: únicos e inigualáveis.

A minha família, pela confiança e motivação.

Ao Prof. Dr.Décio Sabatini Barbosa e Prof. Ms. Egídio Tesser pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento das análises bioquímicas.

Aos amigos, pela força e pelo apoio recebido em relação a esta jornada.

Aos professores do Curso, agradeço a dedicação, o tempo e a experiência desprendida para que minha formação fosse também um aprendizado.

Aos colegas de Curso, pela troca de conhecimentos e apoio mútuo.

Agradeço aos pacientes do Instituto do Câncer de Londrina (ICL) e aos doadores saudáveis que confiaram em nosso projeto e nos cederam alíquotas de seu sangue periférico para o desenvolvimento do Projeto.

Agradeço a todos que me auxiliaram a executar este projeto, que por um momento de insensatez esqueci de mencionar nesta página de agradecimentos. Saibam que sou eternamente grato.

Agradeço ao CNPq, a CAPES e Fundação Araucária pelo fomento às pesquisas e pelo financiamento deste Projeto, sem o qual não seria possível concluí-lo.

“Os dias mais
esplêndidos da vida não são os
chamados dias de êxito, mas
sim aqueles em que, saindo do
desânimo e do desespero,
sentimos erguer-se dentro de
nós um desafio: a vida e a
promessa de futuras
realizações”.

Gustavo Flaubert

RESUMO

TATAKIHARA, Roberto Iemitsu. **Possíveis implicações da lactato desidrogenase e presença do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos à quimioterapia.** Trabalho de Dissertação de Mestrado – Programa de Mestrado em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Universidade Estadual de Londrina (UEL), 2009.

As leucemias são caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea e no sangue. Uma das principais características das malignidades hematológicas é a alta frequência de translocações cromossômicas. A grande maioria dos pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) apresenta transcrições de *Bcr-Abl* com junções do tipo b2a2 ou b3a2. O (NO) é considerado importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, sendo capaz de destruir patógenos e células tumorais. Embora o NO seja potencialmente tóxico, a toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. O LDH é considerado um marcador bioquímico comum para crescimento tumoral e glicólise anaeróbica e é um fator prognóstico ruim para leucemia mielóide aguda. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a concentração de nitritos e LDH no plasma e os transcritos *Bcr-Abl* de pacientes com leucemia mielóide crônica e indivíduos controle. Foram analisados 22 pacientes comprovadamente diagnosticados com LMC e 56 doadores saudáveis. As amostras coletadas foram submetidas aos métodos citoquímicos (Coloração Ácido Periódico-Schiff, Coloração de Peroxidase), aos métodos moleculares (Extração de RNA, Síntese de DNAc, Reação em Cadeia da Polimerase para β -actina e para o transcrito *Bcr-Abl* e aos métodos bioquímicos Determinação da Concentração de NO e da LDH. Verificou-se que a maior parte dos pacientes apresentava idade entre 20 a 60 anos e os valores de média e mediana entre os grupos foram semelhantes. A média para o controle foi de 53,39 (mediana = 51,5) e 49,09 (mediana 45,5) para o grupo dos pacientes. O grupo étnico predominante dos grupos analisados foi o caucasóide. Em relação ao sexo, a maior parte do grupo controle era do sexo feminino, e no grupo dos pacientes não houve predominância. A concentração de NO não diferiu entre pacientes com LMC e indivíduos saudáveis. Entretanto, a concentração de LDH no plasma foi maior em pacientes com LMC. Todos os pacientes com LMC do presente estudo estavam sob tratamento, e ainda assim, 4 pacientes apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* (b3a2) no sangue periférico. Embora não tenha ocorrido alteração em nível de NO, 2 destes 4 pacientes apresentaram os maiores valores de LDH (486 U/L e 589 U/L). Desse modo, apesar do estudo ter sido realizado com pequeno número de amostras, pode-se sugerir uma alteração de terapia para os 2 pacientes que apresentaram o transcrito b3a2 no sangue periférico e cuja concentração de LDH estava elevado, a fim de se obter um melhor prognóstico para a doença.

Palavras chaves: leucemia mielóide crônica, óxido nítrico, desidrogenase láctica.

ABSTRACT

TATAKIHARA, Roberto Iemitsu. **Possible implications of lactate dehydrogenase and Bcr-Abl transcripts presence in chronic myeloid leukemia patients under chemotherapy.** Trabalho de Dissertação de Mestrado – Programa de Mestrado em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas (CCB) – Universidade Estadual de Londrina (UEL), 2009.

The leukemias are characterized by the accumulation of malignant white blood cells in bone marrow and blood. One of the main features of hematologic malignancies is the high frequency of chromosomal translocations. The vast majority of patients with chronic myeloid leukemia (CML) present *Bcr-Abl* transcripts as b2a2 or b3a2. Nitric oxide (NO) is considered important mediator of cytotoxic in the activated immune effector cells, being able to destroy tumor cells and pathogens. Although NO is potentially toxic, toxicity is present particularly in situations of oxidative stress, generation of intermediate oxygen and deficiency of the antioxidant system. The LDH is considered a biochemical marker common for tumor growth and anaerobic glycolysis and is a poor prognostic factor for acute myeloid leukemia. Therefore, this study aimed to evaluate the concentration of NO through nitrite concentration and LDH in plasma and the *Bcr-Abl* transcripts in patients with chronic myeloid leukemia and normal subjects. We analyzed 22 patients diagnosed with CML demonstrably and 56 healthy donors. The samples were subjected to cytochemistry methods (Periodic acid-Schiff staining, staining of Peroxidase), the molecular methods (extraction of RNA, Summary of DNA_C, Polymerase Chain Reaction for β -actin and the transcript *Bcr-Abl*) and biochemical methods determination of the concentration of NO and LDH. It was found that most patients were aged 20 to 60 years and the mean and median values between groups were similar. The average for the control was 53.39 (median = 51.5) and 49.09 (median 45.5) for the group of patients. The predominant ethnic group was the Caucasian. In relation to gender, most of the control group was composed of females and the group of patients the values was similar. The concentration of NO did not differ between CML patients and healthy subjects. However, the concentration of LDH in plasma was higher in patients with CML. All patients with CML in this study were under treatment, and still, 4 patients had the transcript BCR-ABL (b3a2) in peripheral blood. Although there was no change in levels of NO, 2 of 4 patients showed higher LDH (486 U/L and 589 U/L). Thus, although the study has been conducted with small numbers of samples, it is possible suggest alteration of therapy for 2 patients who presented the transcript b3a2 the periphery and whose concentration of LDH was high in order to improve the disease

Keywords: chronic myeloid leukemia, nitric oxide, lactate dehydrogenase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Leucemias	2
1.2. Leucemia Mielóide Crônica	3
1.3. Função biológica do óxido nítrico (NO)	7
1.4. Desidrogenase láctica (LDH)	10
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Pacientes	16
3.2. Amostra Biológica.....	16
3.3. Coloração de MAYGRÜNWALD GIEMSA	16
3.4. MÉTODOS CITOQUÍMICOS.....	17
3.4.1. Coloração Ácido Periódico-Schiff - PAS	17
3.4.2. Coloração de Peroxidase	18
3.5. ANÁLISE MOLECULAR	19
3.5.1. Obtenção de leucócitos para extração de RNA.....	19
3.5.2. Síntese de DNAc	19
3.5.3. Reação em cadeia da polimerase - β actina	19
3.5.4. Reação em cadeia da polimerase – Bcr-Abl	20
3.6. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	22
3.6.1. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO).....	22
3.6.2. Determinação Quantitativa de Desidrogenase Láctica (LDH).....	23
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mielograma de paciente com LMC.....	26
Figura 2. Análise citoquímica por PAS em pacientes com LMC.....	28
Figura 3. Análise citoquímica por Peroxidase.....	29
Figura 4. Análise da integridade do RNA.....	31
Figura 5. Expressão do RNAm <i>Bcr-Abl</i> em pacientes com LMC.....	333
Figura 6. Análise de Nitrito no sangue periférico.....	35
Figura 7. Análise da concentração de LDH no sangue periférico.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de idade entre os doadores normais (controle) e pacientes (LMC).....	24
Tabela 2. Distribuição quanto a etnia e sexo	25
Tabela 3. Tempos de tratamento dos pacientes LMC.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L: microlitro

AgNO₃: nitrato de prata

AGPI : ácidos graxos poliinsaturados

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

Bcr-Abl: *breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia*

BSA (*Bovine Serum Albumin*): soro albumina bovina

CC: quimiocina da família CC

CD34⁺: *cluster of differentiation*: marcador de superfície

CX₃C: quimiocina da família CX₃C

CXC: quimiocina da família CXC

DNAc (*desoxyribonucleic acid*): ácido desoxirribonucléico

dNTP: dinucleotídeo livre

EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*): ácido etileno diamino tetracético

μ mol/L: micromol por litro

g/dl: grama por decilitro

g/L: grama por litro

GC : guanilato ciclase

GM-CSF: fator estimulante de colônia granulócito monócito

GMPc: guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato cíclico

H: hora

HCl: ácido clorídrico

HE: hematoxilina-eosina

HGF: fator de crescimento hepatócito

HPA II: Haemophilus parainfluenza

ICL: Instituto do Câncer de Londrina

$K_2S_2O_5$: bissulfito de potássio

KCl: cloreto de potássio

LDH: desidrogenase láctica

LLA: leucemia linfocítica aguda

LMA: leucemia mielóide aguda

LMC: leucemia mielóide crônica

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

mg: miligrama

min: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

mmol/L: milimol por litro

NAD: nicotidamina adenina dinucleotídeo

NADH: nicotidamina adenina dinucleotídeo fosfato

Nm: nanômetro

Nº: número

NO: óxido nítrico

NO_2^- : íon nitrito

NO_3^- : íon nitrato

NOS: óxido nítrico sintase

°C: grau *Celsius*

PAS: ácido periódico de Schiff

pb: pares de bases

PCR (*polymerase chain reaction*): reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

Ph+: Filadélfia

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: RNA mensageiro

RNS: espécies reativas de nitrogênio

ROS: espécies reativas de oxigênio

RPM: rotação por minuto

RT-PCR: reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

TMO: transplante de medula óssea

TNF: fator de necrose tumoral

U/L: unidade por litro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leucemias

As leucemias são um grupo de doenças caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos na medula óssea e no sangue. Estas células anormais causam sintomas associados à falência medular, provocando anemias, neutropenia e trombocitopenia, e a infiltração de órgãos, como fígado, baço, linfonodos, meninges, cérebro, pele. A transformação maligna ocorre como resultado de mutações genéticas em dois grandes grupos de genes: os oncogenes e os genes supressores de tumor (Hoffbrand e Pettit, 1993).

Os oncogenes originam-se de mutações com ganho de função em genes de células normais, chamados proto-oncogenes, os quais estão envolvidos em inúmeros processos celulares importantes, mais freqüentemente nas vias em que um sinal externo é enviado para o núcleo celular, modulando a ativação de genes. As alterações provocadas no genoma podem surgir a partir de mutações, translocações ou duplicações. Uma das principais características das malignidades hematológicas é uma alta freqüência de translocações cromossômicas (Hoffbrand e Pettit, 1993).

