



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

THAYNA NOGUEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA GENOTOXICIDADE EM
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS AUTÓLOGO.**

FORTALEZA

2014

THAYNA NOGUEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA GENOTOXICIDADE EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTIAS
AUTÓLOGO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Hematologia.

Orientador: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves.

FORTALEZA

2014

THAYNA NOGUEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA GENOTOXICIDADE EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Hematologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.a. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Maria da Silva Pitombeira
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE)

Prof. Expedito Rogildo Cordeiro Carlos
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À Deus.

À minha mãe e ao meu irmão, Marilza e Rogério.

AGRADECIMENTOS

À Deus por dar-me o dom da vida e por iluminar meus caminhos, dando-me saúde, paciência e sabedoria.

Ao meu pai, Francisco Assis dos Santos, que investiu na minha educação.

À minha mãe, Maria Marilza Nogueira que muitas vezes sacrificou seus sonhos para que os meus fossem realizados, que tudo fez pela minha formação pessoal e profissional e que me ensinou os mais estimados valores, com muito amor e carinho.

Ao meu querido irmão, Rogério Nogueira Pinheiro, exemplo de integridade e honestidade e a quem sempre tive orgulho e admiração.

Ao meu namorado, Felipe Magalhães Barbosa, por todo carinho e paciência.

À minha orientadora, Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, pela confiança em mim depositada, por seus ensinamentos constantes, por sua dedicação, pelas ações contínuas em busca de nos estimular a desenvolver os trabalhos em grupo com harmonia e organização e, acima de tudo, pela amizade e compreensão.

Ao Doutor Fernando Barroso Duarte, coordenador da Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC), que consentiu a coleta de amostras e análise de prontuários dos pacientes submetidos ao Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) autólogo no HUWC.

À toda equipe médica do TCTH, em especial ao Dr. Germison Silva Lopes, e às enfermeiras e auxiliares da unidade de internação para o transplante, em especial à enfermeira Franciclea Oliveira Costa, por seus ensinamentos e colaboração na realização da dissertação.

Aos funcionários do setor de coleta do HEMOCE, pelo apoio na coleta de material necessário ao estudo.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias e de Genética das Doenças Hematológicas da UFC, ao Pedro Aurio Maia Filho, a quem gosto como irmão e agradeço principalmente pela paciência, à Maritza Cavalcante Barbosa, que sempre ajuda a todos com a maior simplicidade e que levo a amizade para a vida inteira, à Talyta Ellen de Jesus dos Santos, por seus ensinamentos não somente terrenos, à Luana Letícia Alves Dutra, pelo companheirismo e amizade, à Marília Laurentino Rocha, pelos melhores conselhos e dicas de moda, ao Mauriclécio Franco Ponte Ponte, pela parceria nos anos de mestrado.

Aos meus colegas do curso de Mestrado que foram companheiros desde o início, principalmente Leonardo Arruda e Kelly Roveran Genga, que tem sido anjos enviados por Deus.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho e para minha formação profissional e científica.

RESUMO

O Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) autólogo é um método terapêutico no qual as células progenitoras são coletadas do próprio indivíduo a partir do sangue periférico para restabelecer sua função medular. O estudo é do tipo longitudinal prospectivo com a finalidade de investigar o perfil oxidativo e a genotoxicidade em pacientes adultos submetidos a TCTH autólogo, portadores de Mieloma múltiplo, Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin e em indivíduos considerados saudáveis, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2013. Foram coletadas amostras de sangue heparinizado e com EDTA de 37 pacientes, antes do Regime de Condicionamento (RC), 24 horas após o RC (D -1), 1 dia (D +1), 10 dias (D +10) e 20 (D +20) dias após o TCTH e de 30 indivíduos aparentemente saudáveis. Foram analisados os parâmetros de estresse oxidativo: MDA (malonaldeído), óxido nítrico (NO), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) e a genotoxicidade, dada pelo Índice de Dano (ID) ao DNA. As concentrações de MDA apresentaram-se significativamente elevadas em todos os grupos de pacientes em relação ao grupo controle em todas as etapas do TCTH. Houve diferença estatística na concentração de óxido nítrico entre pacientes e controles e entre os pacientes. A concentração da enzima catalase apresentou-se significativamente diminuída no momento D -1 em relação ao Pré-RC nos grupos de pacientes, sendo recuperada em D +20 nos pacientes com MM e LH, e em D +10 nos pacientes com LNH, em relação a D -1. A concentração da glutatona peroxidase não diferiu significativamente nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle e nem entre os grupos de pacientes. A concentração da SOD apresentou-se significativamente reduzida no Pré-RC em pacientes com MM em relação ao grupo controle. Em D -1, houve redução significativa para todos os pacientes. O índice de dano ao DNA foi significativamente maior ($p < 0,05$) no Pré- RC nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle. Em D -1 houve aumento significativo em relação a todos os outros momentos analisados e em relação ao grupo controle. Os marcadores do estresse oxidativo e de genotoxicidade podem ser utilizados como biomarcadores precoces de toxicidade auxiliando no monitoramento da evolução e no prognóstico do paciente.

Palavras-chave: Transplante de Medula óssea. Estresse Oxidativo. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is an autologous therapeutic method in which the stem cells are collected from the individual's own peripheral blood to restore spinal cord function. This is a prospective longitudinal study aimed to investigate the genotoxicity and oxidative profile in adult patients with multiple myeloma, Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma undergoing autologous HSCT and in apparently healthy individuals, from January 2013 to December 2013. Samples of heparinized and EDTA blood of 37 patients before the conditioning regimen (CR), were collected 24 hours after CR (D -1) , 1 day (D +1) , 10 days (D +10) and 20 (D +20) days after HSCT and from 30 apparently healthy individuals. Oxidative stress parameters were analyzed: MDA (malondialdehyde), nitric oxide (NO), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) as well as genotoxicity, given by the Damage Index (DI) to DNA. MDA concentrations were significantly elevated in all groups of patients when compared to the control group at all stages of HSCT. There was statistical difference in nitric oxide concentrations between patients and controls and among patients. The concentration of catalase was significantly reduced at D-1 when compared to the pre-CR in the groups of patients, having recovered at D +20 in patients with MM and LH and at D+10 in patients with LNH in relation to D-1. The concentration of glutathione peroxidase did not differ significantly in the groups of patients in the control group and between both groups of patients. The concentration of SOD was significantly reduced in the pre-CR in MM patients compared to the control group. There was a significant reduction for all patients at D-1. The rate of DNA damage was statistically higher ($p<0.05$) in the pre-CR in the patient groups compared to the control group. D-1 significantly increased compared to all other times and when analyzed in relation to the control group. Markers of oxidative stress and genotoxicity can be used as early biomarkers of toxicity assisting in the monitoring of patient progression and prognosis.

Keywords: Bone Marrow Transplantation. Oxidative Stress. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Momentos analisados durante o período de acompanhamento dos pacientes.....	33
Figura 2 - Ensaio do Cometa.....	38
Figura 3- Concentrações de MDA nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.....	42
Figura 4- Concentrações de nitrito nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.	44
Figura 5- Concentração de catalase nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.....	46
Figura 6- Concentração de GPx nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.	48
Figura 7- Atividade de SOD nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.....	50
Figura 8- Valores de ID nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.	52
Figura 9- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.....	53
Figura 10- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.....	54
Figura 11- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.....	55
Figura 12- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Nitrito para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.....	56
Figura 13 - Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Nitrito para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.....	57
Figura 14- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Nitrito para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.....	58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 15- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.....	59
Figura 16- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.....	60
Figura 17- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.....	61
Figura 18- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.....	62
Figura 19- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.....	63
Figura 20- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.....	64
Figura 21- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutaciona Peroxidase para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.....	65
Figura 22- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutaciona Peroxidase para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.....	66
Figura 23- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutaciona Peroxidase para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.....	67

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais regimes de condicionamento pré-transplante de medula óssea.....	20
Quadro 2 - Classificação e nomenclatura das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.	22
Quadro 3- Regimes de condicionamento padronizados para TCTH autólogo nos pacientes em estudo de acordo com a Instituição (HUWC).	34
Tabela 1- Distribuição dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com características demográficas.	40
Tabela 2- Concentrações basais de MDA em relação à doença de base.....	41
Tabela 3- Concentrações de MDA nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.....	42
Tabela 4- Concentração de nitrito nas doenças em relação à doença de base.....	43
Tabela 5- Concentrações de nitrito nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.....	43
Tabela 6- Atividade basal de catalase em relação à doença de base.	45
Tabela 7- Atividade de catalase nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.....	45
Tabela 8- Concentração basal de GPx em relação a doença de base.	47
Tabela 9- Concentração de GPx nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.	47
Tabela 10- Atividade basal de SOD em relação à doença de base.	49
Tabela 11- Atividade de SOD nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.	50
Tabela 12- Índice de dano em relação a doença de base.....	51
Tabela 13- Valores de ID nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG	Anemia Aplástica Grave
CAT	Catalase
CPH	Células Progenitoras Hematopoéticas
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
Gy	Grays
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
ICT	Irradiação Corporal Total
ID	Índice de Dano
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não Hodgkin
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MDA	Malonaldeído
MPO	Mieloperoxidase
MM	Mieloma Múltiplo
NADPH	Nucleotideo Adenosina Difosfato
PL	Peroxidação Lipídica
RC	Regime de Condicionamento
RL	Radicais Livres
SCU	Sangue de Cordão Umbilical

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SOD	Superóxido Dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoéticas
TMO	Transplante de Medula Óssea
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas	15
<i>1.1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas Autólogo</i>	16
<i>1.1.2 Fontes de células</i>	16
<i>1.1.3 Coleta de células progenitoras hematopoéticas (stem cells)</i>	17
<i>1.1.4 Criopreservação</i>	18
<i>1.1.5 Condicionamento pré-transplante</i>	19
<i>1.1.6 Infusão das células progenitoras hematopoéticas</i>	20
<i>1.1.7 Aplasia da medula óssea e enxertia do TCTH</i>	21
1.2 Estresse Oxidativo	21
<i>1.2.1 Radicais livres</i>	21
<i>1.2.2 Peroxidação Lipídica</i>	23
<i>1.2.3 Óxido Nítrico</i>	24
<i>1.2.4 Antioxidantes</i>	25
1.2.3.1 Defesa antioxidante enzimática: Catalase (CAT).....	25
1.2.3.2 Defesa antioxidante enzimática: Glutathione Peroxidase (GPx).....	26
1.2.3.3 Defesa antioxidante enzimática: Superóxido Dismutase (SOD).....	26
1.3 Dano oxidativo do DNA- Genotoxicidade	27
1.4 Estresse Oxidativo e Genotoxicidade no Transplante Autólogo de Células Tronco Hematopoéticas	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 Desenho do estudo	30
3.2 Casuística	31
3.3 Local de estudo	32
3.4 Coleta das Amostras biológicas	32
3.5 Protocolo do Transplante de Células Tronco Hematopoéticas Autólogo	33

SUMÁRIO

3.6	Obtenção do plasma	34
3.7	Obtenção do hemolisado	34
3.8	Testes Realizados	34
3.8.1	<i>Perfil oxidativo</i>	35
3.8.2	<i>Análise de dano do DNA - Ensaio do cometa</i>	36
3.9	Descarte do material biológico	39
3.10	Análise Estatística	39
3.11	Comitê de ética	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Características dos pacientes	40
4.2	Perfil oxidativo	40
4.2.1	<i>Concentrações de Malonaldeído- MDA</i>	40
4.2.2	<i>Concentração do Nitrito</i>	43
4.2.3	<i>Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT)</i>	44
4.2.4	<i>Atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx)</i>	46
4.2.5	<i>Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)</i>	48
4.3	Avaliação do Índice de Dano no DNA	51
4.4	Correlações entre Índice de Dano ao DNA e marcadores de estresse oxidativo	53
5	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A	83
	APÊNDICE B	84
	APÊNDICE C	85
	APÊNDICE D	86
	ANEXO A	87
	ANEXO B	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

O Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) ou Transplante de Medula Óssea (TMO) é um método terapêutico utilizado em várias doenças imunológicas, hematológicas e genéticas, com a finalidade de restabelecer a função medular danificada ou defeituosa, através da infusão intravenosa de células progenitoras ou células tronco (*stem cells*) hematopoéticas (ARMITAGE, 1994).

Embora haja relatos da origem desse procedimento para o final do século passado, quando pacientes receberam medula óssea por via oral para o tratamento de doenças hematológicas, a primeira evidência de infusão intravenosa de medula óssea data de 1939 de um paciente portador de aplasia de medular (OSGOOD; RIDDLE; MATHEWS, 1939). Porém o início do desenvolvimento das bases científicas atuais do TMO ocorreu através de experiências com roedores que, após serem submetidos a radiação em doses letais, sobreviviam ao receber infusão intravenosa de medula óssea (LORENZ *et al.*, 1951). Experimentos com cães foram realizados durante as décadas de 50 e 60, quando os animais recebiam doses mieloablativas de irradiação corporal total, seguidas da infusão da medula (THOMAS *et al.*, 1962; EPSTEIN; BRYANT; THOMAS, 1967). Os estudos com cães foram o principal modelo para o desenvolvimento do TMO em humanos. A identificação e compreensão do sistema de histocompatibilidade humano também contribuíram de forma decisiva para o sucesso dos transplantes (DAUSSET, 1958). Em 1968, foram realizados três TMO em crianças portadoras de imunodeficiência, de doadores aparentados com tipagem HLA compatível ao do receptor, porém essas não realizaram a fase de condicionamento prévio ao transplante (BACH *et al.*, 1968; GATTI; MEUWISSEN; ALLEN, 1968; GOOD *et al.*, 1969). Em 1969, Thomas e colaboradores realizaram o primeiro TMO alogênico, em Seattle - EUA, em um paciente portador de leucemia aguda, que recebeu elevadas doses de irradiação corporal total, seguido da infusão da medula óssea de doador aparentado, procedimento validado e utilizado ainda na atualidade (THOMAS *et al.*, 1975).

Existem três tipos de TMO: transplante alogênico, em que o paciente recebe a medula óssea de um doador, que pode ser aparentado ou não; transplante singênico, em que o doador é um irmão gêmeo idêntico, sendo a modalidade mais rara de transplante devido à baixa frequência de gêmeos idênticos na população; transplante autólogo ou autogênico, que utiliza as células do próprio paciente coletadas previamente (AZEVEDO; RIBEIRO, 2000).

1.1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoéticas Autólogo

O TCTH autólogo envolve a utilização de células progenitoras hematopoéticas do próprio paciente para restabelecer a função medular após a administração de elevadas doses de quimioterapia. As células tronco hematopoéticas que serão reinfundidas podem ser provenientes da medula óssea (TMO ou TCTH) ou de sangue periférico (TCTH), após mobilização das células tronco da medula óssea do paciente (ARMITAGE, 1994).

O principal desafio do TCTH autólogo é garantir que o enxerto não contenha células tumorais da doença de base. Vários métodos, incluindo o tratamento *in vitro* com agentes quimioterapêuticos ou anticorpos monoclonais associados ao complemento, têm sido desenvolvidos com o propósito de eliminar possíveis células tumorais no enxerto ou para concentrar as células tronco hematopoéticas, processo denominado de "seleção positiva" (CHANG *et al.*, 1986; ATZPODIEN *et al.*, 1987; GORIN *et al.*, 1990; GRIBBEN *et al.*, 1991; MORECKI; MARGEL; SLAVIN, 1988; ROY *et al.*, 1991; SHPALL *et al.*, 1992).

Existem evidências de que o TCTH autólogo seja eficaz no tratamento de linfoma de Hodgkin em segunda remissão; linfoma não Hodgkin em segunda remissão; Mieloma Múltiplo; neuroblastoma avançado (IV); sarcoma de Ewing em segunda remissão, onde tenha havido uma ressecção completa do tumor; Leucemia Mielóide Aguda; tumor de Wilms em segunda remissão; tumor de células germinativas em segunda remissão; meduloblastoma de alto risco ou em segunda remissão (RAMSAY *et al.*, 1982; MITSUYASU *et al.*, 1986; STORB *et al.*, 1986; JIN *et al.*, 1987; STORB *et al.*, 1989; MARTIN *et al.*, 1990; VOSE *et al.*, 1993; VERDEGUER *et al.*, 2000).

O transplante autólogo, quando comparado ao alogênico, promove uma rápida e durável reconstituição hematopoética, além de reduzir o número de transfusões, episódios febris, uso de antibióticos e frequências de internações e o risco de doença enxerto-versus-hospedeiro (SCHMITZ *et al.*, 1996; BYRNE; RUSSEL, 1998). No entanto, a elevada incidência de recaída em consequência da reinfusão de células tumorais permanece sendo um dos maiores desafios do procedimento do TCTH autólogo (DEVETTEN; ARMITAGE, 2007).

1.1.2 Fontes de células

As células progenitoras hematopoéticas podem ser coletadas diretamente da crista ilíaca; do sangue periférico, através de máquinas de aférese; ou mais recentemente do Sangue

de Cordão Umbilical (SCU). O termo transplante de medula óssea é mantido apesar de genérico, mesmo a aspiração de medula óssea não sendo mais a única fonte direta de se obter células progenitoras hematopoéticas (CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

1.1.3 Coleta de células progenitoras hematopoéticas (stem cells)

A coleta de Células Progenitoras Hematopoéticas (CPH) de doador ou paciente (no caso de TCTH autólogo) pode ser obtida da crista ilíaca posterior, através de múltiplas punções e aspirações da medula óssea; leucaférese, através do uso de fatores de crescimento como o G-CSF (fator de crescimento de colônias de granulócitos) com a finalidade de mobilização das CPH; ou mais recentemente do uso de sangue do cordão umbilical (HOROWITZ, 2004).

No procedimento de obtenção das CPH na medula óssea, o doador é hospitalizado e submetido a anestesia geral. Após posicionado em decúbito ventral, são realizadas diversas punções nas cristas ilíacas posteriores da qual é aspirada a quantidade de medula óssea necessária para o transplante, usualmente estimada em 10 ml/kg de peso do receptor, que geralmente corresponde a um número adequado de células progenitoras suficientes para permitir a “pega” do enxerto, também denominada enxertia (THOMAS; STORB, 1970). As CPH provenientes da MO são armazenadas em uma bolsa apropriada contendo anticoagulante e, posteriormente, filtrada para a remoção de gorduras e espículas ósseas. O índice de complicações graves deste procedimento é baixo, em torno de 0,4% (BORTIN; BUCKNER, 1983; BUCKNER *et al.*, 1984). A maioria dos doadores recebe alta 24 horas após a coleta. A transfusão de concentrado de hemácias para o doador só é necessária quando há coleta de grandes volumes de medula, o que pode ocorrer quando o receptor tem massa corpórea muito superior à do doador. A reposição de ferro oral é recomendada por um período de 30 dias. A maioria dos transplantes alogênicos ainda é realizada utilizando-se esta forma de coleta (HOROWITZ; KEATING, 2000).

As CPH periféricas são coletadas por leucocitoaférese, após a mobilização das mesmas da medula óssea para o sangue periférico, com a utilização de fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF); no caso de pacientes submetidos a transplante autólogo, pode ser combinada a uma quimioterapia prévia (CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001). A mobilização visa alcançar uma concentração suficiente de células CD34+ no sangue periférico, de modo a garantir o sucesso do transplante (SCHMITZ *et al.*, 1996; BAY *et al.*, 2006). Normalmente são processadas cerca de duas a quatro volemias do doador para se obter

um mínimo de 2×10^6 células CD34+, quantificadas através de citometria de fluxo, e criopreservadas em nitrogênio líquido para posterior infusão (HOROWITZ, 2004). O procedimento de coleta de CPH por leucocitoaférese se consolidou na década de 80, sendo utilizada em mais de 90% dos transplantes autólogos e em cerca de 20% dos transplantes alogênicos de medula óssea (KORBLING *et al.*, 1986; REIFFERS *et al.*, 1986; HOROWITZ; KEATING, 2000).