Durante a última década, avanços têm ocorrido na elucidação de algumas alterações moleculares primordiais que levam à leucemia. As implicações terapêuticas relacionadas aos conhecimentos detalhados da transdução de sinal em células malignas, têm proposto mesilato de imatinib (Glivec[®]) como tratamento da leucemia mielóide crônica. Por conseguinte, talvez menos atenção tenha sido direcionada ao papel do microambiente hematopoiético na iniciação e progressão da leucemia (Giles *et al.*, 2002).

1.2. Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela liberação de células prematuras da medula e intenso acúmulo de células mielóides maduras e imaturas no sangue, no baço e na medula, tendo como causa a translocação t(9,22) (q34; q11) designada como cromossomo Filadélfia, o qual constitui o marcador citogenético da LMC (Salgia *et al.*, 1999). A LMC foi a primeira doença maligna claramente relacionada a uma anormalidade genética, uma translocação cromossômica conhecida como cromossomo Filadélfia. Esta anormalidade cromossômica é chamada assim por que foi descoberta e pela primeira vez descrita em 1960 por dois cientistas da Filadélfia e Pensilvânia: Peter Nowell da Universidade da Pensilvânia e David Hungerford do Fox Chase Cancer Center (Nowell, 2007).

Esta translocação origina um gene quimérico o qual codifica uma oncoproteína *Bcr-Abl*, que possui atividade tirosina quinase desregulada. A expressão de *Bcr-Abl* em células hematopoiéticas induz a inibição da apoptose, independência de fatores de crescimento, alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, e leucemogênese. Devido à atividade anti-apoptótica deste oncogene, células que expressam *Bcr-Abl* são altamente resistentes a agentes quimioterápicos (Fernandez-Luna, 2000). Na LMC, as moléculas de RNA mensageiro (RNAm) transcritas a partir do gene *Bcr-Abl*, usualmente contêm diferentes tipos de junções, dependendo do sítio de quebra (breakpoint) no cromossomo 22. A relação entre o tipo de rearranjo *Bcr-Abl* e o fenótipo hematológico de leucemias Filadélfia positivas (Ph⁺) tem sido questionado por diferentes grupos de pesquisa, uma vez que resultados conflitantes foram publicados (Saglio *et al.*, 1996; Meissner *et al.*, 1999).

A grande maioria dos pacientes com LMC apresentam transcrições de *Bcr-Abl* com junções do tipo b2a2 ou b3a2. Devido aos processos de *splicing* alternativo, que são aparentemente influenciados por polimorfismo em regiões intrônicas e exontrônicas de DNA, os dois tipos de transcrição podem ser detectados quer no singular ou até mesmo simultaneamente (Branford *et al.*, 2002; Meissner *et al.*, 1998; Millot *et al.*, 2005; Saussele *et al.*, 2000). Outras e menos comuns transcrições como b2a3, b3a3, e1a2 pode também ser verificadas em função de um ponto de quebra fora do M-BCR. Os transcritos RNAm são posteriormente traduzidos em proteínas quiméricas com aumento da atividade de tirosina quinase. A proliferação causa produção clonal de uma ou várias linhagens de células hematopoiéticas com relativa normalidade e maturação (Sawyers, 1999).

No passado, muitos estudos em pacientes adultos com LMC tentaram identificar o impacto da variação do tipo específico de transcritos (b2a2 ou b3a2) sobre os achados clínicos presentes no tempo de diagnóstico (como por exemplo, na contagem de células brancas do sangue e plaquetas) ou nos parâmetros de prognóstico (como por exemplo, na duração da fase crônica). No entanto, durante os últimos 15 anos esses estudos levaram a resultados controversos, com exceção feita em vários relatos que confirmam que a expressão do transcrito b3a2 é acompanhada por significativo aumento na contagem de plaquetas (Bianchi *et al.*, 1995; Inokuchi *et al.*, 1991 ; Perego *et al.*, 2000).

A LMC classifica-se como uma das doenças mieloproliferativas, juntamente com a Policitemia Vera, a Trombocitemia Essencial e a Metaplasia Mielóide (Negrin, 2000). A proliferação celular pode ser regulada direta ou indiretamente. Diretamente através de um mecanismo que determina se a célula passa o ponto de restrição, ou "inicia" o ciclo de divisão celular; ou indiretamente, por exemplo, através da regulação

do comprometimento à diferenciação total ou à morte celular programada. Em qualquer um dos casos, os genes regulatórios normais podem ser classificados naqueles em que os produtos contribuem para estimular um aumento no número de células e naqueles que contribuem para sua inibição.

Existem duas rotas de mutação em direção à proliferação incontrolada da célula e capacidade de invasão que são características do câncer. A primeira é para tornar um gene estimulatório hiperativo: este tipo de mutação possui um efeito dominante - somente uma das duas cópias dos genes necessita sofrer mudanças - e o gene alterado é chamado de oncogene (o alelo normal sendo um proto-oncogene).

A segunda é para fazer um gene inibitório inativo: este tipo de mutação geralmente possui um efeito recessivo, onde ambas as cópias do gene devem ser inativadas ou deletadas para liberar a célula da inibição - e o gene perdido é chamado gene supressor do tumor. Os genes mutantes com efeito dominante - isto é, os oncogenes - podem ser identificados diretamente extraindo o DNA das células tumorais e pesquisando os seus fragmentos que, introduzidos em células normais, irão causar o comportamento semelhante a uma célula tumoral (Alberts *et al.*, 1997; Cooper, 1997).

A presença do gene *Bcr-Abl* e a formação do seu produto final é provavelmente a causa da LMC. Entretanto, o cromossomo Filadélfia não é restrito à LMC. Aproximadamente 5% das crianças (Russo *et al.*, 1991) e 25% (Sandberg, 1986) dos adultos com leucemia linfóide aguda (LLA) apresentam esta translocação. Existem também relatos de casos de leucemia mielóide aguda e leucemia não linfocítica aguda com a translocação Filadélfia.

O gene *Bcr-Abl* dá origem a uma tirosina quinase constitutivamente ativa e algumas drogas têm como alvo inibir esta tirosina quinase, incluindo mesilato de imatinib (Jorgensen e Holyoake, 2007). Ocorre principalmente em indivíduos acima dos 40 anos de idade, embora ocasionalmente afete jovens e crianças (somente 2 a 3% das leucemias infantis são do tipo mielóide crônica) (Morrison, 1994).

Durante o curso variável e instável da fase crônica, um aumento de dez a cem vezes pode ser observado no número de granulócitos no sangue periférico, resultando, por vezes, em esplenomegalia acentuada. Embora a hiperplasia granulocítica na LMC possa ser considerada o primeiro passo na transformação maligna, as células leucêmicas são morfológica e funcionalmente difíceis de distinguir das células normais (Pasternak *et al.*, 1998).

Pouco menos de 5% de blastos e promielócitos são observados na medula óssea e no sangue, e em alguns casos, basofilia e trombocitose estão associados. Os indivíduos geralmente apresentam sintomas leves, como mal-estar, fadiga, perda de peso, cefaléia, plenitude pós-prandial e desconforto no hipocôndrio esquerdo. Além disso, costumam apresentar elevada responsividade aos tratamentos convencionais (Hoffbrand e Pettit, 1993).

No mielograma é possível observar hiperplasia com hiperplasia granulocítica e megacariocítica, embora muitas vezes outras alterações estejam presentes (Morrison, 1994).

Células imaturas surgem na circulação na fase acelerada, mantendo a contagem de leucócitos acima dos 20.000/ μ L, com esplenomegalia crescente, hepatomegalia, infiltração de linfonodos, da pele, dos ossos e de outros tecidos. Com o desenvolvimento de anemia e/ou trombocitopenia, os sintomas tornam-se mais

acentuados, e mais resistentes à terapêutica e cerca de 15% dos pacientes entram nesta fase (Saweyrs, 2004).

Os blastos no sangue periférico indicam progressão da doença. Estas células que substituem os granulócitos normais representam um subclone demonstrando novas características, como outras anormalidades cromossômicas, além do cromossomo Filadélfia, as quais podem ser observadas na fase acelerada e na crise blástica (Pasternak *et al.*, 1998).

Na crise blástica, que pode ser abrupta ou precedida pela fase acelerada, o quadro clínico assemelha-se ao da leucemia aguda, sendo comumente refratária ao tratamento. Aproximadamente 30% de células blásticas se encontram na medula óssea e/ou no sangue periférico, com presença de neutrófilos, e eosinófilos em maior quantidade. O total de basófilos pode subir para 20% e o paciente desenvolve trombocitopenia (Talpaz *et al.*, 2002). As células blásticas freqüentemente invadem outros tecidos e órgãos (Hoffbrand e Pettit, 1993). Por punção medular observa-se hiper celularidade com hiperplasia mielóide, numa relação mielóide/eritróide de 15/1 a 20/1.

1.3. Função biológica do óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morrison *et al.*, 1994). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (Beckman *et al.*, 1996).

O reconhecimento da importância do NO como molécula envolvida no sistema biológico foi na década de 80 quando era considerado apenas membro de uma família

de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (James 1995). Estudos verificaram o papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo e observaram a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina que age liberando um fator essencial para o relaxamento vascular (*endothelial-derived relaxing factor* - EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Alguns anos mais tarde, foram demonstrados que este composto era idêntico ao NO (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1988).

Na década de 70 Katsuki *et al.*, (1977) e Schultz *et al.*, (1977) tentavam buscar uma explicação científica para uma conduta terapêutica introduzida, empiricamente, pela medicina chinesa há mais de cem anos. Tratava-se do uso de nitratos orgânicos e de nitroglicerina como tratamento da *angina pectoris*, da insuficiência cardíaca congestiva, da hipertensão pulmonar e de outras complicações vasculares. A resposta para esta investigação veio anos depois onde concluíram que nitratos orgânicos induzem a um aumento dos níveis de GMPc dependente da dose e que estes compostos eram, a princípio, inativos, mas sua metabolização resultava na produção de NO. Posteriormente, esses investigadores concluíram que o NO era a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, que resultava na dilatação das artérias coronárias, melhorava o suprimento sanguíneo ao coração e, conseqüentemente, aliviava os sintomas.

Katsuki *et al.* (1977) demonstraram que o mecanismo pelo qual estes compostos causavam vasodilatação envolvia a ativação da enzima guanilato ciclase (GC), mediada por NO, e o conseqüente acúmulo de GMPc. Neste contexto, estabeleceu-se a importância do NO, exógeno ou endógeno, no processo de relaxamento vascular.

Schmidt e Walter (1994) relataram que no início do século foi sugerido que os mamíferos produzem óxidos de nitrogênio, e foi demonstrado que a quantidade

eliminada destes compostos excedia a quantidade ingerida, porém este relato foi ignorado até a década de 70. Snyder e Bredt em 1992 relataram que o organismo humano era capaz de converter nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) da dieta em nitrosaminas carcinogênicas, após a reação do NO_2^- com aminas.