Ainda em relação a coleta de CPH periféricas é importante ressaltar que há necessidade de se utilizar um cateter durante o procedimento, fato que exige a participação de cirurgiões experientes no referido processo. Além do fato de que o uso dos fatores estimulantes de colônias de granulócitos possam induzir efeitos colaterais agudos ou tardios (ANDERLINI *et al.*, 1999). A utilização do procedimento de aféreses em pacientes com peso abaixo de 10kg é restrita devido às limitações relacionadas à hemodiluição do procedimento (ANDERLINI *et al.*, 1999; CAVALLARO *et al.*, 2000).

A primeira experiência bem sucedida no uso CPH, do sangue de cordão umbilical (SCU) ocorreu em 1988, na França, no tratamento de um paciente portador de anemia de Fanconi, utilizando células progenitoras do SCU de seu irmão (GLUCKMAN *et al.*, 1989). O sangue de cordão umbilical é coletado logo após o nascimento da criança, sendo posteriormente processado e as CPH criopreservadas em nitrogênio líquido para posterior infusão (RUBINSTEIN *et al.*, 1998).

1.1.4 Criopreservação

O processo de criopreservação permite não só a conservação adequada das CPH como também o procedimento de regimes de condicionamento e a realização de transplantes por períodos programados (MASSUMOTO; MIZUKAMI, 2000). A falha na recuperação hematopoética, geralmente, não é atribuída à criopreservação de células pluripotentes hematopoéticas, porém, alguns investigadores correlacionam uma má criopreservação das mesmas com o atraso na recuperação hematopoética (ROWLEY, 1992; MASSUMOTO *et al.*, 1997).

Existem dois métodos de criopreservação, o congelamento rápido das células, quando a medula ou as CPH periféricas são diluídas em solução crioprotetora constituída de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 6% de solução de amido hidroxietilamido e de 4% de albumina humana em solução salina e são colocadas diretamente em freezer a -80°C . O outro método trata-se do congelamento lento e progressivo, onde a solução crioprotetora é

constituída por 40% de meio de cultura, 40% de plasma autólogo e 20% de DMSO e o processo de congelamento é gradual. Em relação ao processo de descongelamento das células o mesmo deve ser realizado de forma rápida para evitar a formação de cristais de gelo que podem danificar a membrana celular. As técnicas de congelamento lento e descongelamento rápido evitam os danos mecânicos e a desidratação causada pela formação e crescimento de cristais de gelo (MASSUMOTO *et al.*, 1996).

1.1.5 Condicionamento pré-transplante

O condicionamento pré-transplante tem a finalidade de erradicar a doença residual, assim como a de induzir uma imunossupressão que permita a “pega” das células que serão infundidas. A irradiação corporal total foi utilizada isoladamente como agente de condicionamento para o transplante, sendo posteriormente associada a ciclofosfamida (CASTRO; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

A escolha do regime de condicionamento é realizada de acordo com a doença de base. O quadro 1 abaixo lista os principais regimes de condicionamento pré-transplante de medula óssea de acordo com a doença de base.

Quadro 1- Principais regimes de condicionamento pré-transplante de medula óssea.

REGIME DE CONDICIONAMENTO	DOENÇAS MAIS FREQUENTEMENTE TRATADAS
ICT (12 Gy) + Ciclofosfamida (120 mg/Kg)	LLA, LMA, LMC, AAG
ICT (12 Gy) + Etoposide (60 mg/Kg)	LLA
Bussulfan (16 mg/Kg) + Ciclofosfamida (120 mg/Kg)	LMC, LMA
Bussulfan (4 mg/Kg) + Ciclofosfamida (200 mg/Kg)	AAG
Bussulfan (16mg/Kg) + Melfalan (140 mg/Kg)	LMA, LMC, tumores sólidos
Ciclofosfamida (200 mg/Kg)	AAG
ICT (12 Gy) + Citosinaarabinosídeo (36g/m ²)	LLA
BEAM – BCNU (300 mg/m ²) + Etoposide (800 mg/m ²) + Citosinaarabinosídeo (800 mg/m ²) + Melfalan (140 mg/m ²)	Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin
BEAC – BCNU (300-400mg/m ²) + Etoposide (150-200mg/m ²) + Citarabina (200-400mg/m ²) + Ciclofosfamida 1,5g-2,5g/m ²)	Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin

ICT: Irradiação Corporal Total, Gy: Grays, LLA: Leucemia Linfocítica Aguda, LMA: Leucemia Mielóide Aguda, LMC: Leucemia Mielóide Crônica, AAG: Anemia Aplástica Grave.

Fonte: adaptada de CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001.

1.1.6 Infusão das células progenitoras hematopoéticas

Na maioria dos serviços que realizam TMO alogênico relacionado e singênico, a medula óssea ou as CPH periférico são infundidas imediatamente após a coleta, através do cateter venoso central. Caso exista incompatibilidade ABO entre o doador e o receptor, procede-se à remoção das hemácias da medula óssea antes de sua infusão ou pode ser realizada a plasmaférese no receptor, a fim de evitar reações transfusionais graves (SNIECINSKY *et al*, 1994).

Quando o transplante é autólogo ou de sangue de cordão umbilical, as células são criopreservadas para posterior infusão. Para ocorrer a infusão, essas células são descongeladas em banho-maria e então administradas. Rotineiramente utiliza-se hidrocortisona e

prometazina ou difenidramida previamente, pois o DMSO, utilizado como criopreservador, pode causar reação anafilática (CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

O dia em que as células progenitoras hematopoéticas são infundidas no paciente é considerado o dia 0. Os dias anteriores são denominados como negativos (-3, -2, -1) e os posteriores como positivos (+1, +2, +3).

1.1.7 Aplasia da medula óssea e enxertia do TCTH

Após o regime de condicionamento, quimioterapia de elevadas doses, ocorre um período de mielossupressão caracterizado por elevada susceptibilidade a infecções, anemia e sangramentos. Geralmente as contagens de leucócitos apresentam-se abaixo de 100 células/mm³ por volta do dia D+4 dependendo do condicionamento utilizado e da doença de base. Nessa fase os pacientes recebem infusão de fatores de crescimento diariamente até que ocorra a enxertia. Considera-se a enxertia quando as contagens de leucócitos mantêm-se acima de 500 células/mm³ por 3 dias consecutivos, o que ocorre em média entre os dias D+15 a D+19 após um TMO alogênico relacionado. O número de plaquetas também costuma estar abaixo de 10.000/mm³; considera-se sua recuperação quando as contagens acima de 20.000/mm³ são atingidas sem a necessidade de transfusões por mais de 7 dias, que ocorre aproximadamente nos dias D+19 a D+25. A recuperação da função medular é influenciada por fatores como o tipo de transplante, número de células infundidas e infecções (CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

1.2 Estresse Oxidativo

1.2.1 Radicais livres

O estresse oxidativo ocorre quando há aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e/ou diminuição da defesa antioxidante (enzimática e não enzimática) provocando graves danos às macromoléculas biológicas, tais como o DNA, lipídeos e proteínas e desregulação do metabolismo normal (KNIGHT, 1998; TOYOKUNI, 1999).

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como qualquer íon, átomo ou molécula que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica conferindo-lhes um considerável grau de reatividade, especialmente como agente

oxidante, tendendo a procurar o seu equilíbrio adquirindo um elétron de uma molécula estabilizada, desestabilizando-a e causando reações em cadeia. Tais reações em cadeia podem ser interrompidas pela ação de enzimas antioxidantes ou pelo reequilíbrio de elétrons resultante da combinação de dois RL (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Espécies reativas é um termo que engloba qualquer composto que seja potencialmente reativo. As mais importantes são as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (Quadro 2). Entre as EROs estão incluídas as espécies reativas radicais (radicais livres) e não radicais. Da mesma forma para as ERNs. As espécies não radicais são agentes oxidantes e podem se converter em radicais livres. Todo radical livre é uma espécie reativa, mas nem toda espécie reativa é um radical livre (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Quadro 2- Classificação e nomenclatura das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Espécies Reativas	
Radicais Livres	Não Radicais
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)	
Superóxido (O_2^{\bullet})	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxila (OH^{\bullet})	Ácido Hipobromoso (HOBr)
Hidroperoxila (HO_2^{\bullet})	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila (RO_2^{\bullet})	Ozônio (O_3)
Alcoxila (RO^{\bullet})	Oxigênio <i>Singlet</i> (1O_2)
Carbonato (CO_3^{\bullet})	Peróxidos Orgânicos (ROOH)
Dióxido de Carbono (CO_2^{\bullet})	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
Espécies Reativas de Óxidos de Nitrogênio (ERON's)	
Óxido Nítrico (NO^{\bullet})	Ácido Nitroso (HNO_2)
Dióxido de Nitrogênio (NO_2^{\bullet})	Cátion Nitroxil (NO^+)
	Anion Nitroxil (NO^-)
	Trióxido de Dinitrogênio (N_2O_3)
	Tetróxido de Dinitrogênio (N_2O_4)
	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
	Cátion Nítril (NO_2^+)
	Peroxinitritos Alxil (ROONO)

Fonte: Adaptada de BARBOSA *et al.*, 2008.

Os radicais derivados de oxigênio representam a classe mais importante de espécies reativas geradas nos sistemas vivos. EROs podem ser produzidas a partir de substâncias endógenas e exógenas. Durante o metabolismo basal das células aeróbicas existe

uma produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação, através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. A extensão e os tipos de danos causados pelas EROs dependem tanto da quantidade como da natureza das mesmas a que as células estão expostas, bem como das suas defesas antioxidantes (DAVIES, 1987). Fontes endógenas potenciais incluem as mitocôndrias, o metabolismo do citocromo P450, os peroxissomos e a ativação de células inflamatórias (INOUE *et al.*, 2003). Sob condições fisiológicas, a produção de peróxido de hidrogênio está estimada em cerca de aproximadamente 2% da absorção total de oxigênio pelo organismo. No entanto, é difícil detectar a ocorrência do radical superóxido em mitocôndrias intactas, provavelmente em consequência da presença de elevada atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). A reatividade e a capacidade oxidante decorrente da ação direta do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio são relativamente discretas, sendo que a importância deles no processo oxidativo se dá pela sua participação na geração da radical hidroxila (DARLEY-USMAR; HALLIWELL, 1996; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001). O radical hidroxila é um dos mais potentes agentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas, como lipídeos insaturados e DNA, podendo ser formado através de reações como a de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$) e de Haber-Weiss ($\text{O}_2\cdot^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{S}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$), mediadas por íons metálicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O radical hidroxila é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA, danificando tanto as bases de purina e pirimidina, e também o esqueleto de desoxirribose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.2.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica (PL) é o processo através do qual as EROs atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídeos das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O processo da peroxidação lipídica é um processo auto catalítico, que pode ser encerrado pela recombinação dos radicais ($\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{produto não-radical}$) e/ou o esgotamento de substrato, composto por três fases: iniciação, propagação e terminação (PINCHUK *et al.*, 1998; NYSKA; KOHEN, 2002; VALKO *et al.*, 2006). Uma vez formados, os radicais peroxil ($\text{ROO}\cdot$) podem ser rearranjados através de uma reação de ciclização para endoperóxidos (precursores de malonaldeído) com o malonaldeído (MDA) sendo o produto final do processo de peroxidação (MARNETT, 1999).

Estudos têm revelado que a peroxidação lipídica afeta gravemente as biomembranas, induzindo alteração da integridade, da fluidez e permeabilidade, perda funcional, inativação de receptores, enzimas e canais iônicos, com consequente liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e produção de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GREENBERG *et al.*, 1997).

Os produtos da peroxidação lipídica são, principalmente, aldeídos com habilidade de exacerbar o dano oxidativo. Sua elevada meia vida e reatividade permitem que essas moléculas interajam com ácidos nucléicos e proteínas ocasionando danos irreversíveis aos mecanismos que envolvem a funcionalidade celular (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Produtos de peroxidação de lipídeos demonstraram ser mutagênicos e carcinogênicos e têm sido implicados em mecanismos subjacentes em vários distúrbios e doenças, tais como doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios neurológicos e no processo de envelhecimento (WEST; MARNETT, 2006).

O MDA é um dos produtos secundários de PL mais conhecidos e biomarcador mais frequentemente usado para investigar o dano oxidativo em lipídeos. Elevados concentração de MDA indicam aumento da PL e pode ser usado como um indicador de injúria à membrana celular, proveniente, por exemplo, de situações de estresse oxidativo (GROTTO *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

1.2.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um gás de radicais livres altamente reativos e instáveis produzido da oxidação do aminoácido L-arginina, necessitando da presença de dois cofatores, oxigênio e fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH), pela óxido nítrico sintase (NOS), que existe em três isoformas: NOS constitutiva endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS) (CHOI *et al.*, 2001). iNOS alterada pode produzir potencialmente radicais de óxido nítrico (NO), radicais superóxido, ou ambos; estes radicais podem em seguida reagir para formar peroxinitrito. Além disso, os produtos da decomposição de NO, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), podem agir como espécies reativas de nitrogênio (PONNUSWAMY *et al.*, 2009).

1.2.4 Antioxidantes

A exposição a radicais livres levou ao desenvolvimento de uma série de mecanismos de defesa que equilibram seu efeito através de antioxidantes não enzimáticos e de enzimas antioxidantes (CADENAS, 1997). As defesas antioxidantes representam a remoção direta de radicais livres (pró-oxidantes), proporcionando máxima proteção para sítios biológicos. Um bom antioxidante deve eliminar especificamente os radicais livres, quelar metais redox, interagir com outros antioxidantes dentro da "rede antioxidante", ter um efeito positivo sobre a expressão do gene, ser prontamente absorvido, ter uma concentração em tecidos e fluidos biológicos relevante, funcionar tanto em meio aquoso e / ou domínios de membrana (VALKO *et al.*, 2006).

As principais enzimas antioxidantes do organismo são a superóxido dismutase (SOD), glutationa-peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (MATES; PEREZ-GOMEZ; DE CASTRO, 1999). Os antioxidantes não-enzimáticos são representados por ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutationa (GSH), carotenóides, antioxidantes tiol (glutationa, tioredoxina e ácido lipóico), flavonóides, e outros compostos (MCCALL; FREI, 1999).

1.2.3.1 Defesa antioxidante enzimática: Catalase (CAT)

A Catalase (CAT) é uma enzima presente em todos os organismos aeróbicos (MATES; PEREZ-GOMEZ; DE CASTRO, 1999). Essa enzima é um dos catalisadores mais ativos produzidos pela natureza e constitui o mais eficiente e elaborado sistema antioxidante para controlar as concentrações de H_2O_2 em plantas e animais, limitando seu efeito deletério (MONTAVON; KUKIC; BORTLIK, 2007). Uma molécula de catalase pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio a cada minuto: $2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$. Essa enzima está presente principalmente nos peroxissomos, onde muitas enzimas produzem H_2O_2 (SCANDALIOS, 2005).

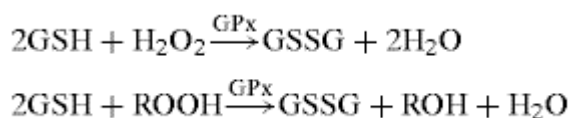
A CAT das células animais é formada por quatro subunidades, onde cada uma possui um grupo heme contendo ferro em seu sítio ativo. Esses grupos heme estão orientados em direção a sítios não polares e conectados na superfície da enzima por canais. Cada subunidade está unida a uma molécula de NADH (JOURD'HEUIL *et al.*, 1998; LLEDÍAS;

RANGEL; HANSBERG, 1998; McKENZIE; REFFETY; BECKETT, 1998; HALLIWELL, 1999).

1.2.3.2 Defesa antioxidante enzimática: Glutathione Peroxidase (GPx)

Há dois tipos da enzima glutathione peroxidase, um dos quais é independente de selênio (glutathione- S -transferase GST), enquanto o outro é dependente de selênio (GPx,) (MATES; PEREZ-GOMEZ; DE CASTRO, 1999). Estas duas isoformas diferem no número de subunidades, na natureza da ligação com o selênio no centro ativo e os seus mecanismos catalíticos. O metabolismo da glutathione é um dos mais essenciais mecanismos de defesa antioxidante (VALKO *et al*, 2006).

Os seres humanos têm quatro diferentes glutathione peroxidase Se-dependentes (MATES; PEREZ-GOMEZ; DE CASTRO, 1999). Todas as enzimas GPx são conhecidas por adicionar dois elétrons para reduzir peróxidos formando Se-OH. As propriedades antioxidantes destas seleno-enzimas lhes permite eliminar os peróxidos como potenciais substratos para a reação de Fenton.



A GPx atua em conjunto com o tripeptídeo glutathione (GSH), que está presente nas células em concentrações elevadas (micromolar). O substrato para a reação catalítica de GPx é H₂O₂, ou um peróxido orgânico, ROOH. A GPx decompõe os peróxidos em água (ou álcool), ao mesmo tempo que oxida GSH (VALKO *et al*, 2006).

1.2.3.3 Defesa antioxidante enzimática: Superóxido Dismutase (SOD)

A Superóxido Dismutase (SOD), presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos, é um dos mais eficazes antioxidantes intracelulares e tem como função atuar na defesa antioxidante primária contra radicais superóxidos. É a enzima que catalisa a dismutação do radical O₂•⁻ a O₂ e H₂O₂, que tem reatividade limitada (O₂•⁻ + O₂•⁻ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂) (McCord; FRIDOVICH, 1969). Essa enzima foi isolada em 1939, mas foi em 1969 que McCord e Fridovich comprovaram a atividade antioxidante da SOD (McCord; FRIDOVICH, 1969).

Existem várias isoformas da SOD, diferindo na natureza do centro ativo de metal e constituinte aminoácido, bem como seu número de subunidades, cofatores e outros recursos. Nos seres humanos, há três isoformas: a superóxido dismutase cobre-zinco (CuZnSOD), presente principalmente no citoplasma - o íon cobre é essencial para a atividade catalítica da enzima e o íon zinco promove a estabilidade da estrutura protéica; a superóxido dismutase mitocondrial manganês (MnSOD) e a superóxido dismutase extracelular (ECSOD), que são capazes de transformar dois ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (RAHMAN, 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007).

1.3 Dano oxidativo do DNA- Genotoxicidade

EROs podem danificar moléculas como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DNA e RNA) devido a sua alta reatividade. Modificações que ocorrem nos nucleotídeos e no esqueleto de fosfato de açúcar podem gerar quebras simples e duplas nas fitas que compõem as moléculas do DNA e induzir a erros de pareamento das bases nitrogenadas possibilitando o aparecimento de mutações genéticas (BERQUIST; WILSON, 2012).

De particular interesse entre as espécies reativas de oxigênio estão o radical hidroxila, radical superóxido e o não radical peróxido de hidrogênio. No entanto, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio possuem muito baixa reatividade química, e não reagem com a maioria das moléculas biológicas como o DNA. Radicais hidroxila reagem com a maioria das moléculas biológicas acarretando significantes taxas de danos para as bases de DNA e a porção de açúcar através de uma variedade de mecanismos. Se não for reparado, o dano oxidativo ao DNA pode levar à mutagênese e instabilidade genética, o que é uma característica para o desenvolvimento do câncer. Assim, a compreensão do dano oxidativo ao DNA, seus mecanismos de reparação e efeitos biológicos é de extrema importância (WALLACE, 2002; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; FRIEDBERG *et al.*, 2006; LOEB, 2011).

O Teste do Cometa, ou técnica de eletroforese celular em microgel, é largamente empregado como método padrão para avaliar os danos do DNA em células isoladas e a capacidade de reparo do DNA (COLLINS, 2004; WONG *et al.*, 2005). Utiliza o método de eletroforese em gel de agarose apresentando como principais vantagens, dentre outras: exige um pequeno número de células, pode ser aplicado à análise de células derivadas de uma

variedade de diferentes tecidos humanos e pode ser modificado para detectar tipos específicos de dano do DNA, como no caso de dano oxidativo (WASSON, 2008).

1.4 Estresse Oxidativo e Genotoxicidade no Transplante Autólogo de Células Tronco Hematopoéticas

A quimioterapia em doses elevadas e a radioterapia têm efeitos tóxicos agudos e tardios graves sobre vários tecidos, tais como membranas de mucosas gastrointestinais, do fígado, do pulmão, da bexiga, do sistema nervoso central, e, raramente, outros tecidos. Esses efeitos estão possivelmente relacionados com o aumento na produção de radicais livres, de espécies reativas de oxigênio (EROs), com a depleção de antioxidantes nos tecidos (vitamina A, C, E, enzimas antioxidantes) e com um aumento dos hidroperóxidos lipídicos plasmáticos e TBARS (SANGEETHA; KORATKAR; SURYAPRABHA, 1990; CLEMENS *et al.*, 1990; DURKEN *et al.*, 1995; HUNNISETT *et al.*, 1995; WEIJL; CLETON; OSANTO, 1997; BHUVARAHAMURTHY; BALASUBRAMANIAN; GOVINDASAMY, 1996; JONAS *et al.*, 2000; LIN, 2002; CETIN *et al.*, 2004; SARI *et al.*, 2008; SABUNCUOĞLU *et al.*, 2012a).

A produção excessiva de RL que ocorre no procedimento do TCTH tem sido implicada na ação de muitos medicamentos citostáticos, mas pouco se sabe sobre como citostáticos afetam o sistema antioxidante em seres humanos e poucos estudos têm sido realizados nesse contexto (KALYANAMARAN; NEMEC; SINHA, 1989; DURKEN *et al.*, 1995). O desequilíbrio oxidativo tem sido visto como um denominador comum na patogênese de morbidades relacionadas com o tratamento e mortalidade em terapia de elevada dose, seguido por transplante de células hematopoéticas (CETIN *et al.*, 2004; EVENS; MEHTA; GORDON, 2004).

Foi demonstrado que leucócitos polimorfonucleares de pacientes que receberam quimioterapia para doenças hematológicas e tumores sólidos produzem mais peróxido de hidrogênio e ânion superóxido do que os de indivíduos saudáveis (SANGEETHA *et al.*, 1990). Aumento de hidroperóxidos lipídicos plasmáticos e ácido tiobarbitúrico também sugerem estresse oxidativo em pacientes que receberam quimioterapia (LADNER *et al.*, 1989; CLEMENS; LANDER; SCHMIDT, 1989; HUNNISETT *et al.*, 1995; FAURE; COUDRAY; MOUSSEAU, 1996). Estudos em modelos animais e em seres humanos mostraram que as concentrações plasmáticas de glutatona são bastante reduzidas por agentes

quimioterapêuticos, tais como busulfan, carmustina (BCNU) e cisplatina (MITCHELL *et al.*, 1981; BHUVARAHAMURTHY; BALASUBRAMANIAN; GOVINDASAMY, 1996).

O G-CSF utilizado para mobilização de células-tronco é capaz de liberar proteínases elastase e catepsina G de neutrófilos, sendo capaz de provocar um aumento de estresse oxidativo em neutrófilos, pelo aumento da atividade da NADPH oxidase e estímulo da expressão de enzimas, tais como a mieloperoxidase (MPO), durante a primeira fase de diferenciação mielóide. MPO utiliza H_2O_2 para converter hidróxido de cloreto, o qual é um oxidante para substratos, tais como lipídeos, DNA e, em particular, proteínas (LÉVESQUES *et al.*, 2001; BARTH *et al.*, 2002; HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2003). Gonçalves e colaboradores (2009) observaram um aumento de malonaldeído, diminuição plasmática de vitamina C, catalase e superóxido dismutase após a quimioterapia em pacientes submetidos a TCTH autólogo e TMO alogênico. Sabuncuoğlu e colaboradores (2012) demonstraram um aumento na peroxidação lipídica, diminuição da enzima antioxidante catalase e aumento de α -tocoferol após o regime de condicionamento sugerindo um aumento do estresse oxidativo quando comparado aos outros momentos relacionados ao TCTH.

O dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) é um importante mecanismo pelo qual algumas substâncias danificam o DNA (ANDREAZZA, 2006). A análise da associação entre estresse oxidativo e genotoxicidade poderá auxiliar no melhor entendimento das complicações pós TCTH e na utilização de novos parâmetros que poderão ser utilizados como marcadores de enxertia e de toxicidade pós TCTH.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil oxidativo e a genotoxicidade em pacientes submetidos a TCTH autólogo portadores de doenças hematológicas neoplásicas em acompanhamento no Hospital Universitário Walter Cantídio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de MDA (malonaldeído) e de óxido nítrico (NO), antes do Regime de Condicionamento (RC), 24 horas após o RC e um dia anterior ao TCTH (D -1), 1 dia (D +1), 10 dias (D +10) e 20 dias (D +20) após o Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH);
- Analisar o perfil das enzimas antioxidantes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), antes do RC, 24 horas após o RC e um dia anterior ao TCTH (D -1), 1 dia (D +1), 10 dias (D +10) e 20 dias (D +20) após o TCTH;
- Caracterizar o índice de dano no DNA em pacientes submetidos ao TCTH nos mesmos momentos em que foram avaliados os parâmetros de estresse oxidativo;
- Correlacionar o índice de dano no DNA das células dos pacientes com as concentrações de MDA, NO, CAT, GPx e SOD.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo:

O estudo é do tipo longitudinal prospectivo com a finalidade de investigar o perfil oxidativo e a genotoxicidade em pacientes adultos submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas autólogo e portadores de doença hematológica neoplásica (Mieloma múltiplo, Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin) acompanhados no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e em indivíduos considerados saudáveis, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2013.

3.2 Casuística:

O estudo foi composto por quatro grupos:

Grupo I- controle (n=30): composto por indivíduos aparentemente saudáveis, funcionários do laboratório de análises clínicas e toxicológicas (LACT) e alunos do curso de Farmácia da UFC. A idade e gênero foram pareados de acordo com o grupo de pacientes.

Grupo II (n=17): pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo que atenderem às condições básicas à realização do TCTH autólogo acompanhados no serviço de Hematologia do HUWC.

Grupo III (n=10): pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin que atenderem às condições básicas à realização do TCTH autólogo acompanhados no serviço de Hematologia do HUWC.

Grupo IV (n=10): pacientes com diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin que atenderem às condições básicas à realização do TCTH autólogo acompanhados no serviço de Hematologia do HUWC.

Os critérios de seleção para os grupos de pacientes foram de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo:

- **Critérios de inclusão:** pacientes adultos (mínimo de 18 anos), de ambos os sexos, atendidos no Serviço de Hematologia do HUWC com indicação de transplante autólogo de células tronco hematopoéticas e que concordaram em participar da pesquisa de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);

- ✓ Condições Básicas à realização de TCTH:

- O paciente esteja em condições clínicas adequadas, sem disfunção grave de órgãos ou sistemas;

- Existam células disponíveis em quantidade e qualidade suficientes para garantir a enxertia do transplante e para a realização do procedimento;

- O TCTH seja reconhecido como o melhor tratamento para a doença de base. No caso da doença ser neoplásica, a mesma deve estar preferencialmente em remissão;

- Haja condições familiares, psicológicas e socioeconômicas para seguir o acompanhamento recomendado pós-transplante.

- **Critérios de exclusão:** foram excluídos do estudo os pacientes que não atenderam aos critérios para o transplante autólogo de células tronco hematopoéticas e/ou não assinaram o TCLE. Pacientes em uso de antioxidantes, tabagistas, etilista portadores de infecção para vírus da hepatite, HIV e HTLV foram excluídos do estudo.

Os critérios de inclusão e exclusão para o grupo controle foram:

- **Critérios de inclusão:** Indivíduos adultos de ambos os sexos, com hemograma normal, sem comorbidades e sem uso de medicamentos e que concordaram em participar do estudo assinando o TCLE;
- **Critérios de exclusão:** Indivíduos adultos em uso de antioxidantes, tabagistas e etilista e aqueles que não concordarem em participar do referido projeto.

3.3 Local de estudo:

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas do Curso de Farmácia da UFC e no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

3.4 Coleta das Amostras biológicas

A coleta das amostras foi efetivada após explicação detalhada dos objetivos do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados 5 mL de sangue por punção venosa em tubo contendo EDTA e 5 mL em tubo contendo heparina como anticoagulantes. Cinco amostras de cada paciente foram coletadas: a primeira no momento da internação para o procedimento do transplante (Pré-RC), a segunda após 24 horas do término do RC, a terceira 1 dia após o TCTH autólogo (D+1), a quarta 10 dias após o TCTH autólogo (D+10) e a quinta, 20 dias após o transplante (D+20) (Figura 1). Durante a intervenção do transplante de células tronco hematopoética autólogo foi considerado o momento basal do paciente a coleta realizada no momento da internação do mesmo, ou seja, no Pré-RC. O protocolo para o TCTH difere quanto ao tempo de condicionamento entre os portadores de MM e de LH e LNH, sendo de dois dias ou um dia para MM e de sete dias para os linfomas. As amostras do grupo controle (indivíduos

aparentemente saudáveis) foram coletadas uma única vez. O plasma heparinizado foi obtido após centrifugação a 1000 rpm durante 12 min. O hemolisado foi obtido do concentrado de hemácias em EDTA. Ambos foram armazenados a -80°C por até 6 meses.

Figura 1- Momentos analisados durante o período de acompanhamento dos pacientes.



Fonte: Elaborada pela autora. Pré-RC: momento de internação do paciente para o TCTH (basal), antes do Regime de Condicionamento; D-1: 1 dia que antecede o transplante Autólogo; D0 é o dia em que ocorreu o Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH); D+1: 1 dia após o transplante; D+10: 10 dias após o transplante e D+20: 20 dias após o transplante.

3.5 Protocolo do Transplante de Células Tronco Hematopoéticas Autólogo.

O procedimento do transplante de células tronco hematopoética autólogo padronizado no HUWC consiste em critérios estabelecidos pela literatura (APPERLEY *et al.*, 2012), onde o mesmo é realizado de forma única para todas as doenças hematológicas neoplásicas (Mieloma múltiplo, Linfomas não -Hodgkin e Hodgkin), com exceção ao tempo e esquema de condicionamento. Inicialmente foi realizado a mobilização das células tronco da medula óssea para o sangue periférico através do uso de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), Filgrastim- 10-16 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$, durante 5 dias. Posteriormente foram realizadas duas leucaféreses em dias consecutivos, seguido de contagem das células CD34+. A contagem foi realizada através do uso da citometria de fluxo, devendo ser utilizada para o TCTH em uma quantidade $>2,0 \times 10^6$ células CD34+/Kg de peso do paciente. As células CD34+ foram então armazenadas em solução criopreservante contendo DMSO (Dimetil Sulfoxido), albumina humana e solução fisiológica e criopreservadas em nitrogênio líquido até o momento do transplante.

Previamente ao transplante, os pacientes foram submetidos ao RC de acordo com a doença de base (Quadro 3). Após 48hs do término do RC, o transplante autólogo de células tronco hematopoéticas foi realizado. As CPH periféricas foram descongeladas em banho maria a 37°C e imediatamente infundidas no paciente.

Quadro 3- Regimes de condicionamento padronizados para TCTH autólogo nos pacientes em estudo de acordo com a Instituição (HUWC).

Regime de condicionamento (RC)	Dose Total	Doenças tratadas com o RC
Melfalano	200 mg/m ²	Mieloma Múltiplo
BEAC: Carmustina Etoposido Citarabina Ciclofosfamida Mesna	300 mg/m ² 800 mg/m ² 1600 mg/m ² 140 mg/m ² 168 mg/m ²	Linfoma Hodgkin
BEAM: Carmustina Etoposido Citarabina Melfalano	300 mg/m ² 800 mg/m ² 1600 mg/m ² 140 mg/m ²	Linfoma Não Hodgkin

Fonte: Elaborada pela autora

3.6 Obtenção do plasma

Para a obtenção do plasma, o sangue coletado em heparina foi centrifugado a 3.500rpm por 15min, sendo separado o plasma e armazenado ficando sob refrigeração a uma temperatura de -80°C por até seis meses.

3.7 Obtenção do hemolisado

Para a obtenção do hemolisado eritrocitário, foi realizada a remoção de plasma, plaquetas e camada leucocitária do sangue total a partir de centrifugações e lavagens sucessivas com NaCl 0,9%, com posterior lise dos eritrócitos pela adição de água destilada (1:1).

3.8 Testes Realizados:

3.8.1 Perfil oxidativo:

Malonaldeído (MDA):

O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo que tem absorvância máxima em solução ácida 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535nm, pH 1,0, é $1,53 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$. 250 mL do plasma heparinizado foram colocados em tubos de vidro e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400 mL de ácido perclórico a 35% para precipitação das proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 minutos e a 600 mL do sobrenadante foram adicionados 200 mL de tiobarbiturato de sódio a 1,2%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 560 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

Oxido nítrico (NO):

Os níveis de NO foram determinados pela concentração de nitrito/nitrato (NOx) segundo o método de GREEN e colaboradores (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esta experiência 100 mL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H₃PO₄ em 1% / água destilada, na proporção de 1:1) foi adicionado a 100 mL do plasma e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 mL do reativo de Griess a 100 mL do plasma e a absorvância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm.

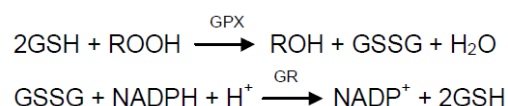
Catalase (CAT):

A atividade da CAT nos eritrócitos foi determinada por método espectrofotométrico em ultravioleta a 240nm, baseado na monitorização da decomposição de H₂O₂. Os valores brutos obtidos em Δa (delta/min) foram corrigidos por um fator de correção

do decaimento da atividade por diluição do hemolisado, divididos pela absorvidade molar de H_2O_2 a 240nm (ϵ 0,0394 L mmol⁻¹mm⁻¹) (AEBI, 1984).

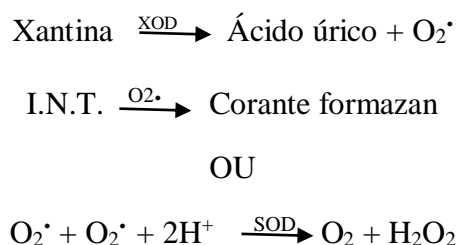
Glutathione Peroxidase (GPx):

A medida da atividade da glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos foi determinada utilizando o kit Ransel Glutathione Peroxidase® (RANDOX BRASIL Ltda). O kit utiliza um método de determinação indireta da enzima, baseado na reação de oxidação da glutathione reduzida (GSH) à glutathione oxidada (GSSG) catalisada por GPx, utilizando glutathione redutase (GR) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). A absorbância é medida por decréscimo a 340 nm do NADPH durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (PAGLIA; VALENTINE, 1967).



Superóxido Dismutase (SOD):

A medida da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) nos eritrócitos foi determinada utilizando o Kit RANSOD® (RANDOX BRASIL Ltda). Este método emprega a xantina e a xantina oxidase para gerar radicais superóxido, os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) que forma o composto vermelho de formazan. A atividade da Superóxido Dismutase foi medida através do grau de inibição dessa reação a 505nm.



3.8.2 Análise de dano do DNA - Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, ou técnica da eletroforese celular em microgel, é muito útil e largamente empregado para avaliação de danos e reparos de DNA em células individuais. Seu princípio básico é o da lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração

eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo. A análise dos cometas baseia-se no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese. Medidas como o comprimento total da “cauda” e a densidade de DNA fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). O teste segue a metodologia descrita por SINGH e colaboradores (1988), com modificações. Lâminas histológicas foram mergulhadas em gel de agarose mantido em banho-maria a 60°C e, após remoção do excesso com papel-toalha, secas em temperatura ambiente e mantidas em posição horizontal. Amostras de sangue periférico (40µl) dos indivíduos analisados foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (400 µl) e solução tampão fosfato-salino (PBS) livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ para formar a suspensão de células. Uma alíquota da suspensão de células foi aspirada e gotejada sobre as lâminas previamente revestidas de agarose de ponto de fusão normal, que foram recobertas por lamínulas (24x60mm). Para garantir adesão adequada das células à agarose, as lâminas foram mantidas na geladeira por cinco minutos. A seguir, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauril sarcosina; pH 10) a 4°C e protegida da luz, por no mínimo 1 hora e no máximo 7 dias.

Ao serem removidas da solução de lise, as lâminas foram mergulhadas por 5 minutos em solução de neutralização (0,4M tris; pH 7,5). Esta deve estar em um “banho de gelo”, para manter a temperatura da eletroforese constante em torno dos 4°C. A cuba foi, então, preenchida com a solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH>13) recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas. Estas ficaram em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida usando 25V e 300mA por 20min. Todos esses passos foram realizados na ausência de luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas novamente na solução de neutralização por 5min.

A coloração foi realizada com prata pelo método descrito por NADIN e colaboradores (2001) e BRIANEZI; CAMARGO; MIOT (2009). Para tanto, mistura-se em uma cubeta 32 ml da solução A (50 g Na₂CO₃ quantidade suficiente para [q.s.p.] 1.000 ml de água bidestilada) e 68 ml da solução B (0,2 g de NH₂NO₃, 0,2 g de AgNO₃, 1 g de ácido silicotungstênico, 500 ul de formaldeído, q.s.p. 1.000 ml de água bidestilada) por um minuto.

A seguir, as lâminas foram lavadas por cinco minutos em solução finalizadora (1 ml de ácido acético q.s.p. 100 ml de água bidestilada) e depois em água bidestilada por um minuto.

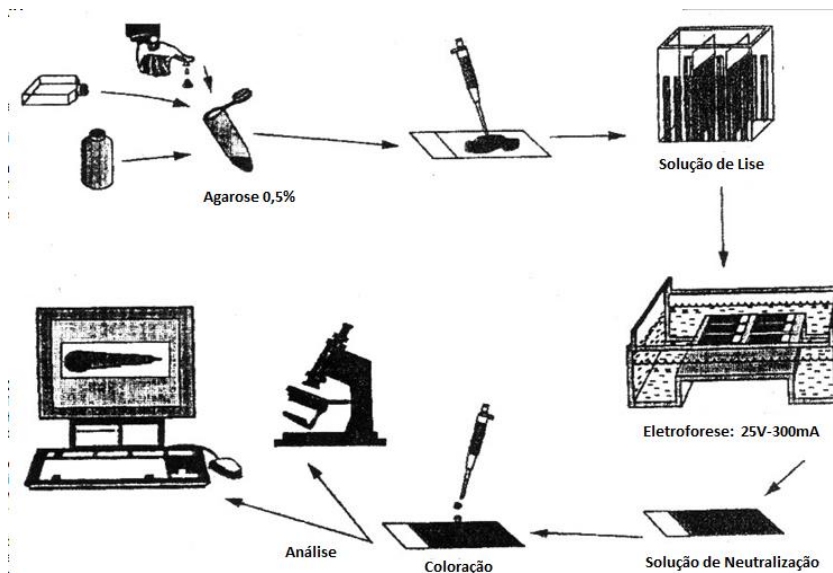
As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico. A análise foi feita pelo padrão de escores, onde, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa, os mesmos foram divididos em cinco categorias (0-4) de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, que indicam o grau de lesão sofrido pela célula: 0 = sem danos (<5%); 1 = baixo nível de danos (5-20%); 2 = médio nível de danos (20-40%); 3 = alto nível de danos (40-95%); 4 = dano total (95%) (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

Assim como fizeram Andrade e colaboradores (2004), foi utilizada a análise visual através do Índice de danos (ID), que foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0,1,2,3,4), onde os valores para o ID podem variar de 0 a 400 (unidades arbitrárias):

$$ID = 0x (\text{N}^\circ \text{Classe } 0) + 1x (\text{N}^\circ \text{Classe } 1) + 2x (\text{N}^\circ \text{Classe } 2) + 3x (\text{N}^\circ \text{Classe } 3) + 4x (\text{N}^\circ \text{Classe } 4)$$

A Figura 2 resume o método do ensaio do cometa.