Em 1989, foi confirmada a produção de óxido nítrico no sistema nervoso (Bredt e Snyder 1989; Knowles *et al.*, 1989) e foi isolada do cerebelo de rato e purificada uma isoforma da enzima responsável pela formação de NO, a óxido nítrico sintase (NOS)

Efeitos tóxicos sobre as células podem ocorrer a partir da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por substâncias reativas de oxigênio (ROS) e substâncias reativas de nitrogênio (RNS), conhecidas como radicais livres (Giller e Singler, 1995; Romero *et al.*, 1998).

Burkitt e Raafat (2006) através de estudos relacionados à produção de NO e implicações em desordens mieloproliferativas, sugeriram que a hidroxiuréia, utilizada na quimioterapia, pode induzir mutações em células de cultura, resultado este, proveniente da produção de dióxido de nitrogênio via auto-oxidação do NO, o qual é produto do metabolismo da hidroxiuréia. Os autores ressaltam que este processo é peculiar de experimentos *in vitro*.

A determinação laboratorial do NO é complexa, e a caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças. O óxido nítrico é um mediador gasoso difundível originado da L-arginina através da óxido nítrico sintase induzível e constitutivo. Tem sido associado com efeitos citotóxicos. Células inflamatórias de Langerhans podem expressar a forma induzível de óxido nítrico sintase e produzir elevada quantidade de NO (Iuga *et al.*, 2004).

O NO, dependendo do sistema a ser analisado pode ser às vezes benéfico e outras vezes, prejudicial ao organismo. Pode estar envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. Embora o NO seja potencialmente tóxico, a toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. O NO é considerado importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, sendo capaz de destruir patógenos e células tumorais (Dusse *et al.*, 2003).

1.4. Desidrogenase láctica (LDH)

A desidrogenase láctica (LDH) tem sido identificada como um determinante de prognóstico no acompanhamento de pacientes com síndromes mielodisplásicas. O aumento da concentração desta enzima está associado com o aumento da probabilidade de evolução para leucemia mielóide aguda e diminuição da probabilidade de sobrevivência (Wimazal *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2006).

Níveis de LDH são preditivos no prognóstico em diversas neoplasias como tumores de células germinativas (von Eyben *et al.*, 2001), linfomas não-Hodgkin (Solal-Celigny *et al.*, 2004) e câncer de pulmão de pequenas células (Lassen *et al.*, 1999). Outros estudos demonstram o valor preditivo e adverso de altos níveis de LDH antes de transplantes autólogos de células troncos em linfomas não-Hodgkin (Bolwell *et al.*, 2002; Copelan *et al.*, 2000). Recentemente, um aumento nos níveis de LDH demonstrou uma influência negativa sobre a sobrevivência, seguida de uma intensa redução de

células tronco após transplante alogênico em uma população heterogênea de pacientes dos quais 30% eram acometidos por leucemia aguda (Mehta *et al.*, 2006).

Kalaycio *et al.* (2007) sugerem que elevados níveis de LDH independentemente podem indicar um mau prognóstico após TMO alogênico para LMA. A LDH não tem sido previamente verificada como um potencial fator de risco após transplante de medula óssea (TMO) na LMA.

Mielofibrose é uma desordem clonal mieloproliferativa caracterizada por esplenomegalia, fibrose da medula óssea e hematopoiese extramedular, dacriocitose, e esfregaço sanguíneo leucoblástico (Colovic *et al.*, 1998a, Colovic *et al.*, 1998b; Colovic *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 1992). Entre 5% a 20% das pacientes com mielofibrose morrem de leucemia aguda, que pode apresentar qualquer subtipo morfológica ou imunofenotípica. Leucemias secundárias na mielofibrose frequentemente apresentaram complicações no curso natural das doenças tratada com quimioterapia ou radioterapia (Colovic *et al.*, 1998b). Jurisic *et al.* (2008) apresentaram caso atípico de transformação leucêmica em mielofibrose associada com lesões osteolíticas e TNF alfa e LDH elevados.

Pacientes com mieloma múltiplo em estágio clínico avançado, com osteólise e LDH elevado apresentam diferença significativa no nível de TNF no soro quando comparado com o estágio inicial na ausência de osteólise e com concentração de LDH normal.

Fatores prognósticos de sobrevivência após transplante alogênico de medula óssea para leucemia mielóide aguda incluem idade, estado da doença e classificação de risco citogenético. Níveis de LDH não têm sido avaliados como um fator de risco em potencial. Kalaycio *et al.* (2007) incluíram LDH na análise de fatores prognósticos para

sobrevida. Tem sido proposto que LDH com valores acima de 330U/L é fator de risco em relação à sobrevivência.

Baseado nestes dados, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a concentração de nitritos e LDH no plasma de pacientes com leucemia mielóide crônica, em comparação com indivíduos normais (doadores de sangue), e a partir da análise dos transcritos *Bcr-Abl*, verificar possíveis implicações LDH e NO durante o tratamento.

JUSTIFICATIVA

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela liberação de células prematuras da medula e intenso acúmulo de células mielóides maduras e imaturas no sangue, no baço e na medula, tendo como causa a translocação t(9,22) designada como cromossomo Filadélfia, o qual constitui o marcador citogenético da LMC. Esta translocação origina um gene quimérico o qual codifica uma oncoproteína Bcr-Abl, que possui atividade tirosina quinase desregulada. Esta tirosina quinase é responsável por desregular funções celulares, inativando e ativando inúmeras vias de sinalização intracelulares, responsáveis pelo controle da proliferação e morte celular, além de promover defeitos nos elementos de adesão celular.

A LDH tem sido identificada como um determinante de prognóstico no acompanhamento de pacientes com síndromes mielodisplásicas. O aumento da concentração desta enzima está associado com o aumento da probabilidade de evolução para leucemia mielóide aguda e diminuição da probabilidade de sobrevida.

Considerado um segundo mensageiro intracelular, o NO apresenta implicações no controle da maquinaria transcricional e expressão gênica. O NO também é considerado importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, sendo capaz de destruir patógenos e células tumorais. É possível que a via do NO possa desempenhar um papel crítico no tráfego de progenitores hematopoiéticos, levando também a um aumento na liberação da desidrogenase láctica, com isso contribuindo para a evolução do tumor e um mau prognóstico dos pacientes com LMC.

Uma vez que, as células leucêmicas são de origem hematopoiética caracterizada pelo aumento de leucócitos no sangue periférico e presença do transcrito *Bcr-Abl*, muitos pacientes que não respondem à determinada quimioterapia poderiam apresentar

elevada concentração de LDH devido ao aumento de citotoxicidade celular causada pelo aumento de NO.

Portanto, no presente trabalho, investigamos associação do aumento de NO e aumento de LDH no sangue periférico em pacientes submetidos à quimioterapia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar possíveis implicações LDH e NO através da detecção do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes com LMC submetidos à quimioterapia.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil etário e o sexo dos pacientes e doadores saudáveis,
- Analisar o perfil étnico dos grupos analisados,
- Demonstrar as análises citoquímicas em LMC,
- Verificar a presença do transcrito *Bcr-Abl* em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico,
- Avaliar a concentração de óxido nítrico (NO) através da dosagem de nitritos no plasma,
- Avaliar a concentração de LDH no plasma dos indivíduos saudáveis e dos pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, e está de acordo com a resolução 196/96. Todos os doadores de amostras de sangue assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1. População Alvo

Foram coletadas amostras de sangue periférico e de medula de 22 pacientes comprovadamente diagnosticados para leucemia mielóide crônica, provenientes do Instituto de Câncer de Londrina (ICL) e dos 56 indivíduos saudáveis, provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina.

3.2. Amostra Biológica

As amostras de sangue foram coletadas com tubos contendo o anticoagulante heparina (10g/dL). Realizou-se punção venosa (veia cefálica ou basílica) ou arterial (radial ou braquial), utilizando-se o sistema *vacutainer*.

3.3. Coloração de MAYGRÜNWARD - GIEMSA

Para realizar a contracoloração da técnica de peroxidase utilizou-se a coloração de MayGrünwald Giemsa, o qual é composto de dois corantes separados, o corante de MayGrünwald e o corante de Giemsa. O corante de MayGrünwald é composto pela eosina azul de metileno e o corante de Giemsa (mistura de azur II – mistura equimolar de azur 1 e azul de metileno- e eosinato de azur II – corante formado pela combinação

equimolar de azul 1, azul de metileno e eosina amarelada). O MayGrünwald é um corante que tem afinidade pelo citoplasma, corando tanto estruturas básicas como ácidas. O Giemsa promove a coloração tanto do citoplasma como do núcleo, mas sua principal propriedade é a coloração de estruturas ácidas e básicas da cromatina.

Os esfregaços realizados foram cobertos com o MayGrünwald por 3 minutos, em seguida, adicionou-se sobre as lâminas água destilada tamponada (pH 6,8 a 7,2) por 1 minuto. O corante de Giemsa foi preparado para uso, na proporção de uma gota do corante para cada 1 mL de água. Após o tempo de um minuto, desprezou-se a solução MayGrünwald e o material foi coberto com corante de Giemsa por 15 minutos. Após este tempo as lâminas foram lavadas em água corrente de modo abundante.

3.4. MÉTODOS CITOQUÍMICOS

3.4.1. Coloração Ácido Periódico-Schiff - PAS

A coloração de PAS foi realizada conforme a técnica de McManus, 1946 modificada (Hayhoe e Flemans, 1995). O reativo de Schiff é composto por 1,0 g de fucsina (Merck), 200 mL de água deionizada, 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado - 35 a 39% (Merck), 2,0 g de bissulfito de potássio- $K_2S_2O_5$ (Merck). 200 mL de água deionizada foi aquecida até ebulição, e simultaneamente adicionou-se a fucsina. Após a dissolução da fucsina, resfriou-se a solução à 50°C. Adicionou-se 1,0 mL de HCl concentrado, agitou-se, e logo após acrescentou-se o $K_2S_2O_5$. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz por 24 horas. Depois desse prazo, foi adicionado à solução 0,5 g de carvão ativado. Procedeu-se a filtração, obtendo-se um filtrado incolor e transparente.

As soluções de ácido periódico (Merck) a 1%, verde de malaquita (Merck) a 0,1% e solução sulfurosa foram preparadas no momento da utilização. Para o preparo da

solução sulfurosa utilizou-se: 200 mL de água deionizada, 1g de $K_2S_2O_5$ e 10 mL de HCl 1N.

Após o preparo da solução das soluções supracitadas realizou-se a coloração. Os esfregaços sangüíneos de medula foram submetidos à fixação com formol a 35% durante 10 minutos e depois lavados com álcool 70% por 30 segundos. Cobriram-se os esfregaços durante 10 minutos com a solução de ácido periódico a 1%. As lâminas foram lavadas com água destilada. Após a secagem do material cobriram-se os esfregaços com solução de Schiff por 50 minutos, em seguida colocou-se o material imerso em solução sulfurosa. Foram dados 3 banhos de 2 minutos cada e os esfregaços foram lavados em água destilada por 1 minuto. Contracolorou-se as lâminas com verde de malaquita 0,1% durante 2 minutos. O material foi lavado com água destilada, e após seco, estava pronto para análise.

3.4.2. Coloração de Peroxidase

A coloração para Peroxidase foi realizada pela Técnica de Graham-Knoll modificada (Hayhoe e Flemans, 1995). Fixaram-se os esfregaços em 9 partes de etanol absoluto (MERCK) e 1 parte de formol 35%. As lâminas foram cobertas com esta solução por 30 segundos. O material foi lavado com água deionizada e seco. Para o preparo da solução de peroxidase utilizou-se ortotoluidina (Merck) dissolvido em etanol (Merck). Adicionou-se 4 ml de água destilada e de peróxido de hidrogênio. O material foi coberto com esta solução por 7 minutos e 30 segundos (cronometrados). As lâminas foram lavadas com água destilada e contracoradas pelo método de MayGrünwald Giemsa.

3.5. ANÁLISE MOLECULAR

3.5.1. Obtenção de leucócitos para extração de RNA

A partir da amostra de sangue periférico de pacientes com LMC foi realizada extração de RNA. A amostra de sangue foi centrifugada e a camada de leucócitos da interfase foi coletada. As hemácias foram lisadas em solução de lise de hemácias para volume final de 15mL, e o tubo centrifugado à 2500rpm em temperatura ambiente, por 15min. O sobrenadante foi descartado. Ao sedimento de leucócitos adicionou-se 700µL de TRIzol-LS (*Invitrogen*, E.U.A.), do qual o RNA foi extraído, seguindo as instruções do fabricante.

3.5.2. Síntese de DNAc

A transcrição reversa foi realizada a partir de 7µl de RNA com 2,5µM primer antisense do primeiro PCR para *Bcr-Abl*, utilizando 0,5U de transcriptase reversa (*Mulv reverse transcriptase GeneAmp RNA PCR kit*, Perkin Elmer). A reação foi efetuada em tampão específico (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 200µM dNTP) e submetida ao termociclador (*PCR Sprint ThermoHybaid*, Biosystems), à 45°C por 60min.

3.5.3. Reação em cadeia da polimerase - β actina

Os primers utilizados para a amplificação foram obtidos de acordo com o *GenBank* (Accession number: BC014861):

primer β -act 1 - sense: 5' GCTCGTCGTCGACAACGGCTC 3'

primer β -act 2 - antisense 5' CTGGGTCATCTTCTC 3'

A reação de PCR para β actina foi realizada no termociclador (*PCR Sprint ThermoHybaid*) utilizando-se: 20mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP e 0.5U de *Taq polimerase*. Inicialmente, uma etapa de desnaturação foi constituída por um minuto à 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C (*annealing*) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com extensão final de 10 minutos a 72°C. O fragmento amplificado de β actina de 353 pares de bases foi observado após eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, por 1,5h, e coloração por prata.

3.5.4. Reação em cadeia da polimerase – *Bcr-Abl*

Os *primers* utilizados para amplificação do RNAm *Bcr-Abl* foram obtidos a partir da seqüência depositada no GenBank, sob o número de acesso AJ131466:

primer LM1 (*outter*) – sense: 5' TTCAGAAGCTTCTCCCTG 3'

primer LM2 (*outter*) – antisense: 5' CTCCACTGGCCACAAAAT 3'

primer LM3 (*inner*) – sense: 5' TTCAGAAGCTTCTCCCTGACATCCG 3'

primer LM4 (*inner*) – antisense: 5' CTCCACTGGCCACAAAATCATACAG 3'

Duas reações seguidas de PCR (*nested-PCR*) foram realizadas, de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Volume
10X PCR <i>Buffer</i>	2,5 μ L
$MgCl_2$ 50mM	0,75 μ L
dNTP 1,25mM	3,0 μ L
LM-1 <i>sense</i> 2,5 μ M	2,5 μ L
LM-2 <i>antisense</i> 2,5 μ M	2,5 μ L
<i>Taq polimerase</i> (1:10)	2,5 μ L
H ₂ O ultra pura (<i>Milli-Q</i>)	8,75 μ L
DNAc*	2,5 μ L
Volume Final	25 μ L

*Na segunda reação foi utilizado o produto da primeira reação como *template*.

As duas reações diferiram apenas pela substituição dos *primers* LM-1 e LM-2 pelos *primers* LM-3 (*sense*) e LM-4 (*antisense*) na segunda reação, partindo de 2,5µL do produto da primeira reação. Entretanto, os tempos dos ciclos no termociclador diferiram em algumas etapas, como segue:

1ª Reação			2ª Reação		
Temperatura	Tempo	Nº. de Ciclos	Temperatura	Tempo	Nº. de Ciclos
93°C	2min	1	93°C	2min	1
93°C	40s	35	93°C	40s	35
60°C	30s		60°C	40s	
72°C	40s		72°C	1min	
72°C	7min	1	72°C	7min	1
4°C	<i>forever</i>		4°C	<i>forever</i>	

Após a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, por 1,5h, e posteriormente coloração por prata, para análise dos produtos amplificados. A presença do transcrito b2a2 revelou um fragmento de 253pb, enquanto um fragmento de 328pb indicou a amplificação do transcrito do tipo b3a2.

Além disso, o produto amplificado na reação de PCR para *Bcr-Abl*, correspondente ao transcrito b3a2, também foi submetido às mesmas condições de reação para digestão enzimática, uma vez que este fragmento possui um sítio de restrição reconhecido pela enzima *HpaII* (destacado em verde na seqüência do RNAm *Bcr-Abl*). O produto final foi submetido à eletroforese em agarose a 2% e posteriormente analisado sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídeo, revelando dois fragmentos digeridos: um de 115pb e outro de 213pb.

3.6. ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.6.1. Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

Em função da ínfima concentração e da meia-vida curta do NO, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (Archers, 1993; Kiechle e Marlinski, 1993), a sua presença no sangue periférico foi medida indiretamente como concentração de nitrito no plasma.

A redução de íons nitratos (NO_3^-) a íons nitritos (NO_2^-) foi realizada por reação não enzimática, empregando-se grânulos de cádmio (Fluka[®]). Para a desproteíntização, utilizou-se 300 μL de amostra com 75 mmol/L de sulfato de zinco (Reagen[®]), centrifugado a 10.000 rpm e adicionado 55 mmol/L de hidróxido de sódio. O sobrenadante foi recuperado e diluído com 45 g/L de tampão glicina pH 9,7 (Vetec[®]). Grânulos de cádmio foram ativados com 5 mmol/L de sulfato de cobre (Synth[®]) em agitação contínua e adicionados na amostra desproteíntizada para a redução de nitratos a nitritos (Navarro-González *et al.*, 1998).

A concentração de nitritos foi avaliada colorimetricamente pela reação de Griess (Navarro-González *et al.*, 1998) com algumas adaptações, contendo igual volume de 0,2% de N-naftil etileno diamina dihidrocloro (Sigma[®]) e 2% de sulfanilamida (Acros[®]) em 5% de ácido fosfórico (Synth[®]). Adicionou-se 850 μL do reagente de Griess a 250 μL da amostra, sendo a absorbância determinada a 540 nm. A curva de calibração para a concentração de nitritos foi estabelecida usando solução 100 mM de nitrito de sódio (Synth[®]). A concentração foi expressa em $\mu\text{mol/L}$ (micro mol por litro de plasma).

3.6.2. Determinação Quantitativa de Desidrogenase Láctica (LDH)

Este método é uma modificação do procedimento enzimático lactato para piruvato referido pela primeira vez por Wacker (1956) e posteriormente modificado por Gay *et al.* (1968). Para a execução da análise de LDH foi utilizado cartucho de reagente Flex[®] LDH, catálogo DF53A seguindo o manual Dimension[®]. Foram utilizados 14 µl da amostra de plasma com 140µl de reagente (NAD, tampão Tris, L-lactato) e 196µl do diluente. Para realização deste ensaio foi utilizado espectrofotômetro Dimension XL[®] com comprimento de onda 340 nm a 37°C, com tipo de leitura bicromática (unidade de LDH: U/L).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste *t-Student* através do software de análise gráfica e científica OriginPro 8.0 (OriginLab, Northampton, E.U.A.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição da faixa etária entre indivíduos normais saudáveis (controle) e pacientes com leucemia mielóide crônica (LMC) envolvidos no presente estudo estão representadas na tabela 1.

Tabela 1 Distribuição de idade entre os doadores normais (controle) e pacientes (LMC)

FAIXA ETÁRIA	CONTROLE (%)	Pacientes (%)
20-40	4 (7,14 %)	9 (40,91 %)
41-60	42 (75 %)	9 (40,91 %)
61-80	8 (14,29 %)	3 (13,64 %)
81-100	2 (3,57 %)	1 (4,54)
TOTAL	56 (100 %)	22 (100 %)

Embora a maior parte dos pacientes apresentasse de 20 a 60 anos de idade, os valores de média e mediana entre os grupos foram semelhantes. A média para o grupo controle foi de 53,39 anos (mediana=51,5) e 49,09 anos (mediana=45,5) para o grupo dos pacientes.

A etnia predominante do grupo controle e pacientes foi a caucasóide, embora mais de 20% dos pacientes fossem negros (22,7%). Quanto ao sexo, a maior parte do grupo controle era do sexo feminino, e no grupo dos pacientes não houve predominância (tabela 2).

Tabela 2 Distribuição quanto à etnia e sexo

ETNIA	CONTROLE	%	SEXO	
			FEMININO	MASCULINO
BRANCO	41	73,2	25	16
PARDO	6	10,7	2	4
AMARELO	1	1,8	0	1
NEGRO	8	14,3	5	3
TOTAL	56	100	32	24

ETNIA	LMC	%	SEXO	
			FEMININO	MASCULINO
BRANCO	16	72,7	7	9
PARDO	0	0	0	0
AMARELO	1	4,5	0	1
NEGRO	5	22,7	3	2
TOTAL	22	100	10	12

A LMC ocorre em todas as faixas etárias, mas é mais comum em pessoas de meia idade e idosos. Sua incidência anual é de 1 a 2 pessoas por 100.000, sendo ligeiramente mais prevalente entre homens do que mulheres. LMC representa de 15 a 20% de todos os casos de leucemia entre a população ocidental (Faderl *et al.*, 1999).

Normalmente a suspeita de LMC é baseada em um exame de rotina, o hemograma, que mostra um aumento de granulócitos de todos os tipos, tipicamente incluindo células mielóides maduras (Hehlmann *et al.*, 2007).