Figura 2 - Ensaio do Cometa.



Fonte: Adaptada de SINGH *et al.*, 1988.

3.9 Descarte do material biológico

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov Smirnov. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por análise de variância (anova) seguido de pós teste Tukey para dados com distribuição normal e pelo teste Kruskal Wallis seguido de pós teste Dunns para dados sem distribuição normal. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Pearson para dados com distribuição normal e pelo teste de Spearman para dados sem distribuição normal. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

3.11 Comitê de Ética:

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número de protocolo 08022912.8.0000.5045.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

A população em estudo foi constituída de 37 pacientes submetidos ao TCTH autólogo, sendo 23 (62,33%) do sexo masculino e 14 (37,84%) do sexo feminino, sendo 17 (45,94%) portadores de Mieloma Múltiplo, 10 (27,03%) com Linfoma Hodgkin e 10 (27,03%) com Linfoma não-Hodgkin. O grupo controle foi constituído por indivíduos aparentemente saudáveis, com idades entre 19 e 66 anos, com idade média de 48,40 anos (n = 30). Para os pacientes com MM o regime de condicionamento foi o Melfalano e para os Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin o esquema BEAC e BEAM, respectivamente. A tabela 1 resume as características dos pacientes submetidos ao TCTH autólogo.

Tabela 1- Distribuição dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com características demográficas.

Características demográficas	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	Controles (n=30)
Sexo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Masculino	7 (41,2)	7 (70,0)	9 (90,0)	15 (50,0)
Feminino	10 (58,8)	3 (30,0)	1 (10,0)	15 (50,0)
Amplitude Idade	30-69 anos	22-58 anos	18-60 anos	19-66 anos
Média	55,2 anos	36,3 anos	42,0 anos	48,4 anos

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin.

4.2 Perfil oxidativo

4.2.1 Concentrações de Malonaldeído- MDA

A tabela 2 apresenta a distribuição das concentrações basais de MDA nos pacientes com Mieloma Múltiplo (MM), Linfoma de Hodgkin (LH), Linfoma Não Hodgkin (LNH) e no grupo controle.

Foi possível observar que as concentrações basais de MDA foram significativamente elevados nos pacientes submetidos ao TCTH em relação ao grupo controle.

Entre os grupos de pacientes, as concentrações desse biomarcador foram significativamente mais elevadas nos pacientes com LNH.

Tabela 2- Concentrações basais de MDA em relação à doença de base.

MDA	Doença de base				Valor de <i>p</i>
	Controle (n=30)	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	
Estado basal (Pré-RC)	1,05 ± 0,57	2,65 ± 0,72 ^a	2,45 ± 1,46 ^a	3,88 ± 1,16 ^{a,b}	<0,01

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a *p*<0,05 versus Controle. ^b *p*<0,05 versus LH.

A tabela 3 apresenta as concentrações de MDA nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos avaliados. Foi possível observar elevação significativa das concentrações de MDA em todos os momentos analisados para todos os grupos de pacientes em relação ao grupo controle. Nos pacientes com MM, houve elevação significativa das concentrações de MDA no momento D-1 (após o Regime de Condicionamento) em relação ao estado basal (*p*=0,046) e aos demais momentos. Em todos os momentos após o TCTH, as concentrações desse biomarcador assemelharam-se ao estado basal.

Para os pacientes com LH, as concentrações de MDA no momento D-1 foram significativamente elevadas em relação ao estado basal (*p*=0,02); no entanto, após o TCTH, não houve redução significativa dos níveis (*p*>0,05). Para os pacientes com LNH, as concentrações de MDA não diferiram entre os momentos analisados.

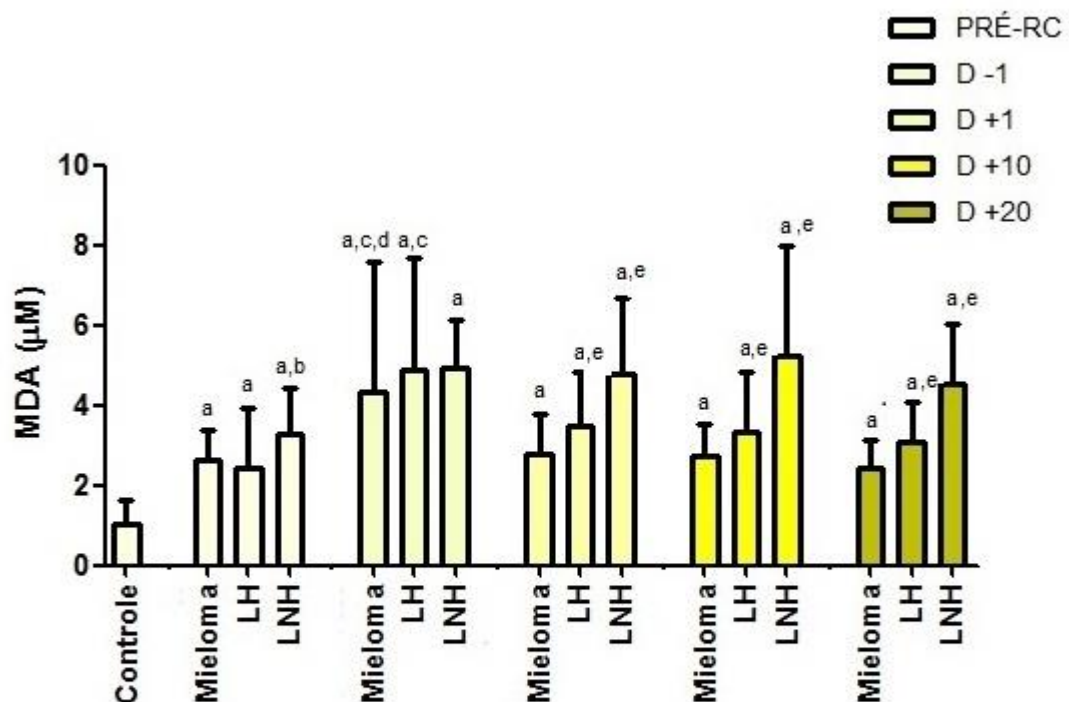
Após o regime de condicionamento, nos momentos D+1, D+10 e D+20 observou-se que as concentrações de MDA dos pacientes com LH e LNH foram significativamente elevadas em relação às concentrações dos pacientes com MM (*p*<0,05)

Tabela 3- Concentrações de MDA nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.

	Momentos					Controle (n=30)
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	
MM (n=17)	2,65 ±0,72 ^a	4,32 ±3,24 ^{a,c,d}	2,79 ±1,0 ^a	2,71 ±0,83 ^a	2,43 ±0,70 ^a	1,05 ±0,57
LH (n=10)	2,45 ±1,46 ^a	4,90 ±2,78 ^{a,c}	3,48 ±1,36 ^{a,e}	3,34 ±1,47 ^{a,e}	3,06 ±1,03 ^{a,e}	1,05 ±0,57
LNH (n=10)	3,26 ±1,16 ^{a,b}	4,94 ±1,2 ^a	4,76 ±1,92 ^{a,e}	5,23 ±2,73 ^{a,e}	4,51 ±1,52 ^{a,e}	1,05 ±0,57

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 versus Controle, ^b p<0,05 versus LH em Pré-RC, ^c p<0,05 versus momento Pré-RC. ^d p<0,05 versus momentos D +1, D +10 e D +20, ^e p< 0,05 versus MM.

Figura 3- Concentrações de MDA nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.



^ap<0,05 versus Controle

^bp<0,05 versus LH em Pré-RC

^cp<0,05 versus Pré-RC

^dp<0,05 versus D +1, D +10 e D +20 (Mieloma)

^ep< 0,05 versus MM

4.2.2 Níveis de óxido nítrico (NO)

A tabela 4 apresenta a distribuição da concentração basal de NO (antes do regime de condicionamento) nos pacientes com MM, LH, LNH e no grupo controle.

A concentração basal de NO foi significativamente elevada nos pacientes submetidos ao TCTH em relação ao grupo controle.

Tabela 4- Concentração de NO nas doenças em relação à doença de base.

Nitrito	Doença de base				Valor de <i>p</i>
	Controle (n=30)	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	
Estado basal	0,443 ± 0,24	52,92 ± 28,9 ^a	60,02 ± 20,3 ^a	39,80 ± 12,7 ^{a,b}	<0,0001

(Pré-RC)

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 versus Controle. ^b p<0,05 versus LH em Pré-RC

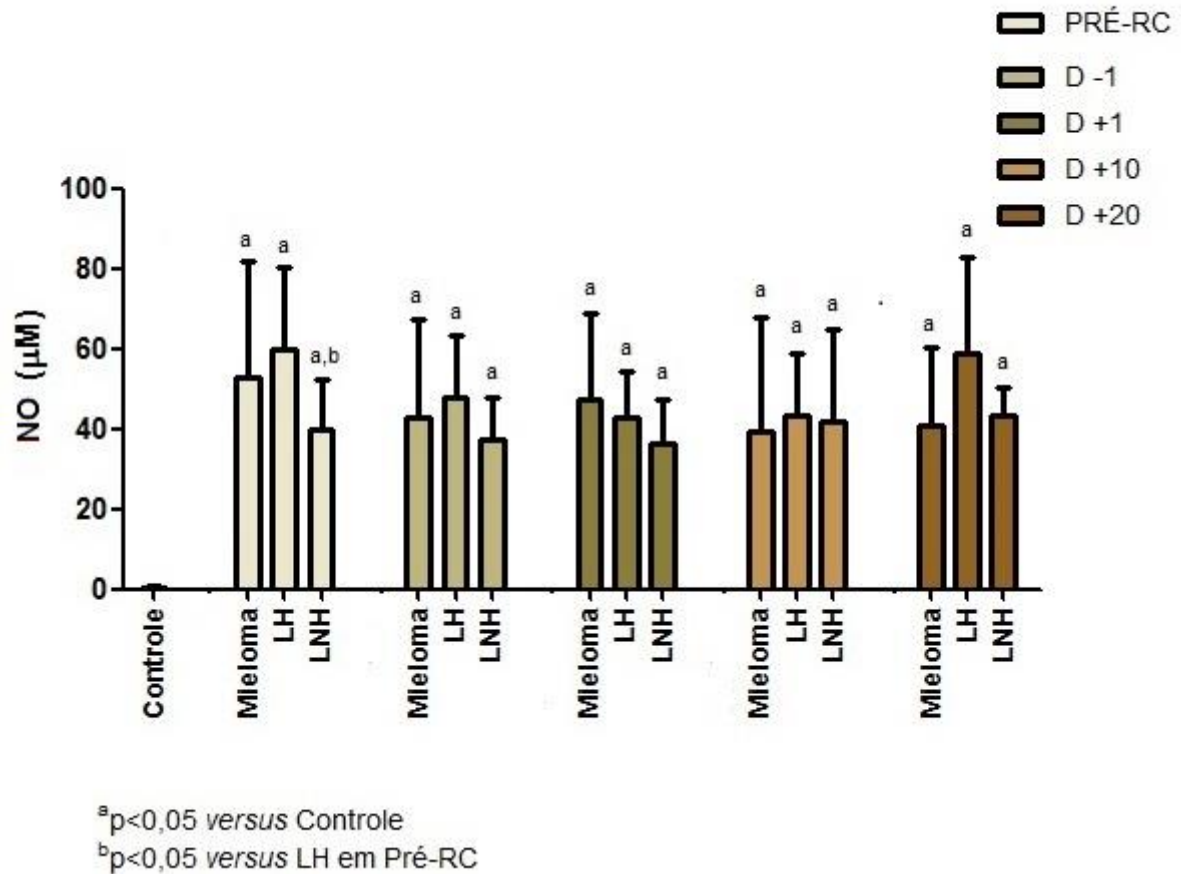
A tabela 5 apresenta as concentrações de NO nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos avaliados. Houve diferença significativa da concentração de NO em relação ao grupo controle em todos os momentos analisados e em todos os grupos de pacientes. Não houve diferença entre todos os momentos do TCTH nos três grupos de pacientes (p=0,51 para MM, p=0,083 para LH e p=0,784 para LNH). Também não houve diferença entre as doenças em momentos específicos (p>0,05).

Tabela 5- Concentrações de NO nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.

	Momentos					Controle (n=30)
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	
MM (n=17)	52,92 ± 28,9 ^a	42,79 ± 4,4 ^a	47,39 ± 21,6 ^a	39,48 ± 28,4 ^a	40,91 ± 19,2 ^a	0,443 ± 0,24
LH (n=10)	60,02 ± 20,3 ^a	48,05 ± 15,5 ^a	43,03 ± 11,1 ^a	43,15 ± 15,6 ^a	59,02 ± 23,7 ^a	0,443 ± 0,24
LNH (n=10)	39,80 ± 12,6 ^{a,b}	37,40 ± 10,5 ^a	36,33 ± 10,9 ^a	41,87 ± 23,1 ^a	43,21 ± 6,97 ^a	0,443 ± 0,24

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 versus Controle. ^b p<0,05 versus LH em Pré-RC

Figura 4- Concentrações de NO nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.



4.2.3 Atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT)

A tabela 6 apresenta a distribuição da atividade basal de catalase nos pacientes com MM, LH, LNH e no grupo controle.

Foi possível observar que as concentrações basais de catalase foram significativamente elevadas nos pacientes submetidos ao TCTH com Mieloma, LH e LNH em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos de pacientes ($p > 0,05$).

Tabela 6- Atividade basal de catalase em relação à doença de base.

Catalase	Doença de base				Valor de <i>p</i>
	Controle (n=30)	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	
Estado basal (Pré-RC)	121,3 ± 123,4	299,3 ± 128 ^a	254,1 ± 96,5 ^a	263,1 ± 85,1 ^a	<0,0001

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 *versus* Controle.

A tabela 7 apresenta a atividade de catalase nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos avaliados. O comportamento da atividade da enzima foi semelhante em todos os momentos do TCTH. Houve redução significativa da atividade de catalase no momento D -1 em relação ao estado basal (p= 0,0068 para Mieloma, p=0,012 para LH e p<0,0001 para LNH). Após o TCTH, a atividade de catalase foi recuperada em relação ao momento D -1, no momento D +20 para pacientes com Mieloma e LH e no momento D +10 para pacientes com LNH.

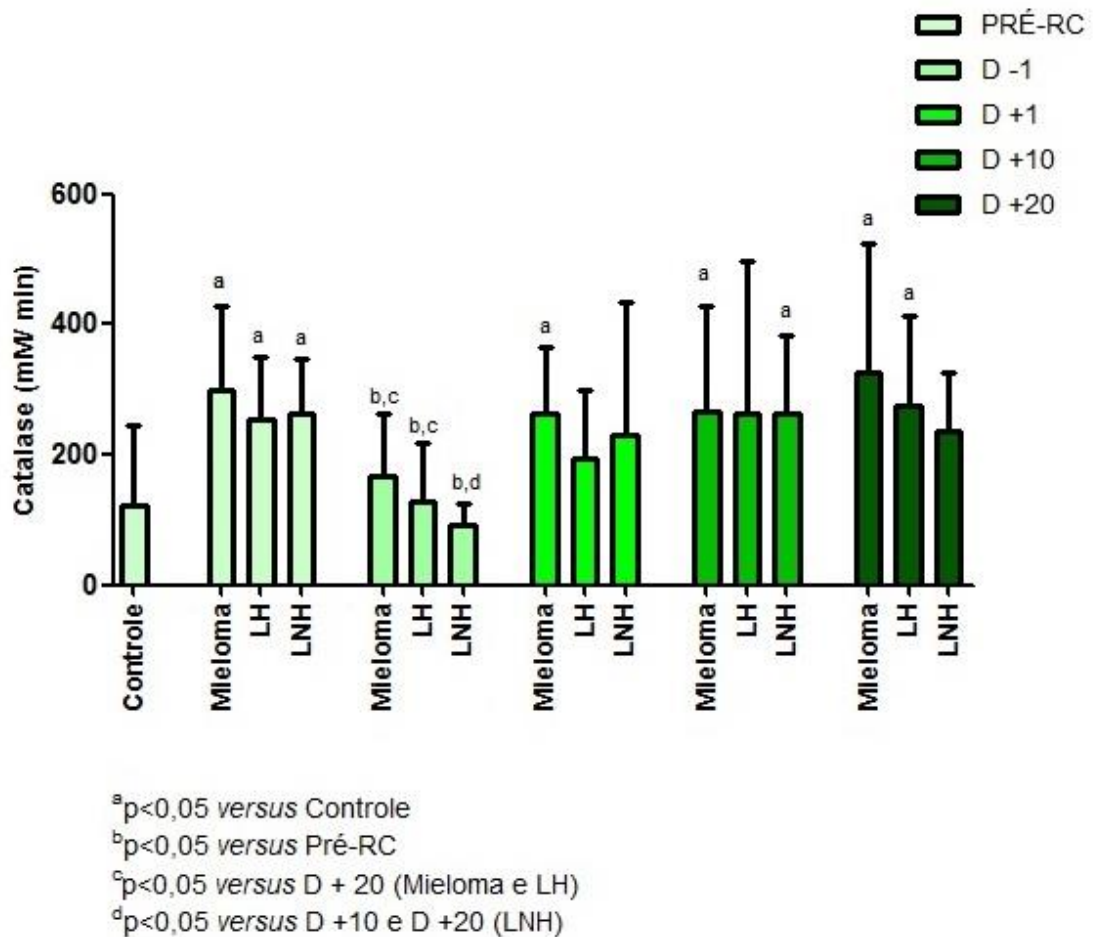
Não houve diferença entre as doenças em momentos específicos (p>0,05).

Tabela 7- Atividade de catalase nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.

	Momentos					Controle (n=30)
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	
MM (n=17)	299,3 ±128 ^a	166,9 ±95,6 ^{b,c}	264,0 ±101,5 ^a	266,4 ±161,1 ^a	325,4 ±197,1 ^a	121,3 ±123,4
LH (n=10)	254,1 ±96,5 ^a	127,6 ±91,4 ^{b,c}	192,9 ±105,1	262,9 ±234,6	276,3 ±136,7 ^a	121,3 ±123,4
LNH (n=10)	263,1 ±85,14 ^a	91,24 ±33,28 ^{b,d}	231,1 ±201,4	263,5 ±118,0 ^a	235,9 ±90,8	121,3 ±123,4

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 *versus* Controle. ^b p<0,05 *versus* momento Pré-RC. ^c p<0,05 *versus* momento D +20. ^d p<0,05 *versus* momentos D +10 e D +20.

Figura 5- Concentração de catalase nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.



4.2.4 Atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx)

A tabela 8 apresenta a distribuição da concentração basal de GPx nos pacientes com MM, LH, LNH e no grupo controle.

A concentração de GPx dos pacientes não diferiu significativamente da concentração do controle. Também não foi observada diferença entre os grupos de pacientes ($p>0,05$).

Tabela 8- Concentração basal de GPx em relação a doença de base.

Glutaciona Peroxidase	Doença de base				
	Controle (n=30)	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	Valor de <i>p</i>
Estado basal (Pré-RC)	359,1 ±161,2	386,4 ±147,2	419,8 ±204,8	325,0 ±133,3	>0,05

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão.