O prognóstico desfavorável na idade avançada entre os indivíduos com LMC é bem conhecido (Hernandez-Boluda *et al.*, 1999; Kantarjian *et al.*, 1985). A média de idade entre os pacientes com leucemia mielóide crônica é de 50 anos, com discreta predominância do sexo masculino (Morrison, 1994). Assim, a incidência máxima de apresentação da LMC situa-se entre 30-50 anos de idade.

Estudos têm avaliado a prevalência da LMC entre os pacientes atendidos. Num estudo baseado na análise populacional, 567 pacientes americanos com LMC foram

avaliados, onde 52% eram do sexo masculino (Menzin *et al.*, 2004). Berger *et al.* (2005) observaram uma frequência de 59% (503/856) de LMC em homens alemães. Desta forma, os dados obtidos no presente trabalho (55 % de homens com LMC) encontram-se coerentes com a literatura existente.

Os pacientes atendidos no Hospital do Câncer de Londrina, após anamnese, e indicação clínica, são submetidos à punção de medula óssea. Após a punção de medula que pode ser realizada na região da crista íliaca, ou osso esterno, são confeccionados entre 5 a 10 esfregaços sangüíneos que são submetidos a colorações de MayGrünwald Giemsa (Figura 1). O diagnóstico apresentado foi realizado, mediante a porcentagem de blastos na medula óssea do paciente, o aspecto morfológico das células da medula óssea e por fim, o resultado da coloração por citoquímica. Algumas amostras foram submetidas à técnica de Imunofenotipagem e RT-PCR para detecção do transcrito.

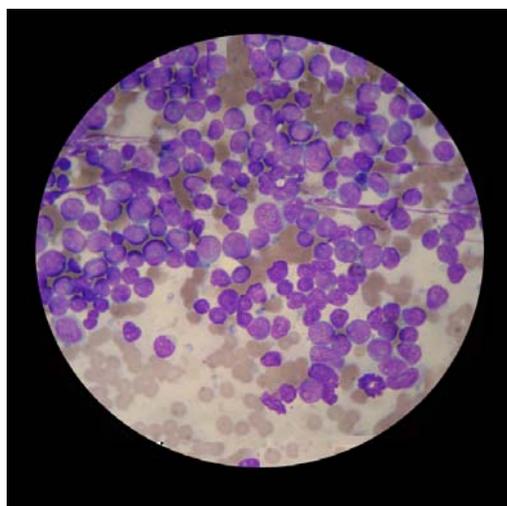


Figura 1 Mielograma de paciente com LMC. O perfil celular apresenta aumento de células mielóides e diversos tipos celulares, hiperplasia do tecido granulopoiético. O esfregaço foi corado com *Giemsa* (400x).

A LMC é uma forma de leucemia caracterizada pela proliferação de células da linhagem granulocítica sem a perda de capacidade de diferenciação.

Independente da apresentação clínica do paciente, e da morfologia celular a nível de medula, após analisada com a coloração de MayGrünwald Giemsa, as lâminas de esfregaço sangüíneo são submetidas aos testes citoquímicos de PAS e Peroxidase.

Corantes citoquímicos são úteis na diferenciação entre LLA e LMA. O ácido periódico de Schiff (PAS), a peroxidase ou o SUDAN BLACK B e os corantes de esterases são usados na avaliação diagnóstica inicial. Na LMA sem maturação, a célula predominante não é diferenciada pela microscopia óptica e pelas reações citoquímicas. A linhagem mielóide é estabelecida pela demonstração por microscopia eletrônica, de grânulos positivos para a peroxidase ou pela detecção de pelo menos, um antígeno mielóide específico para a linhagem. A diferenciação linfóide deverá ser excluída pela imunofenotipagem.

A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta. O PAS é primariamente usado para identificar glicogênio em tecidos. Um corante básico adequado é frequentemente usado como um corante de contraste. Reações positivas indicam a presença de glicogênio, um polímero de glicose e de outros 1,2-glicóis. É uma reação efetuada em duas etapas: na primeira, grupos vicinais hidroxil são oxidados a aldeídos; na segunda etapa, os dialdeídos formados são demonstrados usando-se o reagente de Schiff, que é o corante fucsina básica. A cor produzida varia entre o púrpura e o magenta, nos sítios onde se localizam carboidratos oxidáveis (mono, oligo e polissacarídeos, glico- e mucoproteínas). As células blásticas granulocíticas quase não possuem glicogênio.

Este glicogênio é bastante lábil e é rapidamente consumido em situações de baixa glicemia, sendo também rapidamente repostado. Nos eosinófilos, os polissacárides não parecem se localizar nas granulações, que por conterem grande quantidade de

proteínas básicas ricas em arginina (responsáveis pela afinidade aos corantes ácidos), não se coram pelo PAS.

A Figura 2 mostra o aspecto da medula óssea de um paciente envolvido neste estudo, com LMC, com coloração diferencial PAS o qual é negativa para LMC.

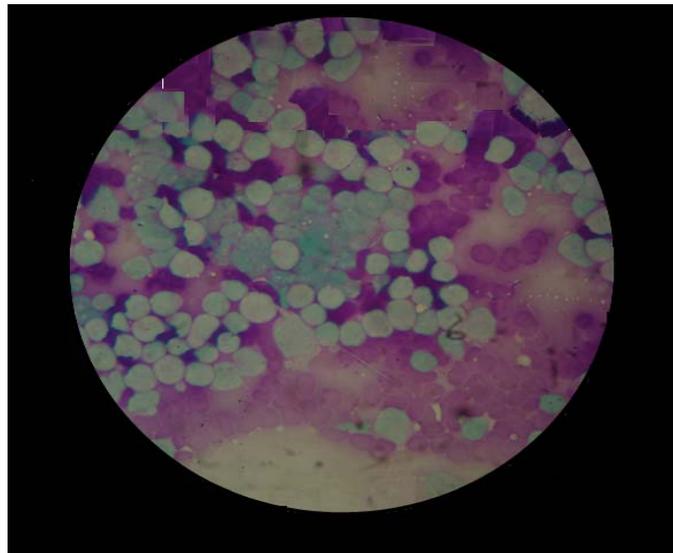


Figura 2. Análise citoquímica por PAS em pacientes com LMC. Ausência de oxidação em resíduos de glicose e ausência de aldeídos que reagem com o reagente de Schiff (400x).

O corante PAS reage principalmente com o glicogênio celular. Os linfoblastos da LLA frequentemente demonstram uma evidente coloração pelo PAS na forma de anéis concêntricos de grânulos grosseiros ou “blocos maciços”, o qual não ocorre com as células indiferenciadas de LMC.

Em humanos, peroxidases são encontradas nos microssomas das células hepáticas e renais, e nos grânulos das células mielóides e monocitóides. A mieloperoxidase localiza-se nos grânulos azurófilos primários. Os blastos primitivos, comprometidos com a linhagem mielóide, demonstram atividade de peroxidase em

áreas como o retículo endoplasmático e a região de Golgi. A reação catalisada pela peroxidase é a decomposição dos peróxidos, liberando oxigênio (que vai oxidar um determinado receptor). Na identificação, o peróxido usado é o de hidrogênio, e o receptor é, em geral, a benzidina. O mecanismo é a oxidação da benzidina, incolor, ao azul de benzidina, que é instável, e finalmente ao composto estável de cor castanho-esverdeada.

A reação de mieloperoxidase é fortemente positiva em células da série granulocítica e fracamente positiva em monócitos. A mieloperoxidase, a enzima detectada pelo corante, localiza-se nos grânulos azurofílicos das células nas séries neutrofílica e monocítica e nos grânulos específicos dos eosinófilos. A reação também pode ser positiva em mieloblastos indiferenciados não possuidores de grânulos azurofílicos. Linfócitos e precursores eritróides são negativos para a peroxidase.

A demonstração da atividade da mieloperoxidase em no mínimo 3% de blastos que sejam inequivocamente leucêmicos estabelece um diagnóstico de LMA, sendo, portanto, um teste diferencial entre as LLAs e as LMAs. A Figura 3 demonstra a positividade da peroxidase em 91,0% das células blásticas de um paciente com LMA.

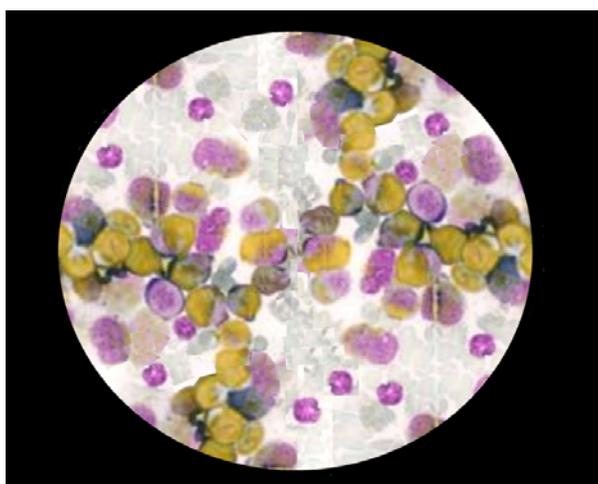


Figura 3. Análise citoquímica por Peroxidase. Medula óssea apresentando positividade em 96,0% dos blastos para a coloração de Peroxidase. Esfregaço sangüíneo de medula óssea de paciente portador de LMA (400x).

Todos os pacientes selecionados para este estudo estavam em tratamento quimioterápico, como demonstra a Tabela 3 e no momento da coleta do sangue periférico dos pacientes, os valores de concentração de leucócitos encontravam-se próximo do normal (5000-10.000mm³).

Tabela 3. Tempos de tratamento dos pacientes LMC.

Tempo de tratamento (anos)	No. Pacientes (22)
< 1	4
1 a 1,9	3
2 - 2,9	7
3 a 5	5
6 a 9	1
>10	2

Uma biópsia da medula óssea é frequentemente realizada como parte da avaliação da LMC, mas sua avaliação morfológica somente, é insuficiente para o diagnóstico.

A LMC é um tipo de doença mieloproliferativa característica por uma aberração citogenética ocasionada por uma translocação entre o cromossomo 9 e 22; t(9;22). Essa translocação resulta em um cromossomo 22 mais encurtado, chamado de cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph1). Ocorre a fusão de dois genes nos cromossomos 9 e 22, chamados respectivamente de *Bcr-Abl*.

Rotineiramente a integridade das amostras é analisada através da amplificação do RNAm da β actina (Figura 4). Um fragmento de 353pb foi detectado em todas as

amostras, demonstrando que o RNA extraído das células do sangue periférico estava íntegro e não apresentava contaminação com DNA.

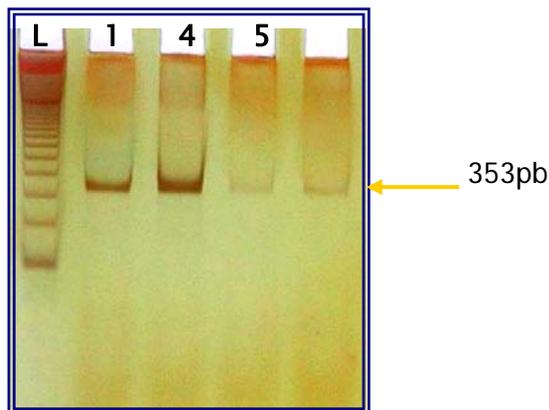


Figura 4 Análise da integridade do RNA. Amplificação do RNAm β actina. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corado por prata. A amplificação do fragmento de 353pb indica presença de RNA. L – *ladder*.