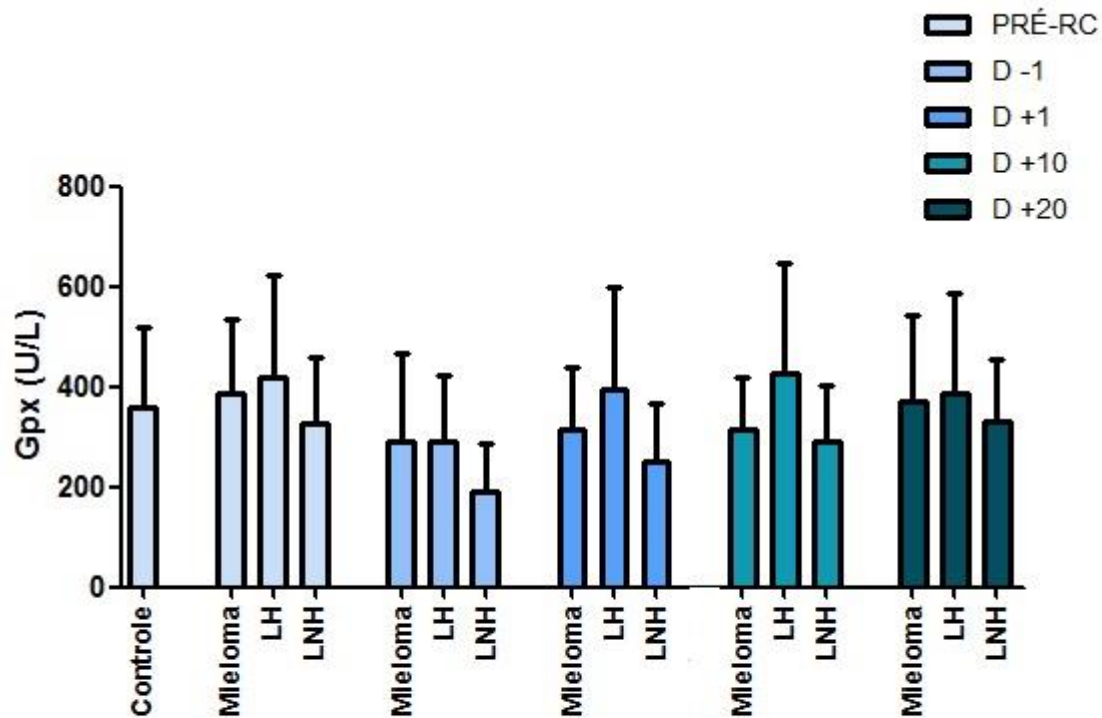
A tabela 9 apresenta as concentrações de GPx nos pacientes com Mieloma e Linfoma em todos os momentos avaliados. Não houve diferença estatística entre as dosagens de GPx nos pacientes em relação ao grupo controle. Também não houve diferença entre todos os momentos do TCTH nos três grupos de pacientes ($p=0,2820$ para Mieloma, $p=0,546$ para LH e $p=0,0818$ para LNH) e entre as doenças em momentos específicos ($p>0,05$).

Tabela 9- Concentração de GPx nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.

	Momentos					
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	Controle (n=30)
MM (n=17)	386,4 ±147,2	290,6 ±174,4	315,5 ±122,3	314,8 ±105,8	369,3 ±174,1	359,1 ±161,2
LH (n=10)	419,8 ±204,8	291,3 ±130,8	393,7 ±205	427,8 ±217	385,1 ±202,6	359,1 ±161,2
LNH (n=10)	325,0 ±133,3	190,3 ±97,3	251,2 ±116,6	291,2 ±112,1	328,9 ±124,2	359,1 ±161,2

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão.

Figura 6- Concentração de GPx nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos do TCTH.



4.2.5 Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)

A tabela 10 apresenta a distribuição da atividade basal de SOD nos pacientes com MM, LH, LNH e no grupo controle.

Foi possível observar que as concentrações basais de SOD foram significativamente reduzidos nos pacientes submetidos ao TCTH com MM em relação ao grupo controle ($p=0,04$). Os pacientes com LH e LNH apresentaram atividade basal de SOD semelhante ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos de pacientes ($p>0,05$).

Tabela 10- Atividade basal de SOD em relação à doença de base.

SOD	Doença de base				Valor de <i>p</i>
	Controle	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	
Estado basal (Pré-RC)	3200 ± 1527	1996 ± 1233 ^a	2811 ± 1227	2834 ± 1021	0,04

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a $p < 0,05$ versus Controle.

A tabela 11 apresenta a atividade de SOD nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos avaliados. Houve redução significativa das concentrações de SOD nos pacientes com MM no Pré-RC e no D -1, com LH no D -1 e com LNH no D -1 em relação ao grupo controle. Nos pacientes com MM, houve redução significativa da atividade de SOD no momento D-1 em relação ao estado basal ($p=0,0002$) e aos demais momentos.

Para os pacientes dos grupos LH e LNH, a atividade de SOD foi significativamente reduzida no momento D -1 em relação ao estado basal ($p < 0,01$ para LH e $p=0,02$ para LNH). Após o TCTH, observou-se elevação significativa da atividade de SOD em relação ao momento D -1 somente no momento D +1 para os pacientes com LH e nos momentos D +1 e D +10 para os pacientes com LNH.

Em todos os momentos após o TCTH, as concentrações desse biomarcador assemelharam-se ao estado basal para os três grupos de pacientes ($p > 0,05$).

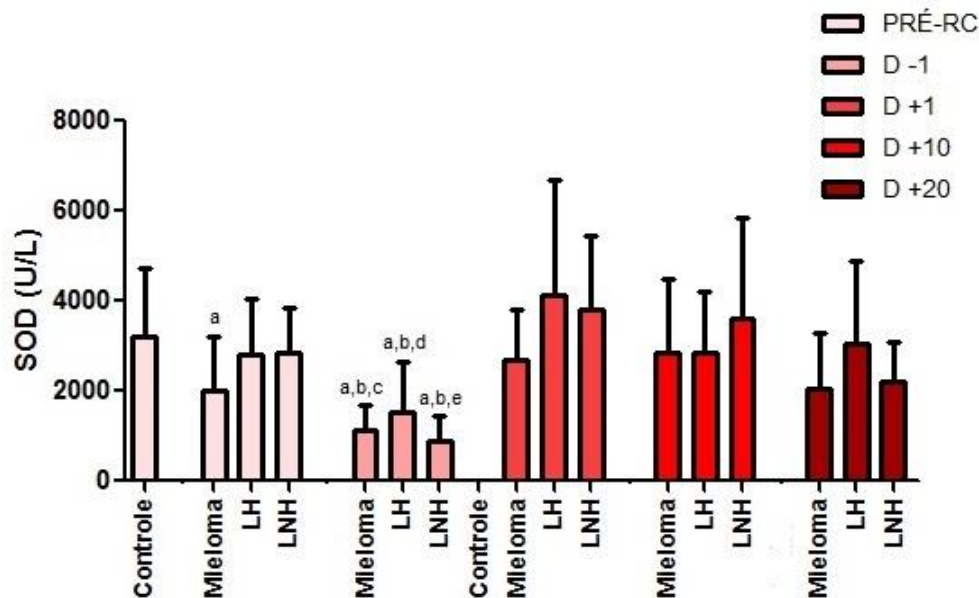
Não houve diferenças entre as doenças em momentos específicos ($p > 0,05$).

Tabela 11- Atividade de SOD nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.

Momentos						
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	Controle (n=30)
MM (n=17)	1996 ±1233 ^a	1120 ±561,5 ^{a,b,c}	2707±1120	2856 ±1620	2036 ±1240	3200 ±1527
LH (n=10)	2811 ±1227	1543 ±1123 ^{a,b,d}	4132 ±2562	2836 ±1388	3061 ±1843	3200 ±1527
LNH (n=10)	2834 ±1021	900,1 ±542,8 ^{a,b,e}	3817 ±1630	3619 ±2240	2200 ±900,0	3200 ±1527

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 versus Controle. ^b p<0,05 versus momento Pré-RC. ^c p<0,05 versus momentos D +1, D +10 e D +20. ^d p<0,05 versus momento D +1. ^e p<0,05 versus momentos D +1 e D +10.

Figura 7- Atividade de SOD nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.



^ap<0,05 versus Controle

^bp<0,05 versus Pré-RC

^cp<0,05 versus D +1, D +10 e D +20 (Mieloma)

^dp<0,05 versus D +1 (LH)

^ep<0,05 versus D +1 e D +10 (LNH)

4.3 Avaliação do Índice de Dano no DNA

A tabela 12 apresenta a distribuição do índice de dano nos pacientes com MM, LH, LNH e no grupo controle.

Foi possível observar que os valores de ID foram significativamente elevados nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos de pacientes ($p > 0,05$).

Tabela 12- Índice de dano em relação a doença de base.

Índice de dano	Doença de base				Valor de <i>p</i>
	Controle (n=30)	MM (n=17)	LH (n=10)	LNH (n=10)	
Estado basal (Pré-RC)	4,90 ± 1,92	17,24 ± 5,99 ^a	12,90 ± 8,27 ^a	16,30 ± 7,27 ^a	<0,0001

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a $p < 0,05$ versus Controle.

A tabela 13 apresenta os valores de ID nos pacientes com MM, LH e LNH em todos os momentos avaliados. Em todos os grupos de pacientes, o padrão de lesão no DNA foi semelhante em todos os momentos do TCTH. Houve elevação significativa do ID nos momentos D -1 e D +1 em relação ao estado basal ($p < 0,0001$) para todos os grupos. Após o TCTH, os valores de ID assemelharam-se aos do estado basal, a partir no momento D +20 para os pacientes com MM e LH e a partir do momento D +10 para os pacientes com LNH.

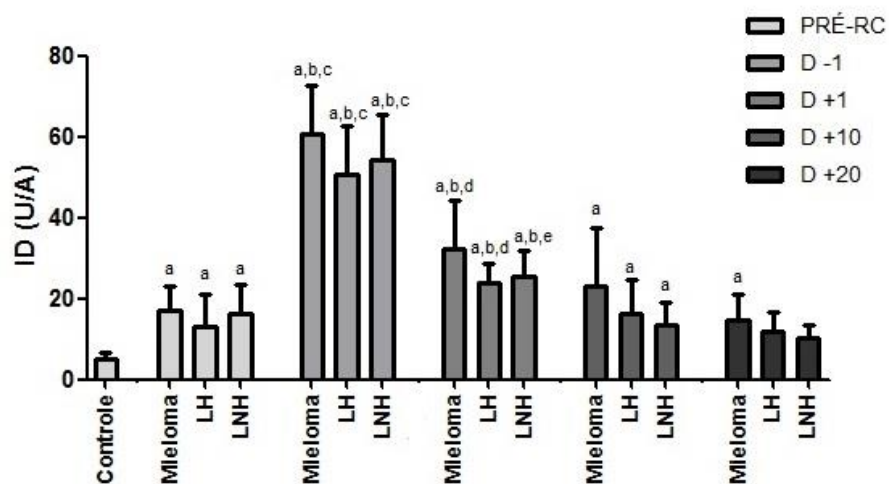
Não houve diferença para os valores de ID entre as doenças em momentos específicos ($p > 0,05$).

Tabela 13- Valores de ID nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.

Momentos						
	PRÉ-RC	D -1	D +1	D +10	D +20	Controle (n=30)
MM (n=17)	17,24 ±5,99 ^a	60,82 ±11,8 ^{a,b,c}	32,29 ±12 ^{a,b,d}	22,88± 14,6 ^a	14,47 ±6,63 ^a	4,90 ±1,92
LH (n=10)	12,90 ±8,17 ^a	50,50 ±11,98 ^{a,b,c}	24,00 ±4,7 ^{a,b,d}	16,30 ±8,3 ^a	11,70 ±5,14	4,90 ±1,92
LNH (n=10)	16,30 ±7,27 ^a	54,10 ±11,19 ^{a,b,c}	25,60 ±6,11 ^{a,b,e}	13,50 ±5,48 ^a	10,40 ±2,98	4,90 ±1,92

MM: Mieloma Múltiplo; LH: Linfoma de Hodgkin; LNH: Linfoma Não Hodgkin. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. ^a p<0,05 versus Controle. ^b p<0,05 versus Pré-RC. ^c p<0,05 versus momentos D +1, D +10 e D +20. ^d p<0,05 versus D +20. ^e p<0,05 versus D +10 e D +20.

Figura 8- Valores de ID nos pacientes com Mieloma Múltiplo, Linfoma de Hodgkin e Linfoma Não Hodgkin em todos os momentos do TCTH.



^ap<0,05 versus Controle

^bp<0,05 versus Pré-RC

^cp<0,05 versus D +1, D +10 e D +20

^dp<0,05 versus D +20

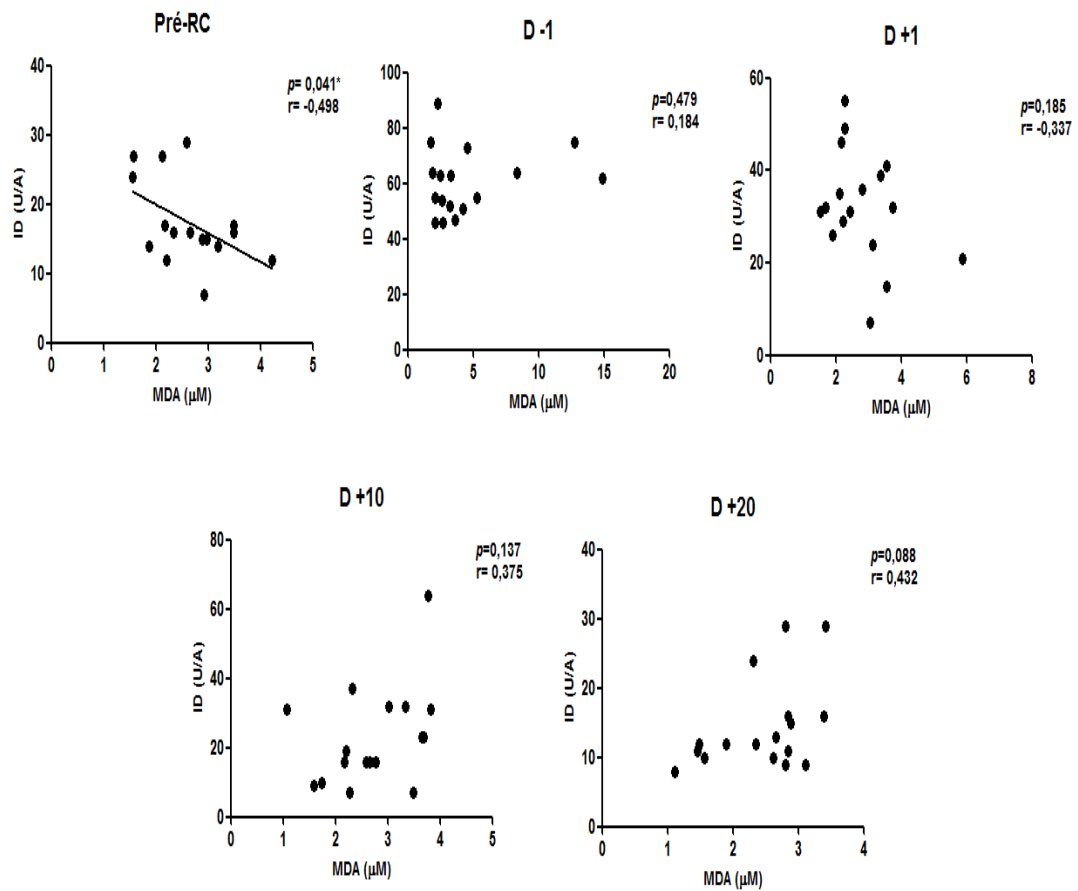
^ep<0,05 versus D +10 e D +20

4.4 Correlação entre Índice de Dano ao DNA e marcadores de estresse oxidativo

4.4.1 Índice de Dano (ID) versus MDA

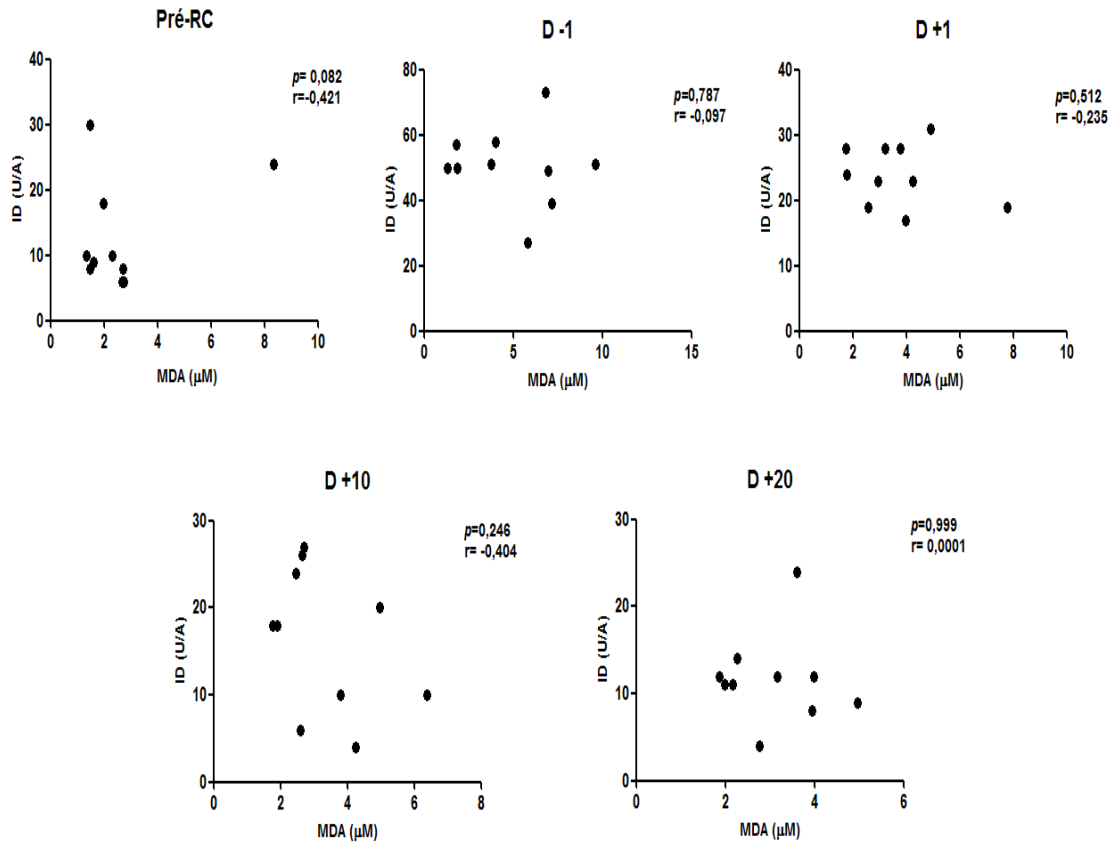
4.4.1.1 Mieloma Múltiplo (n=17)

Figura 9- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.



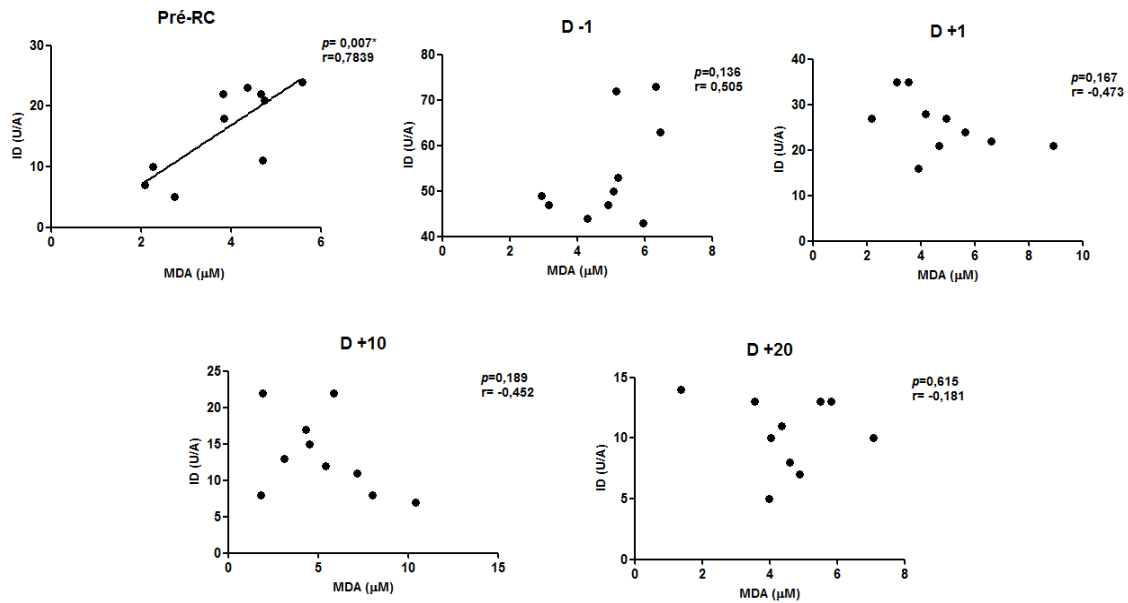
4.4.1.2 Linfoma de Hodgkin (n=10)

Figura 10- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.



4.4.1.3 Linfoma Não Hodgkin (n=10)

Figura 11 - Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.

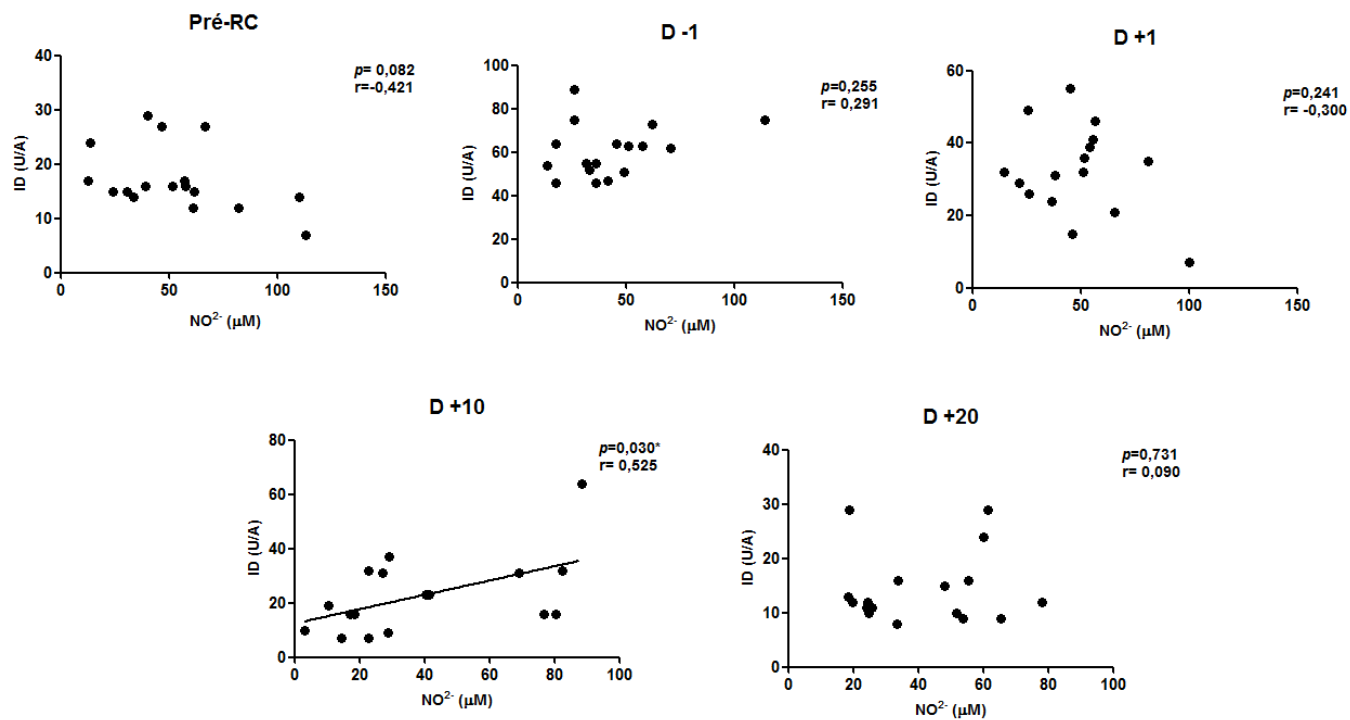


Pelos gráficos de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Malonaldeído (MDA), observa-se que existe correlação significativa ao nível de 5% é no Pré- Regime de condicionamento, para os pacientes com MM e com LNH. No primeiro caso, existe uma correlação negativa e no segundo, uma correlação positiva.

4.4.2 Índice de Dano (ID) versus NO

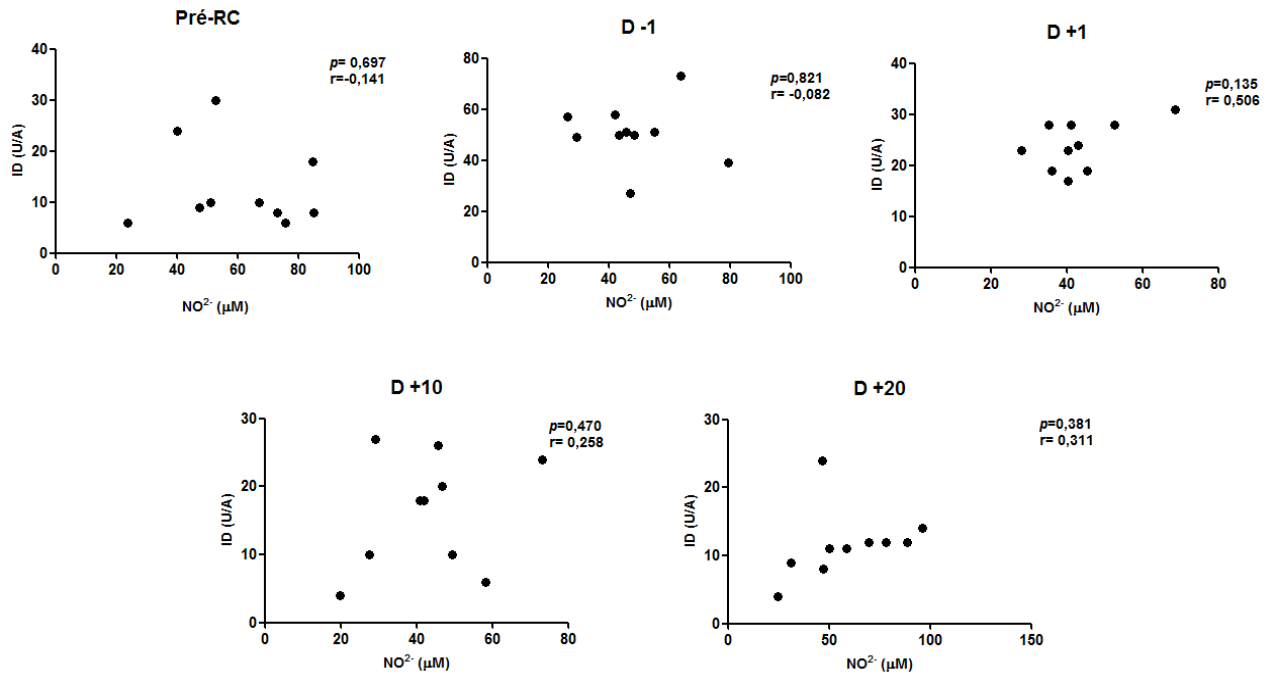
4.4.2.1 Mieloma Múltiplo (n=17)

Figura 12 - Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e NO para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.



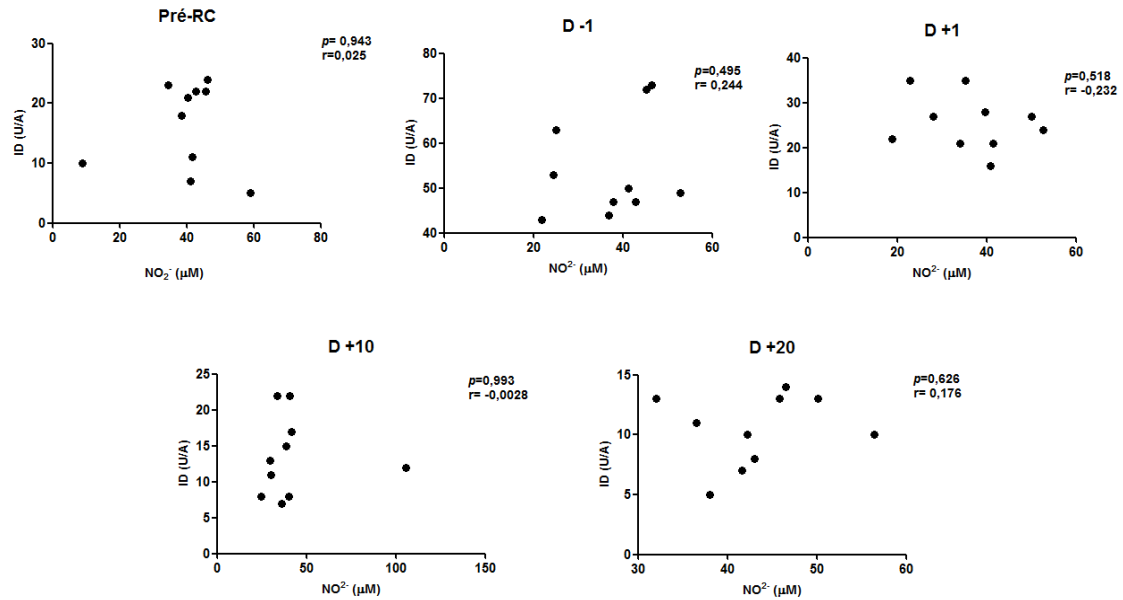
4.4.2.2 Linfoma de Hodgkin (n=10)

Figura 13 - Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e NO para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.



4.4.2.3 Linfoma Não Hodgkin (n=10)

Figura 14- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e NO para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.

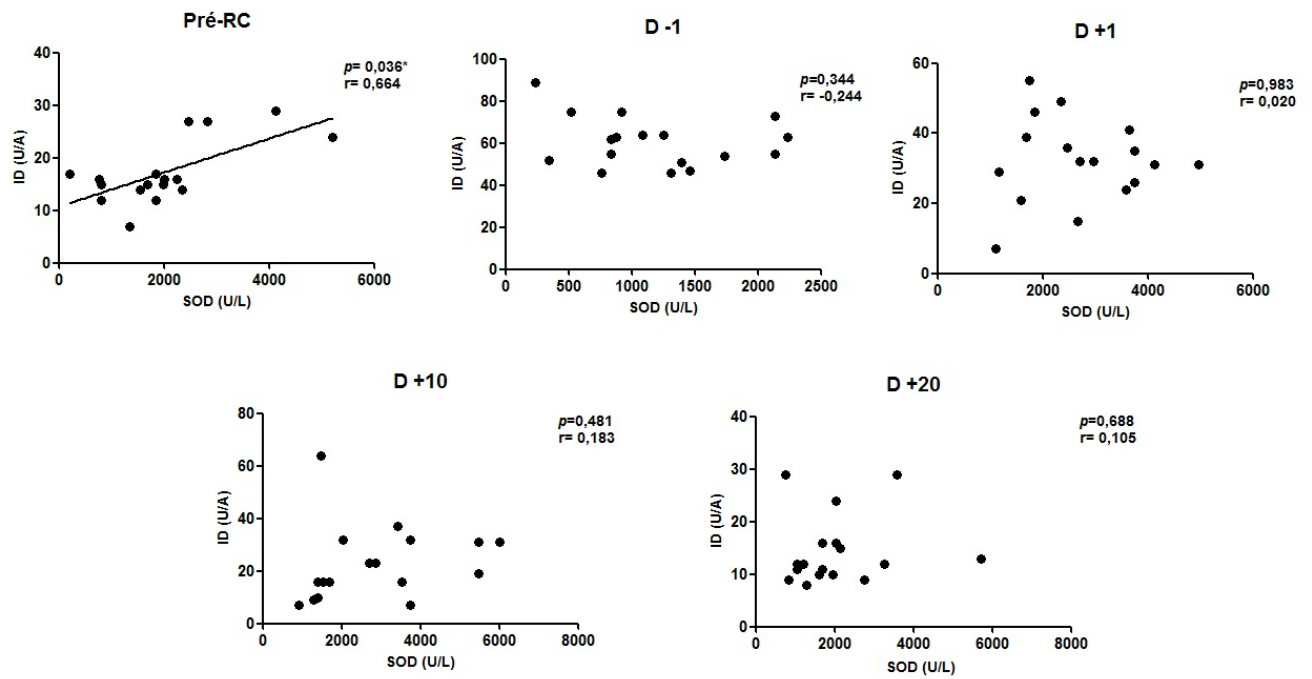


Pelos gráficos de dispersão do Índice de Dano ao DNA e NO, observa-se que a única situação em que existe correlação significativa ao nível de 5% é no D +10, para os pacientes com Mieloma Múltiplo. No caso, existe uma correlação positiva.

4.4.3 Índice de Dano (ID) versus SOD

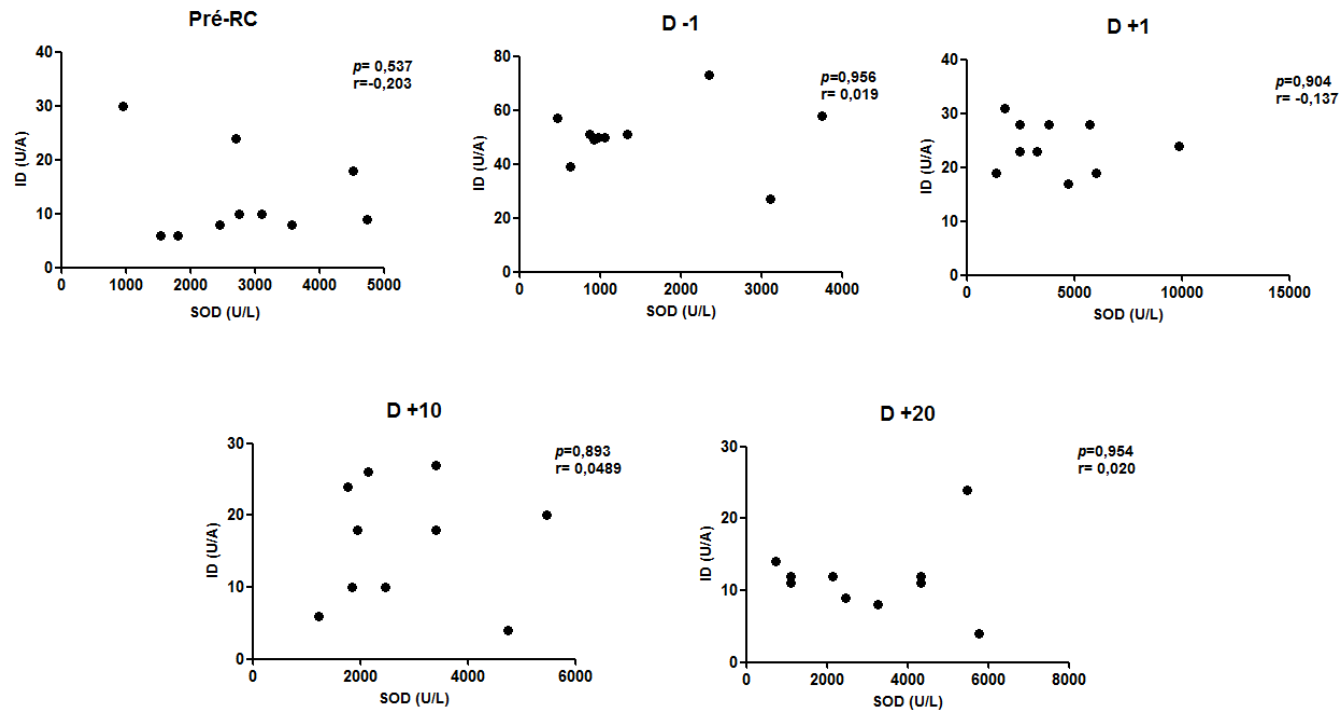
4.4.3.1 Mieloma Múltiplo (n=17)

Figura 15- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.



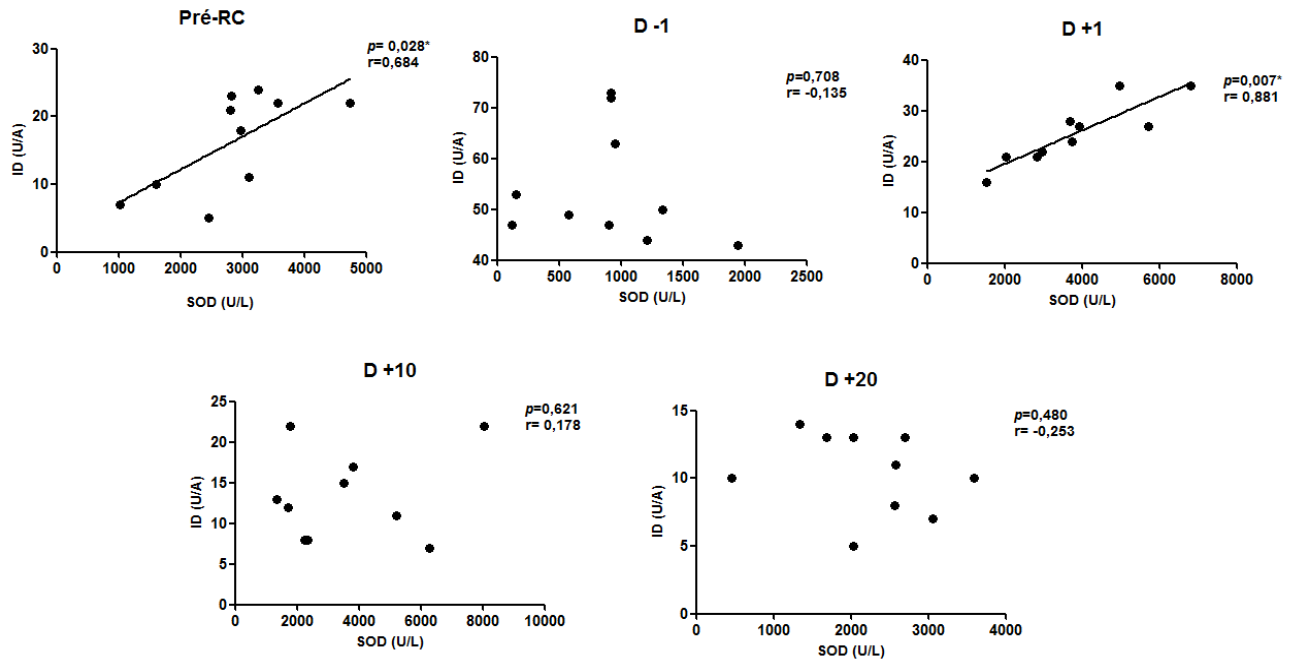
4.4.3.2 Linfoma de Hodgkin (n=10)

Figura 16- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.



4.4.3.3 Linfoma Não Hodgkin (n=10)

Figura 17- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Superóxido Dismutase (SOD) para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.