A análise cromossômica das doenças hematológicas malignas é eficiente não só para um diagnóstico mais refinado, mas também para a compreensão dos mecanismos envolvidos na malignidade e para encontrar genes de importância biológica. O estudo das alterações cromossômicas das células neoplásicas é de grande utilidade para diagnóstico, classificação, orientação terapêutica e prognóstico das leucemias.

Durante muito tempo, utilizou-se a citogenética clássica para a identificação de anormalidades cromossômicas. Porém há casos em que os resultados obtidos não são confiáveis, devido às metáfases das células tumorais estarem presentes em número insuficiente ou mesmo inexistentes para a análise (Larramendy *et al.*, 1998), ou porque as alterações submicroscópicas não são identificadas por esse método (Harbot, 1998; Sainati *et al.*, 1997). Devido aos aperfeiçoamentos nas técnicas citogenéticas e ao

surgimento de técnicas como a hibridação *in situ* por fluorescência (Fish), reação em cadeia de polimerase (PCR) e *southern blot* tornou-se possível à localização precisa dos pontos de ruptura, distinguindo quebras que envolvem diferentes genes e implicações terapêuticas (Cox *et al.*, 1998).

Na LMC Filadélfia positiva (Ph⁺), os *breakpoints* no cromossomo 22 ocorrem quase que invariavelmente em uma região restrita do gene *Bcr* chamada M-bcr (*major breakpoint cluster region*). Esta área contém 4 éxons que são numerados de 1 a 4, e um quinto éxon imediatamente à região 3'. Uma vez que o *breakpoint* pode ocorrer nos íntrons separando os éxons 2 do 3, ou 3 do 4, dois tipos diferentes de junção *Bcr-Abl* podem ser encontrados. No primeiro, o éxon 2 do *Bcr* é ligado ao éxon 2 do *Abl* (b2a2), enquanto que no segundo o éxon 3 do *Bcr* une-se ao éxon 2 *Abl* (b3a2). Os RNAs mensageiros diferem entre si pela presença de seqüências do éxon 3 (75pb) e as proteínas correspondentes por 25 aminoácidos (Saglio *et al.*, 1990).

As leucemias cromossomo Filadélfia positivas, com a translocação *Bcr-Abl*, apresentam um mau prognóstico. A identificação de pacientes Ph-positivos é de vital importância, uma vez que somente procedimentos terapêuticos agressivos, como o transplante de medula óssea, podem resultar numa sobrevida livre da doença a longo prazo. Métodos diagnósticos de rotina, como *Southern Blot* e análise citogenética, podem levar a resultados falso-negativos. A análise através de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase é considerada a ferramenta mais sensível para a detecção da translocação *Bcr-Abl* (Cox *et al.*, 1998).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela liberação de células prematuras da medula e intenso acúmulo de células mielóides maduras e imaturas no sangue, no baço e na medula, tendo como causa a translocação t(9;22)(q34;q11)

designada como cromossomo Filadélfia, o qual constitui o marcador citogenético da leucemia mielóide crônica. Esta translocação origina um gene quimérico o qual codifica uma oncoproteína *Bcr-Abl*, que possui atividade desregulada da tirosina quinase.

Amostras de sangue periférico de pacientes com leucemia mielóide crônica (22) foram analisadas quanto à expressão do RNA mensageiro *Bcr-Abl* (Figura 5).

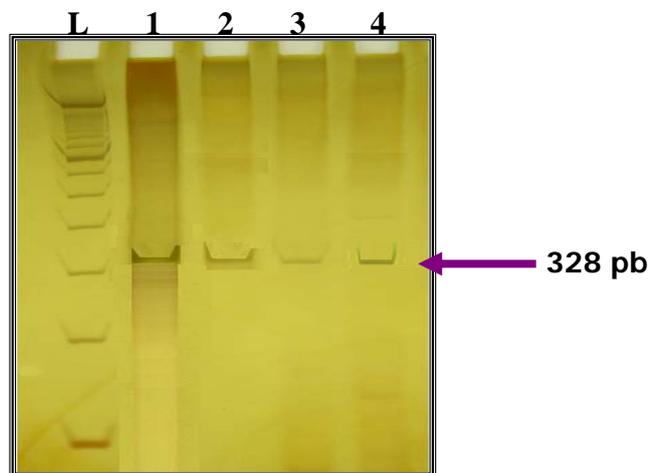


Figura 5 Expressão do RNAm *Bcr-Abl* em pacientes com LMC. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corado por prata. O produto amplificado a partir do RNA é correspondente ao transcrito b3a2 (328pb). L – ladder; 1–4 amostras positivas *Bcr-Abl* (b3a2).

O cromossomo Filadélfia característico da leucemia mielóide crônica pode ser também observado em LLA. Em LMC é encontrado em aproximadamente 95% das células da medula de pacientes. Entre os pacientes com LLA, a frequência é estimada em 3% a 5% em crianças e, aproximadamente, 15% a 25% em adultos (Biernaux *et al.*, 1995).

Apesar dos pacientes do presente estudo estarem sendo submetidos à quimioterapia por mais de um ano, 4 pacientes apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* no sangue periférico.

Várias formas do oncogene *Bcr-Abl* responsáveis pela patogênese das leucemias humanas Filadélfia positivas são geradas por esta translocação. Os locais onde ocorrem os *breakpoints* e segmentos específicos do gene *Bcr* que permanecem intactos após a translocação determinam as formas do oncogene *Bcr-Abl* (Telegeev *et al.*, 2004).

Os principais tipos de junções *Bcr-Abl* são: a p210, encontrada na maioria dos casos de LMC e em 50% dos casos de LLA; a p185, encontrada principalmente em pacientes com LLA; e a p230, encontrada na leucemia neutrofílica crônica (LNC) (Telegeev *et al.*, 2004).

Dois tipos de transcritos diferentes podem dar origem a p210: b2a2 e b3a2. A diferença consiste na ausência ou presença do éxon b3, respectivamente. Embora nenhuma alteração funcional seja induzida por estes transcritos, alguns estudos têm questionado o papel do éxon b3 na patogênese da LMC (Meissner *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1991a; Mills *et al.*, 1991b).

Cervantes *et al.* (1996) num estudo com 84 pacientes espanhóis com LMC, fase crônica, observaram uma síndrome semelhante à trombocitemia essencial em 6 casos, onde 83,3% (5/6) expressavam o transcrito b3a2 e destes, 2 apresentavam basofilia.

Embora vários estudos tenham identificado diferentes elementos e caracterizado as vias de sinalização desreguladas pelo *Bcr-Abl*, o mecanismo exato de ativação destas vias e o papel específico de cada uma na leucemogênese ainda não foi elucidado (Melo *et al.*, 2003).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa causada pelo oncogene *Bcr-Abl*. Este gene híbrido é responsável por desregular funções celulares, inativando e ativando inúmeras vias de sinalização intracelulares, responsáveis pelo controle da proliferação e morte celular, além de promover defeitos nos elementos de adesão celular (Melo *et al.*, 2003).

A próxima etapa do nosso trabalho foi investigar a concentração de NO, indiretamente através da dosagem de nitritos no plasma do sangue periférico.

A detecção do NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da ínfima concentração e da meia vida extremamente curta deste composto, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (Archers, 1993; Kiechle, e Marlinski, 1993). Diversos métodos utilizando várias tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente. No presente trabalho foi utilizado a determinação indireta por dosagem plasmática de nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio).

Numerosas evidências sugerem que outros fatores participem da fisiopatologia do processo crônico na LMC. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) pode ser um fator que favoreça a inibição da adesão leucocitária (Archers, 1993). Nesse contexto, foi avaliada a concentração do óxido nítrico no plasma (Figura 6).

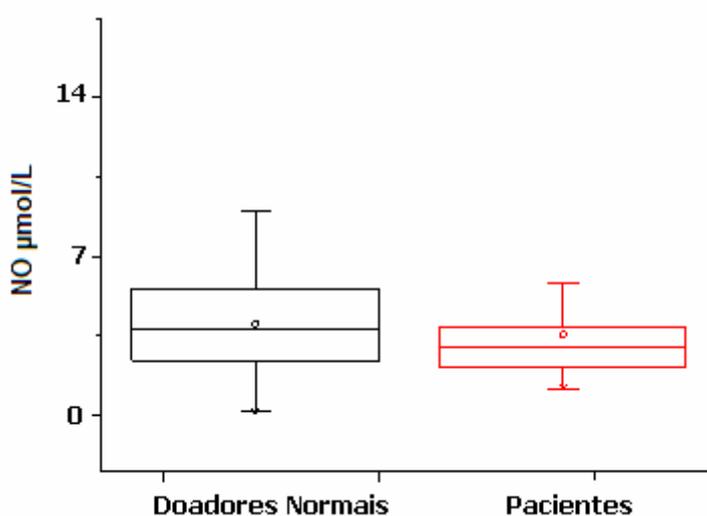


Figura 6. Análise de Nitrito no sangue periférico ($\mu\text{mol/L}$ de plasma) ($p > 0,005$).

A presença de óxido nítrico no sangue periférico foi medida indiretamente como concentração de nitrito no plasma. A média de valores foi de $4,02 (\pm 2,19 \mu\text{mol/L})$ no grupo controle e $3,5 (\pm 2,56 \mu\text{mol/L})$ no grupo de LMC.

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, que tem a função de mensageiros intercelulares, as quais carregam sinais regulatórios de célula para célula. São produzidas por vários tipos celulares e estão presentes principalmente em processos inflamatórios, onde a presença de leucócitos é essencial na resposta do hospedeiro durante o processo infeccioso. Quatro famílias de quimiocinas foram descritas baseadas na posição relativa dos resíduos conservados de cisteína: CC, CXC, XC, e CX₃C, sendo as famílias CC (beta-quimiocinas, onde os dois primeiros resíduos de cisteína são adjacentes) e CXC (alfa-quimiocinas, que apresentam um aminoácido separando os dois primeiros resíduos de cisteína) (Singh *et al.*, 2007; Kakinuma e Hwang, 2006).

Receptores de quimiocinas desempenham inúmeros papéis no desenvolvimento da metástase, sendo possível facilitar potencialmente a disseminação tumoral em cada um dos passos chave do processo, incluindo aderência das células tumorais ao endotélio, extravasamento para os vasos sanguíneos, colonização metastática, angiogênese, proliferação e proteção contra resposta do hospedeiro. Após crescimento inicial de tumores primários células malignas invadem os vasos sanguíneos, e as células tumorais circulantes podem ficar presas em vasos menores devido ao seu tamanho, bem como por eventos mais específicos mediados por receptores migrando então para tecidos distantes (Singh *et al.*, 2007; Kakinuma e Hwang, 2006).