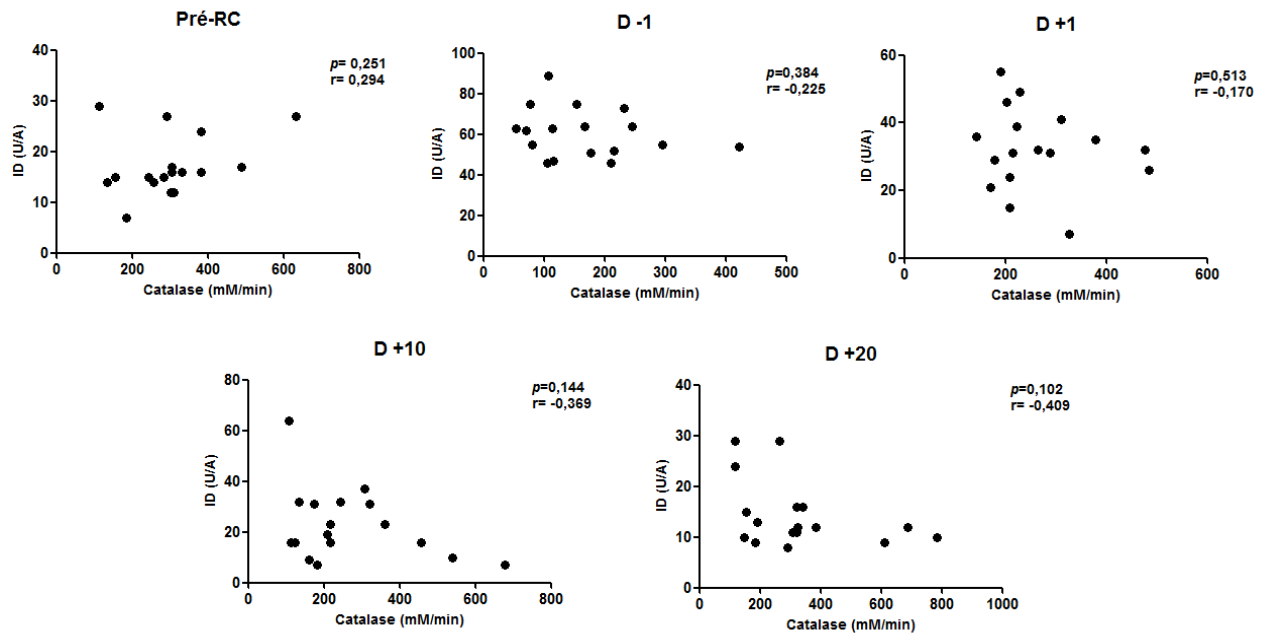


Pelos gráficos de dispersão do Índice de Dano ao DNA e SOD, observa-se que existe correlação significativa ao nível de 5% no Pré- Regime de condicionamento, para os pacientes com MM e no Pré- Regime de condicionamento e em D +1, para os pacientes com LNH.

4.4.4 Índice de Dano (ID) versus Catalase (CAT)

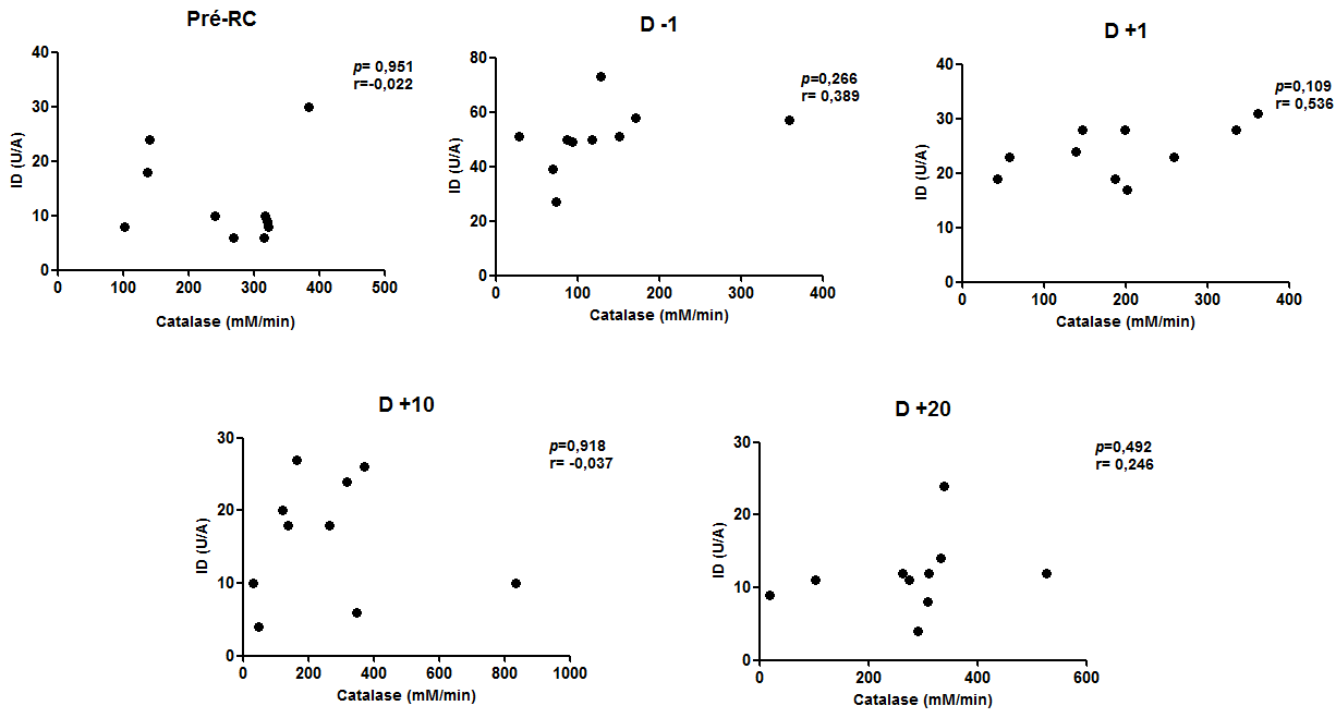
4.4.4.1 Mieloma Múltiplo (n=17)

Figura 18- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.



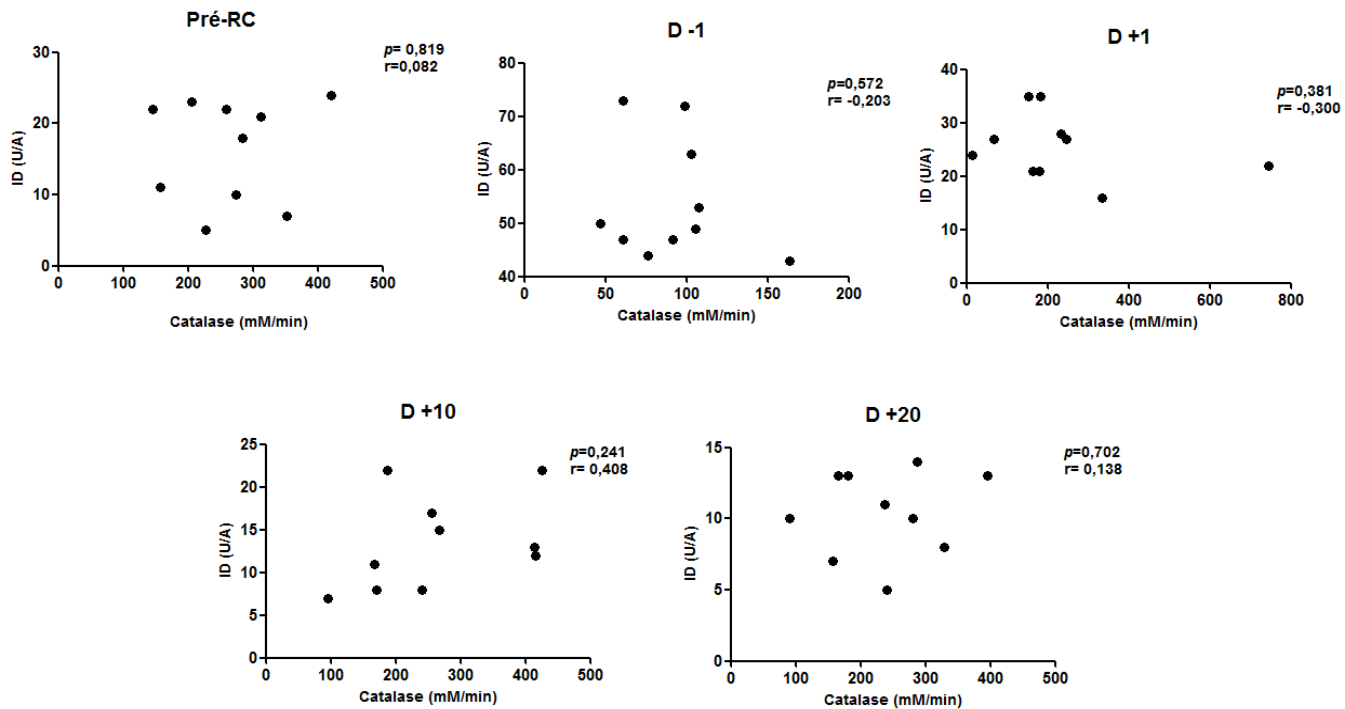
4.4.4.2 Linfoma de Hodgkin (n=10)

Figura 19- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.



4.4.4.3 Linfoma Não Hodgkin (n=10)

Figura 20- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Catalase (CAT) para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.

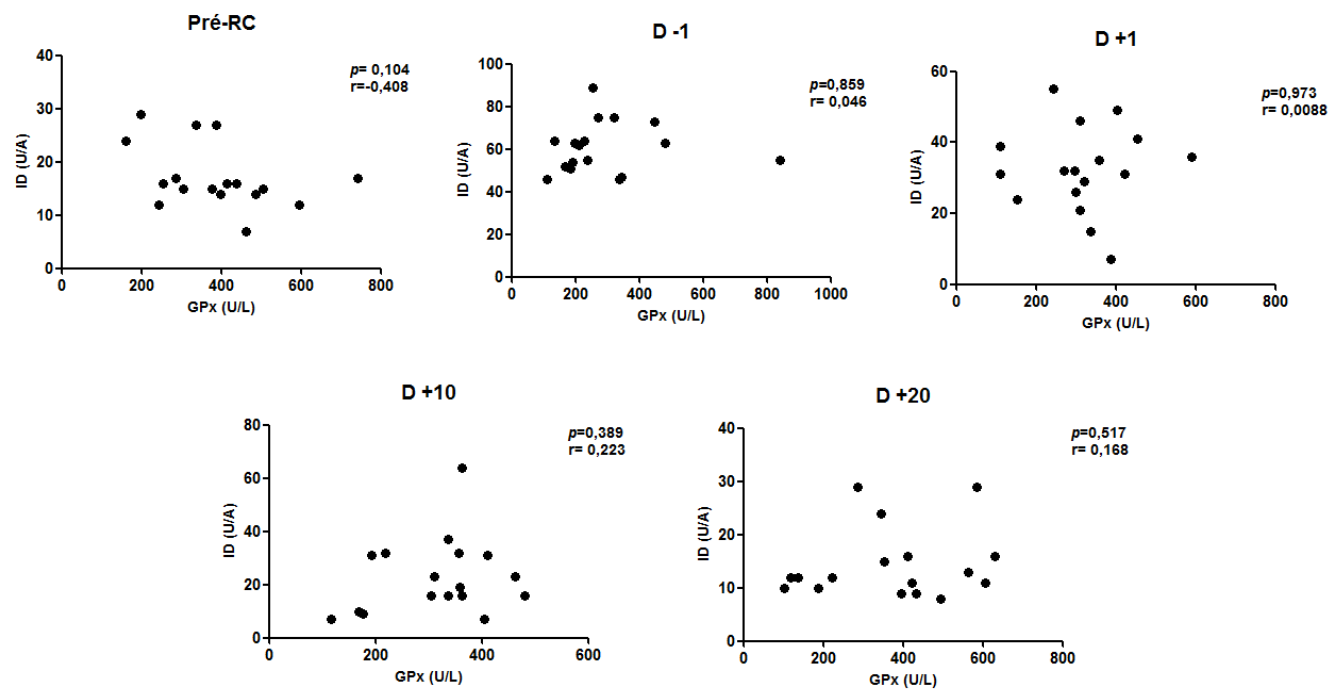


Pelos gráficos de dispersão do Índice de Dano ao DNA e CAT, observa-se que não houve correlação significativa ao nível de 5% para nenhuma doença, em nenhum momento analisado.

4.4.5 Índice de Dano (ID) versus Glutathiona Peroxidase (GPx)

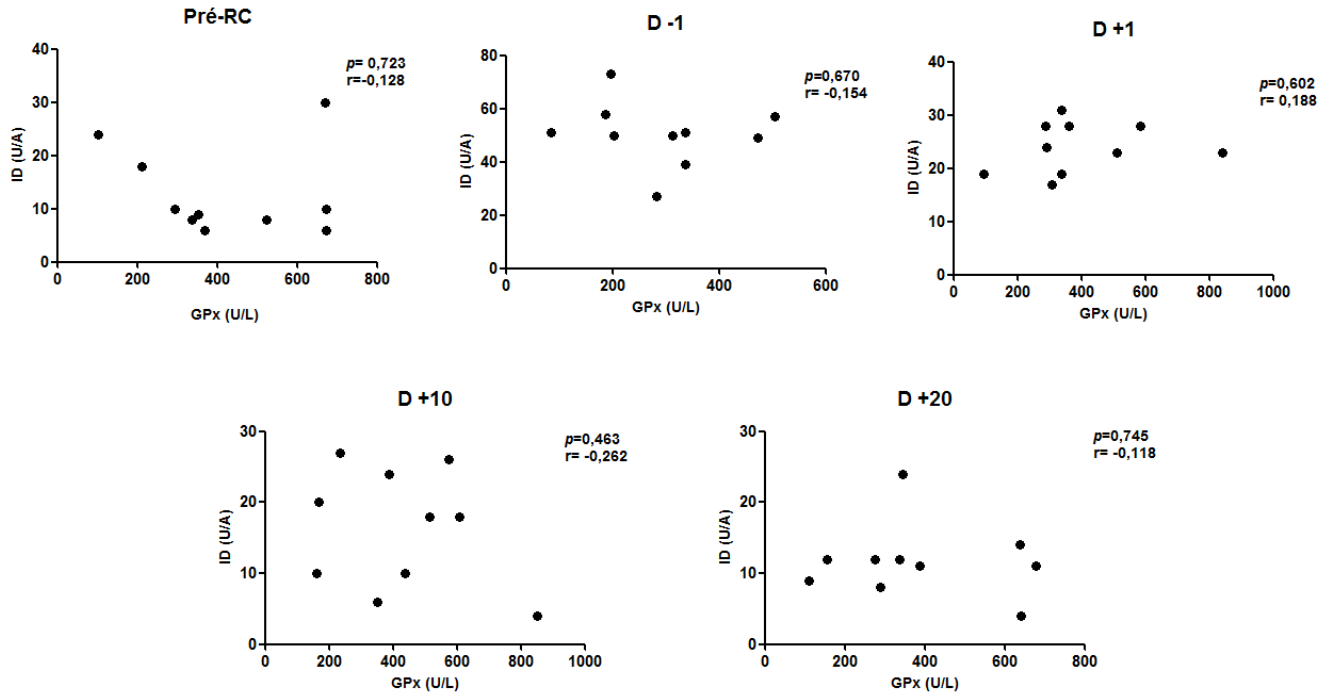
4.4.5.1 Mieloma Múltiplo (n=17)

Figura 21- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutathiona Peroxidase para pacientes com Mieloma Múltiplo nos momentos do TCTH.



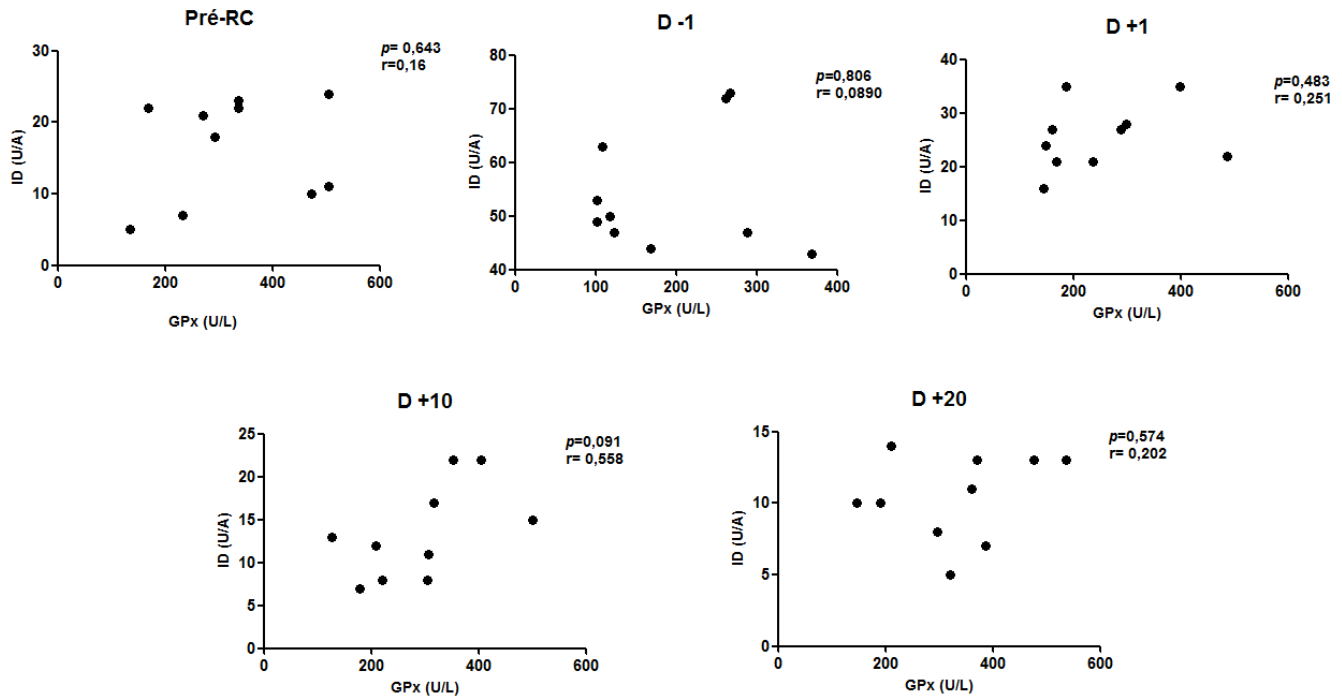
4.4.5.2 Linfoma de Hodgkin (n=10)

Figura 22- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutaciona Peroxidase para pacientes com Linfoma de Hodgkin nos momentos do TCTH.



4.4.5.3 Linfoma Não Hodgkin (n=10)

Figura 23- Gráfico de dispersão do Índice de Dano ao DNA e Glutathiona Peroxidase para pacientes com Linfoma Não Hodgkin nos momentos do TCTH.



Pelos gráficos de dispersão do Índice de Dano ao DNA e GPx, observa-se que não houve correlação significativa ao nível de 5% para nenhuma doença, em nenhum momento analisado.

5 DISCUSSÃO

O procedimento de transplante de células tronco hematopóéticas leva a um aumento do estresse oxidativo, devido ao aumento na produção de radicais livres e depleção de enzimas antioxidantes (DÜRKEN *et al.*, 1995; CLEMENS *et al.*, 1997; SARI *et al.*, 2008; SABUNCUOĞLU *et al.*, 2012). São poucos os relatos na literatura que avaliaram conjuntamente a ocorrência de estresse oxidativo e genotoxicidade em pacientes submetidos a TCTH autólogo.