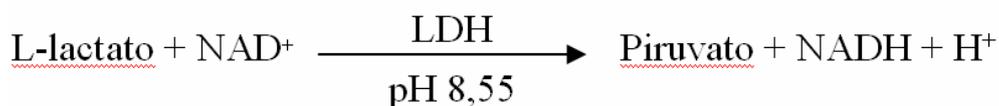
O receptor de quimiocina CXCR4 retém os progenitores hematopoiéticos e células leucêmicas no microambiente da medula óssea. Spoo *et al.* (2006) tem proposto que CXCR4 deve ser incorporado como marcador prognóstico na leucemia mieloide aguda.

Considerado um segundo mensageiro intracelular, o NO apresenta implicações no controle da maquinaria transcricional e expressão gênica. Zhang *et al.* (2007) demonstraram que a expressão de CXCR4 na superfície celular das células CD34⁺ foi

aumentada de maneira dose e tempo dependente em resposta ao NO. A expressão aumentada de CXCR4 na superfície celular foi correlacionada com aumento do nível de RNAm para CXCR4, devido a uma sinalização direta do NO sobre a transcrição de CXCR4. Estes autores demonstraram que a via NO pode modular a expressão de CXCR4 em células CD34⁺ humana e sugere que o NO pode desempenhar um papel crítico no tráfego de progenitores hematopoiéticos. Neste presente trabalho, não houve diferença entre os valores de nitritos no plasma entre pacientes e doadores normais.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima constituída de cinco diferentes isoenzimas que catalisam a interconversão de L-lactato a piruvato. A LDH esta presente no citoplasma de todos os tecidos humanos e em altas concentrações no coração e músculo esquelético e em baixas concentrações nos eritrócitos, pâncreas e estômago. A elevação da atividade da LDH é encontrada em várias condições patológicas como o infarto do miocárdio, câncer e doenças do fígado, sangue ou músculos. Portanto, a próxima etapa deste trabalho foi verificar a concentração de LDH no plasma dos pacientes e comparar com os indivíduos normais.

O método LDH mede a oxidação do L-lactato para piruvato, com a redução simultânea de nicotinamida adenina dinucleotída (NAD). A variação de absorbância a 340nm causada pelo aparecimento de NAD reduzida (NADH) é diretamente proporcional à atividade de LDH, uma vez que outros reagentes estão presentes, em quantidades não limitantes. Nesta técnica é utilizada uma leitura bicromática (340, 383 nm).



Para a análise de LDH foram utilizados amostras de sangue periférico coletadas com anticoagulante heparina. Não foram coletadas amostras com EDTA, fluoreto de sódio ou oxalato de potássio que são substâncias conhecidas como interferentes na reação da LDH. Os valores de referência a 37°C podem variar de 100 a 190 U/L, e a população de referência foi constituída de 118 homens e 108 mulheres com idades compreendidas entre 20-65 anos (Henry *et al.*, 1974).

Zhelyazkova *et al.* (2008) através de análise da angiogênese em pacientes com leucemia mielóide crônica verificaram que o fator de crescimento de hepatócito plasmático (*hepatocyte growth factor* - HGF) e a densidade de microvasos foram independentes em relação aos parâmetros prognósticos em relação a sobrevida de pacientes. O HGF plasmático mostrava correlação com todos os marcadores que refletem o volume de tumor (leucócitos, porcentagem de rajada, esplenomegalia e LDH) bem como com a fase de LMC e sobrevivência dos pacientes.

Neste contexto, verificamos a concentração de LDH no plasma de pacientes com LMC (Figura 7)

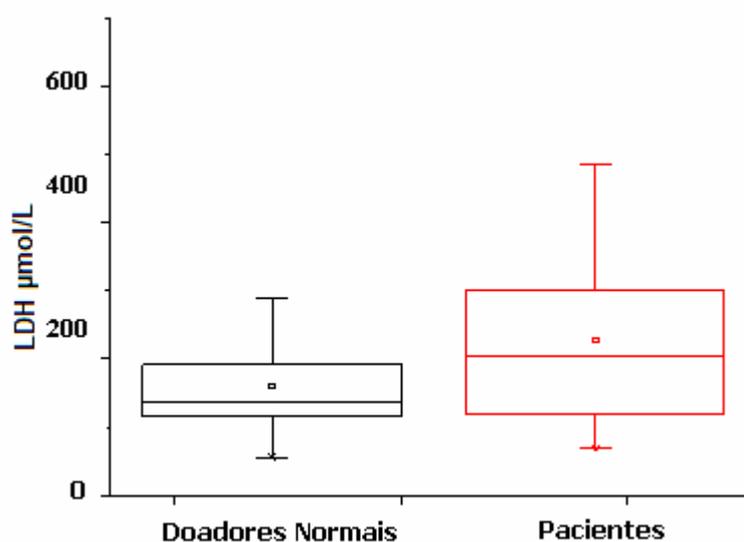


Figura 7. Análise da concentração de LDH no sangue periférico. O ensaio foi analisado através de espectrofotômetro Dimension XL[®] com comprimento de onda 340 nm a 37 °C., com tipo de leitura bicromática. ($p < 0,05$).

Devido a inúmeras interações possíveis entre as células progenitoras hematopoiéticas e o microambiente hematopoiético, a aquisição de um clone leucêmico pode apresentar inúmeros efeitos nestas relações e influenciar as características clínicas da leucemia (Hehlmann et al., 2007).

O diagnóstico da LMC é geralmente realizado na fase crônica com base no aumento do número de leucócitos circulantes, diminuição da atividade da fosfatase alcalina leucocitária, detecção do cromossomo Filadélfia e do oncogene *Bcr-Abl* (Melo et al., 2003; Sawyers, 2004). Embora Morrison et al (1994) verificaram que são comumente encontrados níveis baixos de desidrogenase láctica sérica, ácido úrico, e níveis de vitamina B12, nosso trabalho mostra valores mais elevados de LDH em pacientes com LMC quando comparado com indivíduos normais.

Juriscic et al. (2008) relataram um caso atípico de transformação leucêmica em mielofibrose e verificaram níveis extremos de TNF- α acompanhados por uma elevada atividade de LDH sérico que pode ser a razão das lesões ósseas líticas, indicando alta remodelação óssea.

Baseados em análises retrospectivas de pacientes com LMC, Germing et al. (1999) compararam os aspectos clínicos e hematológicos das desordens mieloproliferativas e avaliaram o curso natural da doença com fatores prognósticos. Foi verificado que pacientes com desordens mieloproliferativas e leucemia mielomonocítica crônica apresentavam elevados níveis de LDH. Neste contexto, vale ressaltar que dos 4 pacientes que apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* (b3a2) no sangue periférico, embora sem alteração a nível de NO, dois pacientes apresentaram os maiores valores de LDH (486 U/L e 589 U/L). Estes pacientes estavam submetidos ao tratamento por mais de 1 ano. Embora o estudo tenha sido realizado com pequeno

número de amostras, pode-se sugerir uma alteração de terapia para os dois pacientes que apresentaram o transcrito b3a2 e concentração elevada de LDH a fim de se obter um melhor prognóstico para a doença.

5. CONCLUSÃO

- ✓ A maior parte dos pacientes apresentou de 20 a 60 anos de idade e os valores de média e mediana entre os grupos foram semelhantes. A média para o grupo controle foi de 53,39 (mediana=51,5) e 49,09 (mediana=45,5) para o grupo dos pacientes.
- ✓ No presente trabalho 55 % dos pacientes com LMC eram do sexo masculino.
- ✓ Após 1 ano de tratamento quatro pacientes apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* no sangue periférico.
- ✓ A concentração de NO não diferiu entre pacientes com LMC e indivíduos saudáveis.
- ✓ A concentração de LDH no plasma foi maior em pacientes com LMC.
- ✓ Vale ressaltar que dos 4 pacientes que apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* (b3a2) no sangue periférico, embora sem alteração a nível de NO, dois pacientes apresentaram os maiores valores de LDH (486 U/L e 589 U/L). Estes pacientes estavam submetidos ao tratamento por mais de 1 ano. Embora o estudo tenha sido realizado com pequeno número de amostras, pode-se supor que a terapia para os dois pacientes que apresentaram o transcrito b3a2 e concentração elevada de LDH poderia ser alterada a fim de se obter um melhor prognóstico para a doença.
- ✓ Pode-se concluir que os 2 pacientes que apresentaram o transcrito *Bcr-Abl* no sangue periférico com elevada concentração de LDH, não respondem adequadamente à quimioterapia, e que o NO não está associado ao aumento de LDH talvez devido ao número reduzido de pacientes com LMC. Embora não significante, houve tendência de diminuição da concentração de NO nos pacientes com LMC.

6. REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª edição, Porto Alegre. Artes Médicas, cap.24, p.1255-1291, 1997.

Archers S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.*, 7: 349-60, 1993.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, 271: C1424-37, 1996.

Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, Hasford J, Heimpel H, Hossfeld DK, Kolb HJ, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Hehlmann R; German CML. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia*, 9(6):984-989, 2005.

Bianchi C, Cairoli R, Marengo P, Muti G, Del Monte U, Perego RA. Detection by polymerase chain reaction of BCR/ABL transcripts in myeloproliferative diseases at time of diagnosis and for monitoring chronic myelogenous leukaemia patients after bone marrow transplantation. *Eur J Cancer*, 31A:197-201, 1995.

Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*, 86(8):3118-3122, 1995.

Bolwell B, Kalaycio M, Sobecks R, Andresen S, Mcbee M, Kuczkowski L, Rybicki L, Pohlman B. Autologous hematopoietic cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: 100 month follow-up. *Bone Marrow Transplant*, 29:673-679, 2002.

Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Dual transcription of b2a2 and b3a2 BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia is confined to patients with a linked polymorphism within the BCR gene. *Br J Haematol*, 117:875-877, 2002.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9030-9033, 1989.

Burkitt MJ, Raafat A. Nitric oxide generation from hydroxyurea: significance and implications for leukemogenesis in the management of myeloproliferative disorders. *Blood*, 107(6):2219-2222, 2006.

Cervantes F, Colomer D, Vives-Corrons JL, Rozman C, Montserrat E. Chronic myeloid leukemia of thrombocytemic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features? *Leukemia*, 10(7): 1241-1243, 1996.

Colovic M, Jankovic G, Bila J, Djordjevic V, Wiernik PH, Inversion of chromosome 16 in accelerated phase of chronic myeloid leukemia: report of a case and review of the literature, *Med Oncol*, 15:199–201, 1998b.

Colovic M, Jankovic G, Suvajdzic N, Colovic R. Acute myeloid leukemia evolving from haemorrhagic essential thrombocythemia *Eur J Haematol*, 280: 61–62, 1998a.

Colovic M, Wiernik PH, Jankovic G, Vidovic A, Janosevic S, Basara NM, Circulation haematopoietic progenitor cells in primary and secondary myelofibrosis: relation to collagen and reticulin fibrosis, *Eur J Haematol*, 62:155–159, 1999.

Copelan EA, Penza SL, Pohlman B, Avalos BR, Goormastic M, Andresen SW, Kalaycio M, Bechtel TP, Scholl MD, Elder PJ, Ezzone SA, O'Donnell LC, Tighe MB, Risley GL, Young DC, Bolwell BJ. Autotransplantation following busulfan, etoposide and cyclophosphamide in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Mar Trans*, 25:1243–1248, 2000.

Cox MC, Maffei L, Buffolino S, Del Poeta G, Venditti A, Cantonetti M, Aronica G, Aquilina P, Masi M, Amadori S. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, and

cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. *Am J Clin Pathol*, 109(1):24-31, 1998.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*, 39:343-350, 2003.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med*, 131 (3): 207–219, 1999.

Fernandez-Luna JL. Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis*, 5: 315-318, 2000.

Furchgott RT, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 88: 373-376, 1980.

Gay RJ, McComb RB, Bowers GNJ. Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. *Clin Chem*, 14:740, 1968.

Germing U, Strupp C, Meckenstock G, Giagounidis A, Minning H, Aul C. Clinical course, morphology and prognosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Med Klin* 94(9):467-472, 1999.

Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi CL, Willman CL, Kantarjian HM Acute myeloid leukemia., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:73-110

Giller G, Singler K. Oxidative stress and living cells. *Fol. Microbiol.*, 40(2): 131-152, 1995.

Harbott J, Mancini M, Verellen-Dumoulin C, Moorman AV, Secker-Walker LM. Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*, 12(5):823-7, 1998

Hayhoe FGJ, Flemans, RJ. Atlas colorido de Citologia Hematológica. 3 edição, Editora Artes Médicas, 1995.

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370 (9584): 342–350, 2007.

Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Harper and Row, 828-829, 1974.

Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Camós M, Costa D, Rafel M, Montserrat E. Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in the elderly: presenting features, natural history and survival. *Med Clin (Barc)*, 112(15):565-567, 1999.

Hernandez JM, San Miguel JF, Gonzalez M, Orfao A, Canizo MC, Bascones CJ, Development of acute leukemia after idiopathic myelofibrosis, *J Clin Pathol*, 45:427–430, 1992.

Hoffbrand AV, Pettit JE. *Essential Haematology*. 3 ed, Blackwell Scientific Publications, 1993.

Inokuchi K, Inoue T, Tojo A, Futaki M, Miyake K, Yamada T, Tanabe Y, Ohki I, Dan K, Ozawa K. A possible correlation between the type of BCR/ABL hybrid messenger RNA and platelet count in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 78:3125–3127, 1991.

Iuga AO, Qureshi AA, Lerner EA. Nitric oxide is toxic to melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res*, 17(3):302-306, 2004.

James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev*, 59(4): 533-547, 1995.

Jorgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans*, 35(5):1347-51, 2007.

Jurisić V, Terzic T, Pavlovic S, Colovic N, Colović M. Elevated TNF-alpha and LDH without parathormone disturbance is associated with diffuse osteolytic lesions in leukemic transformation of myelofibrosis. *Pathol Res Pract*, 204(2):129-132, 2008.

Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol*, 79: 639-651, 2006.

Kalaycio M, Rybicki L, Pohlman B, Dean R, Sweetenham J, Andresen S, Sobecks R, Sekeres MA, Advani A, Brown S, Bolwell B. Elevated lactate dehydrogenase is an adverse predictor of outcome in HLA-matched sibling bone marrow transplant for acute myelogenous leukemia. *Bone Mar Trans*, 40(8):753-758, 2007.

Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, Keating MJ, Walters RS, Talpaz M, Hester JP, Bligham G, Gehan E, Freireich EJ. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*, 66(6):1326-1335, 1985.

Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 3: 23-25, 1977.

Kiechle FL, Marlinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Pathol*, 100: 567-575, 1993.

Knowles, R.G. Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 5159-62, 1989.

Larramendy ML, Siitonen SM, Zhu Y, Hurme M, Vilpo L, Vilpo JA, Knuutila S. Optimized mitogen stimulation induces proliferation of neoplastic B cells in chronic

lymphocytic leukemia: significance for cytogenetic analysis. The Tampere Chronic Lymphocytic Leukemia group. *Cytogenet Cell Genet*, 82(3-4):215-221, 1998.

Lassen UN, Osterlind K, Hirsch FR, Bergman B, Dombernowsky P, Hansen HH. Early death during chemotherapy in patients with small-cell lung cancer: derivation of a prognostic index for toxic death and progression. *Br J Cancer*, 79: 515–519, 1999.

Mehta J, Gordon LI, Tallman MS, Winter JN, Evens AO, Frankfurt O, Williams SF, Grinblatt D, Kaminer L, Meagher R, Singhal S. Does younger age affect the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies beneficially? *Bone Mar Trans*, 38: 95–100, 2006.

Meissner RV, Covas DT, Dias PMB, Job F, Leite M, Nardi N. Analysis of mRNA transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Gen Mol Biol*, 22(4):475-479, 1999.

Meissner RV, Covas DT, Dias PMB, Job F, Leite M, Nardi NB. A polymorphism in exon b2 of the major breakpoint cluster region (M-BCR) identified in chronic myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol*, 103:224–226, 1998.

Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic Myeloid Leukemia. *Hematology*, 132-152, 2003.

Menzin J, Lang K, Earle CC, Glendenning A. Treatment patterns, outcomes and costs among elderly patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based analysis. *Drugs Aging*, 21(11):737-746, 2004.

Millot F, Traore P, Guilhot J, Nelken B, Leblanc T, Leverger G, Plantaz D, Bertrand Y, Bordigoni P, Guilhot F. Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*, 116:140–143, 2005.

Mills KI, Benn P, Birnie GD. Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? *Blood*, 78:1151-1161, 1991a.

Mills KI, Sproul AM, Leibowitz D, Burnett AK. Mapping of breakpoints and relationship to BCR-ABL RNA expression in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with a breakpoint around exon 14 (b3) of the BCR gene. *Leukemia*, 5: 937-941, 1991b.

Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*, 37:2495-2501, 1988.

Morrison VA. Chronic leukemias. *CA Cancer J Clin*, 44: 353-377, 1994.

Navarro-Gonzalvez JÁ, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem*, 44:679-681, 1998.

Negrin RS. Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. Acessado em 13 de novembro de 2000, <http://www.uptodate.com>.

Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective *J Clin Invest*, 117 (8): 2033–2035, 2007.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.

Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R. Chronic Myelogenous Leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124:643-660, 1998.

Perego RA, Costantini M, Cornacchini G, Gargantini L, Bianchi C, Pungolino E, Roviada E, Morra E. The possible influence of b2a2 and b3a2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. *Eur. J. Cancer*, 36:1395–1401, 2000.

Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.*, 106: 1229-1234, 1998.

Russo C, Carol A, Kohler S, Borowitz M, Amylon M, Homans A, Kedar A, Shuster J, Land V, Crist W, Pullen J, Link M. Philadelphia chromosome and monosomy 7 in childhood acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study. *Blood*, 77:1050-1056, 1991.

Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege-Cambrin G, Mazza U, Gavosto F. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 76(9):1819-1824, 1990.

Saglio G, Pane F, Gottardi E, Frigeri F, Buonaiuto MR, Guerrasio A, De Micheli D, Parziale A, Martinelli G, Salvatore F. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190 bcr/abl transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood*, 87:1075-1080, 1996.

Sainati L, Leszl A, Putti M, Pasquali F, Maserati E, Donti E, Venti G, Simi P, Giuliani C, Angioni A, Stella M, Montaldi A, Sessarego M, ZanESCO L, Biondi A, Basso. Centralized cytogenetic analysis of pediatric acute leukemia: results of an Italian collaborative experience. *Haematol*; 82(6):654-9, 1997.

Salgia R, Quackenbush E, Lin J, Souchkova N, Satter M, Ewaniuk DS, Klucher KM, Delay GQ, Kraeft SK, Sackstein R, Alyea III EP, Von Adrian UH, Chen LB, Ramos JCG, Pendergast AM, Griffin JD. The BCR/ABL oncogene alters the chemokine response to stromal derived factor-1 alpha. *Blood*, 94:4233-4246, 1999.

Sandberg AA. The chromosomes in human leukemia. *Semin Hematol*, 23:201-217, 1986.

Saussele S, Weisser A, Muller MC, Emig M, La Rosée P, Paschka P, Kuhn C, Willer A, Hehlmann R, Hochhaus A. Frequent polymorphism in BCR exon b2 identified in BCR/ABL positive and negative individuals using fluorescent hybridization probes. *Leukemia*, 14:2006–10, 2000. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature*, 432 (7015): 294-297, 2004.

Sawyers CL. Chronic myeloid leukaemia. *N Engl J Med*, 340:1330–1340, 1999.

Schmidt HHHW, Walter U. NO at work. *Cell*, 78: 919-25, 1994.

Schultz K, Schultz K, Schultz G. Sodium nitroprussiate and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferent. *Nature*, 265: 750-1, 1977.

Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Met Rev*, 26(3-4):453-467, 2007.

Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*, 266(5):68-71, 1992.

Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia F, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haïoun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*, 104:1258–1265, 2004.

Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG, Burger JA. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109(2):786-791, 2007.

Talegeev GD, Dubrovskaya AN, Dybkov MV, Maliuta SS. Influence of Bcr/Abl fusion proteins on the course of Ph leukemias. *Acta Biochim Pol*, 3, 51: 845-849, 2004.

Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, 99(6):1928-1937, 2002.

Teng CL, Young JH, Hsu SL, Chou G, Kuo IT, Yu CY, Hwang GY. Lactate dehydrogenase, not vascular endothelial growth factor or basic fibroblast growth factor, positively correlates to bone marrow vascularity in acute myeloid leukemia. *J Chin Med Assoc*, 69(11):534-537, 2006.

von Eyben FE, Blaabjerg O, Hyltoft-Petersen P, Madsen EL, Amato R, Liu F. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and prediction of death in patients with metastatic testicular germ cell tumors. *Clin Chem Lab Med*, 39: 38-44, 2001.

Wacker WEC, Ulmer DD, Vallee BL. Metalloenzymes and myocardial infarction: II Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum, *N Engl J Med*, 255:449, 1956.

Wimazal F, Sperr WR, Kundi M, Vales A, Fonatsch C, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzingler I, Valent P. Prognostic significance of serial determinations of lactate dehydrogenase (LDH) in the follow-up of patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Oncol*, 19(5):970-976, 2008.

Zhang Y, Wittner M, Bouamar H, Jarrier P, Vainchenker W, Louache F. Identification of CXCR4 as a new nitric oxide-regulated gene in human CD34+ cells. *Stem Cells*, 25(1):211-219, 2007.

Zhelyazkova AG, Tonchev AB, Kolova P, Ivanova L, Gercheva L. Prognostic significance of hepatocyte growth factor and microvessel bone marrow density in patients with chronic myeloid leukaemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 68(6):492-500, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)