No presente estudo, as concentrações de MDA apresentaram-se significativamente elevadas em todos os grupos de pacientes em relação ao grupo controle no decorrer de cada etapa do TCTH. Em relação às fases do processo do TCTH verificou-se uma elevação significativa das concentrações de MDA no momento D -1 em pacientes com MM em relação a todos os momentos e ao grupo controle e concentração desse biomarcador após o TCTH assemelhando-se ao Pré-RC. Para os pacientes com LH, as concentrações de MDA aumentaram significativamente no momento D -1 em relação ao Pré-RC não havendo redução significativa desse biomarcador após o TCTH. Para os pacientes com LNH, houve um aumento nas concentrações de MDA em todos os momentos em relação ao Pré-RC, mas que não foram significantes. O aumento do MDA na fase de pré-RC é de causa multifatorial, provavelmente pela doença de base e/ou a outros fatores tais como tratamentos prévios, uso de medicamentos, entre outros (WHITE *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Gonçalves e colaboradores (2009) que demonstraram um aumento da concentração de MDA em relação ao grupo controle, na fase de antes e depois do RC, em pacientes portadores de MM, LH, LNH, LMA, LLA e tumor de Ewing submetidos a TCTH. Em nosso estudo, a elevação das concentrações de MDA foi mais pronunciada 24 horas após o regime mieloablativo (D-1), demonstrando o efeito da quimioterapia no aumento dos produtos da peroxidação lipídica (MDA) potencializando o processo do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica pode causar alterações na integridade estrutural e funcional das membranas celulares e quando induzida por radicais livres tem sido implicada na patogênese e progressão de diversas doenças, inclusive o câncer (SAINTOT *et al.*, 1996). Apesar do tratamento com a quimioterapia esteja associada com a formação de espécies reativas de oxigênio e com a diminuição de antioxidantes, os mecanismos pelo quais as drogas citostáticas afetam o sistema antioxidante em seres humanos ainda não estão bem esclarecidos (SARI *et al.*, 2008).

Em relação a concentração de óxido nítrico foi verificado também um aumento significativo em relação ao grupo controle, porém sem diferença estatisticamente significativa

entre os grupos. Assim como no MDA, a doença ou os processos que envolvem o pré-TCTH estão interferindo na concentração plasmática de NO. A avaliação da concentração do NO em diferentes etapas do TCTH autólogo é rara na literatura. Um estudo realizado por Sari e colaboradores (2008) avaliou a concentração de NO em 25 pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea, com Leucemia Mielóide Aguda (LMA, n=10), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC, n=3), Linfoma Não Hodgkin (n=2) e Mielofibrose (n=1), tendo como resultados um aumento nas concentrações de NO após o transplante (D +30) em relação a D -1 em todos os pacientes.

Em relação às enzimas antioxidantes, a concentração da enzima catalase apresentou-se significativamente diminuída em D -1 em relação ao Pré-RC para os pacientes com MM, LH e LNH. Após o transplante, a atividade da enzima foi recuperada mais tardiamente (D +20) nos pacientes com MM e LH, enquanto para os pacientes com LNH, a recuperação ocorreu em D +10, em relação ao momento D -1. Resultados semelhantes foram encontrados por Sabuncuoğlu e colaboradores (2012) que obtiveram uma redução das concentrações dessa enzima após o RC, D +7 e D +14 quando comparados ao Pré-RC (D -10). Os quimioterápicos utilizados para mielossupressão no RC causam estresse oxidativo e, na tentativa de diminuir os danos causados por esse processo, há um maior consumo de enzimas anti-oxidantes, como a catalase, justificando a diminuição da atividade desse biomarcador, principalmente após o RC (D -1).

A concentração da enzima glutathiona peroxidase não diferiu significativamente nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle. Também não houve diferença estatística entre todos os momentos nos três grupos de pacientes. Assim, essa enzima não representou um parâmetro importante para a avaliação do estresse oxidativo em pacientes submetidos a TCTH autólogo.

A concentração da SOD apresentou-se significativamente reduzida no Pré-RC em pacientes com MM submetidos ao TCTH autólogo em relação ao grupo controle. Em D -1 houve redução significativa para os pacientes portadores de MM em relação à D +1, D +10 e D +20, para os pacientes com LH em relação a D +1 e para os pacientes com LNH, em relação a D +1 e D +10. Sabuncuoğlu e colaboradores (2012) obtiveram resultados semelhantes em pacientes submetidos a transplante alogênico portadores de LMC (n=5), LMA (n=3), Anemia Aplástica (n=3), Anemia de Fanconi (n=3), SMD (n=1), Talassemia major (n=1), osteopetrose (n=1), síndrome hipereosinofílica (n=1), onde obtiveram significativa redução das concentrações de SOD após o RC. A diminuição da concentração da SOD pode indicar um aumento de seu consumo em função do estresse oxidativo, na tentativa

de diminuir os danos causados pelos radicais livres. A participação da SOD no mecanismo de defesa contra estresse oxidativo celular foi comprovada por meio de análises *in vitro*, onde foi demonstrado que a enzima inibe a lesão do DNA celular provocada pelo radical hidroxil e mediada pelo ferro, o que sugere também a participação do radical superóxido no processo de agressão celular (ARUOMA *et al.*, 1989).

No presente estudo o índice de dano ao DNA foi estatisticamente elevado nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle, no Pré- RC. Portanto a genotoxicidade foi determinada em todas as patologias (MM, LH ou LNH) em estudo. Em D -1 houve aumento estatisticamente significativo em relação a todos os outros momentos analisados e em relação ao grupo controle. Observou-se uma queda do ID assemelhando-se aos do Pré-RC, a partir do momento D +20 para os pacientes com MM e LH e a partir do momento D +10 para os pacientes com LNH. Este dado está corroborando com os resultados obtidos do perfil de estresse oxidativo, pois o mesmo pode levar a danos no DNA. Os radicais livres podem reagir com todos os componentes da molécula de DNA (bases de purina e pirimidina, e também a desoxirribose) podendo induzir alterações permanentes do material genético (VALKO *et al.*, 2007). Há poucos relatos na literatura que avaliaram conjuntamente o dano oxidativo e a genotoxicidade causadas pelo transplante de células tronco hematopoéticas.

Em relação as análises das correlações entre os parâmetros de estresse oxidativo e o índice de dano ao DNA, foi possível observar correlação negativa entre MDA e ID em pacientes com MM no Pré- RC. Além disso, verificou-se uma correlação positiva entre MDA e ID em pacientes com LNH no Pré-RC, entre NO e ID no D +10 em pacientes com MM e entre SOD e ID em pacientes com MM no Pré-RC e em pacientes com LNH no Pré- RC e no D +1. Portanto os dados são conflitantes com relação à associação de alguns marcadores do estresse oxidativo, fato atribuído a vários fatores dentre os quais a casuística, tipo de patologia, regime de condicionamento, entre outros.

O TCTH é uma modalidade terapêutica cada vez mais utilizada e indicada para diversas doenças. No entanto, mesmo com os avanços científicos na área, o sucesso do transplante é às vezes limitado pela toxicidade e mortalidade inerentes ao processo. Os dados do presente estudo demonstram que os marcadores do estresse oxidativo e de genotoxicidade podem ser utilizados como biomarcadores precoces de toxicidade auxiliando no monitoramento da evolução e no prognóstico do paciente.

CONCLUSÃO

- O estresse oxidativo foi verificado em todas as fases do TCTH, no MM, LH e LNH em relação ao grupo controle;
- O estresse oxidativo foi observado principalmente no momento D -1 em relação ao estado basal e aos demais momentos para todos os grupos de pacientes.
- As concentrações de MDA foram significativamente elevadas nos pacientes submetidos ao TCTH em relação ao grupo controle em todos os momentos analisados. Para todos os pacientes houve elevação significativa de MDA após o RC, sendo em relação a todos os momentos para os pacientes com MM, em relação ao estado basal para os pacientes com LH e em relação ao controle para os pacientes com LNH.
- As concentrações de óxido nítrico foram significativamente elevadas nos pacientes submetidos ao TCTH em relação ao grupo controle em todos os momentos analisados. Pacientes com LNH apresentaram diminuição significativa na concentração de NO em relação aos pacientes com LH no pré-RC. Entre os grupos de pacientes, não houve diferença significativa para os níveis basais desse biomarcador.
- As concentrações basais de catalase foram significativamente elevadas nos pacientes submetido ao TCTH em relação ao grupo controle. Houve redução significativa da atividade de catalase no momento D -1 em relação ao estado basal para todos os pacientes. Após o TCTH, a atividade de catalase foi recuperada em D +20 para pacientes com MM e LH e em D +10 para pacientes com LNH. Não houve diferença entre as doenças em momentos específicos.
- A concentração de GPx dos pacientes não diferiu significativamente da concentração do controle em nenhum momento, nem entre os grupos de pacientes, nem entre os momentos avaliados.
- Nos pacientes com MM, observamos redução significativa da atividade de SOD no momento basal em relação ao controle e após o RC em relação aos demais momentos. Para os pacientes dos grupos LH e LNH, a atividade de SOD foi significativamente reduzida após o RC em relação ao estado basal. Não houve diferença entre os grupos de pacientes.

- O ID foi significativamente elevado nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle. Houve elevação significativa do ID em D -1 e D +1 em relação ao estado basal para todos os grupos de pacientes. Após o TCTH, os valores de ID assemelharam-se aos do estado basal.
- As correlações obtidas entre os parâmetros de estresse oxidativo e ID apresentaram-se conflitantes, levando a um questionamento sobre a possibilidade de haverem outros fatores envolvidos na genotoxicidade durante o TCTH. O parâmetro de estresse oxidativo que apresentou melhor correlação com o ID foi a enzima antioxidante SOD.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- APPERLEY, J.; CARRERAS, E.; GLUCKMAN, E.; MASSZI, T. **EBMT-ESH handbook**. 6. ed., 2012.
- ANDERLINI, P.; DONATO, M.; CHAN, K.W.; HUH, Y.O.; GEE, A.P.; LAUPPE, M.J.; CHAMPLIN, R.E.; KÖRBLING, M. Allogeneic blood progenitor cell collection in normal donors after mobilization with filgrastim: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **Transfusion**, v. 39, p. 555-560, 1999.
- ANDRADE, V.M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. Comet assay using Mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutat Res-Gen Toxicol Environ Mutag**. v. 560, p. 57-67, 2004.
- ANDREAZZA, A.C. **Estresse oxidativo, conteúdo de S100B e ensaio Cometa no sangue de pacientes com Transtorno do Humor Bipolar 2006**. 109 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ARMITAGE, J.O. Bone Marrow Transplantation. **N Engl J Med**, v.330, p. 827-838, 1994.
- ARUOMA, O.I; HALLIWELL, B.; GAJEWSKI, E.; DIZDAROGLU, M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **J Biol Chem**. v.264, p. 20509-20512, 1989.
- ATZPODIEN, J.; GULATI, S.C.; STRIFE, A.; CLARKSON, B.D. Photoradiation models for the clinical ex vivo treatment of autologous bone marrow grafts. **Blood**, v. 70, p. 484-489, 1987.
- AZEVEDO, W; RIBEIRO, M.C.C. Fontes de células-tronco hematopoéticas para transplantes. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 33, p. 381-389, 2000.
- BACH, F.H.; ALBERTINI, R..J.; JOO, P.; ANDERSON, J.L.; BORTIN, M.M. Bone marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. **Lancet**, v. 2 p. 1364-1366, 1968.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 33, n. 2, p. 111-128, ago. 2008.
- BARTH, E.; FISCHER G.; SCHNEIDER, E.M.; MOLDAWER, I.L.; GEORGIEFF, M.; WEISS, M. Peaks of endogenous G-CSF serum concentrations are followed by an increase in respiratory burst activity of granulocytes in patients with septic shock. **Citokyne**, v. 17, n. 5, p. 275-284, 2002.
- BAY, J.O.; DE LATOUR, P. R.; TOURNILHAC, O.; CHOUFI, B.; CHASSAGNE, J. Hematopoietic growth factors and autologous or allogeneic stem cell transplantation. **Bull Cancer**. v.93, p.473-482, 2006.

BERQUIST, B.R.; WILSON, D.M. 3rd. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. **Cancer Lett.**, v. 327, p. 61-72, 2012.

BHUVARAHAMURTHY, V.; BALASUBRAMANIAN, N.; GOVINDASAMY, S. Effect of radiotherapy and chemotherapy on circulating antioxidant system of human uterine cervical carcinoma. **Mol. Cell Biochem.**, v. 158, p. 17-23, 1996.

BORTIN, M.M.; BUCKNER, C.D. Major complications of marrow harvesting for transplantation. **Exp Hematol**, v. 11, n. 10, p. 916-921, 1983.

BUCKNER, C.D.; CLIFT, R.A.; SANDERS, J.E.; STEWART, P.; BENSINGER, W.I.; DONEY, K.C.; SULLIVAN, K.M.; WITHERSPOON, R.P.; DEEG, H.J.; APPELBAUM, F.R.; STORB, R.; THOMAS, E.D. Marrow harvesting from normal donors. **Blood**, v. 64, p. 630-634, 1984.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L. V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J Bras Patol Med Lab**. v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BYRNE, J.L.; RUSSEL, N.H. Peripheral blood cell transplants. **Clin. Pathol**. v. 51, p. 351-355, 1998.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors.**, v. 6, p. 391-397, 1997.

CASTRO JR, C.G. DE; GREGIANIN, L.J.; BRUNETTO, A.L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **Jornal de Pediatria**, v 77, n. 5, p. 345-360, 2001.

CAVALLARO, A.M.; LILLEBY, K.; MAJOLINO, I.; STORB, R.; APPELBAUM, F.R.; ROWLEY, S.D.; BENSINGER, W.I. Three to 6-year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony stimulating factor. **Bone Marrow Transplant**, v. 26, p. 1291-1298, 2000.

CETIN, T.; ARPACI F.; YILMAZ, M.I.; SAGLAM, K.; OZTURK, B.; KOMURCU, S.; GUNAY, M.; OZET, A.; AKAY, C.; KILIC, S.; ULUTIN, C. Oxidative stress in patients undergoing high-dose chemotherapy plus peripheral blood stem cell transplantation. **Biol Trace Element Res**. v. 3, p. 237-247, 2004.

CHANG, J.; COUTINHO, L.; MORGENSTERN, G.; SCARFFE, J.H.; DEAKIN, D.; HARRISON, C.; TESTA, N.G.; DEXTER, T.M. Reconstitution of haemopoietic system with autologous marrow taken during relapse of acute myeloblastic leukaemia and grown in long-term culture. **Lancet**, v. 1, p. 294-295, 1986.

CHOI, I.C.; FUNG, P.C.; LEUNG, A.Y.; LIE, A.K.; LIANG, R. Plasma nitric oxide is associated with the occurrence of moderate to severe acute graft-versus-host disease in haemopoietic stem cell transplant recipients. **Haematologica.**, v. 86, n. 9, p. 972-976, 2001.

CLEMENS, M.R.; LANDNER, C.; EHNINGER, G.; EINSELE, H.; RENN, W.; BUHLER, E.; DIERCK-WALLER, H.; GEY, F.K. Plasma vitamin E and β -carotene concentrations

during radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. **Am J Clin Nutr.** v.51, p. 216-219, 1990.

CLEMENS, M.R.; LANDER, C.; SCHMIDT, H. Decreased essential antioxidants and increased lipid hydroperoxides following high-dose radiochemotherapy, **Free Radical Res. Commun.**, v. 7, p. 227-232, 1989.

CLEMENS, M.R.; WALADKHANI, A.R.; BUBLITZ, K.; EHNINGER, G.; GEY, K.F. A Supplementation with antioxidants prior to bone marrow transplantation. **Wien Klin Wochenschr**, v. 109, p. 771-776, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol Biotechnol.** v. 26, p. 249 -261, 2004.

DARLEY-USMAR, V.; HALLIWELL, B. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. **Pharm. Res.**, v. 13, p. 649-662, 1996.

DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haematol**, v. 20, p. 156-166, 1958.

DAVIDSON, J.F.; GUO, H.H.; LOEB, L.A. Endogenous mutagenesis and cancer. **Mutat. Res.**, v. 509, p. 17-21, 2002.

DAVIES, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Part 1. General-aspects, **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 9895-9901, 1987.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recente studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutricion, Metabolism & Cardiovascular Disease.*, **Parma**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DEVETTEN, M.; ARMITAGE, J.O. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. **Ann Oncol**, v. 18, p. 1450-1456, 2007.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** v.186, p. 421-431, 1990.

DURKEN, M.; AGBENU, J.; FINCKH, B.; HUBNER, C.; PICHLMEIER, U.; ZELLER, W.; WINKLER, K.; ZANDER, A.; KOHLSCHUTTER, A: Deteriorating free radical trapping capacity and antioxidant status in plasma during bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** v. 15, p. 757-762, 1995.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolismo, free radicals, ans oxidative injury. **Biomed. Pharmacother**, v. 55, p. 333-339, 2001.

EPSTEIN, R.B.; BRYANT, J.; THOMAS, E.D. Cytogenetic demonstration of permanent tolerance in adult outbred dogs. **Transplantation**, v. 5, p. 267-272, 1967.

EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutat. Res.**, v. 567, p. 1-61, 2004.

- EVENS, A.M.; MEHTA, J.; GORDON, L.I. Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress. **Bone Marrow Transplant.** v. 34, p. 561-571, 2004.
- FAURE, H.; COUDRAY, C.; MOUSSEAU, M. 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients, **Free Radical Biol. Med.**, v. 20, p. 979-983, 1996.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras.** v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. **DNA Repair and Mutagenesis.** Washington, D.C: ASM Press, 2006.
- GATTI, R.A.; MEUWISSEN, H.J.; ALLEN, H.D. Immunological reconstitution of sex-linked immunological deficiency. **Lancet**, v. 2, p. 1366-1369, 1968.
- GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H.E.; AUERBACH, A.D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G.W.; DEVERGIE, A.; ESPEROU, H.; THIERRY, D.; SOCIE, G.; LEHN, P.; COOPER, S.; ENGLISH, D.; KURTZBERG, J.; BARD, J.; BOYSE, E.A. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from a HLA-identical sibling. **N Engl J Med**, v. 321, p. 1174-1178, 1989.
- GONÇALVES, T. L.; BENVEGNÚ, D. M.; BONFANTI, G.; FREDIANI, A. V.; ROCHA1, J. B. T. δ -ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients. **BMC Cancer**, v. 9, p. 138, 2009.
- GOOD, R.A.; MEUWISSEN, H.F.; HONG, R.; GATTI, R.A. Successful marrow transplantation for correction of immunological deficit in lymphopenic agammaglobulinemia and treatment of immunologically induced pancytopenia. **Exp Hematol**, v. 19, p. 4-10, 1969.
- GORIN, N.C.; AEGERTER, P.; AUVERT, B.; MELONI, G.; GOLDSTONE, A.H.; BURNETT, A.; CARELLA, A.; KORBLING, M.; HERVE, P.; MARANINCHI, D.; LOWENBERG, R.; VERDONCK, L.F.; DE PLANQUE, M.; HERMANS, J.; HELBIG, W.; PORCELLINI, A.; RIZZOLI, V.; ALESANDRINO, E.P.; FRANKLIN, I.M.; REIFFERS, J.; COLLESELLI, P.; GOLDMAN, J.M.. Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. **Blood**, v. 75, p. 1606-1614, 1990.
- GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**.v. 89, p. 2079-2088, 1997.
- GREEN, L.C., de LUZURIAGA, K.R., WAGNER, D.A., RAND, W., ISTFAN, N., YOUNG, V.R., TANNENBAUM, S.R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.78, p.7764-7768, 1981.
- GRIBBEN, J.G.; FREEDMAN, A.S.; NEUBERG, D.; ROY, D.C; BLAKE, K.W.; WOO, S.D.; GROSSBARD, M.L.; RABINOWE, S.N.; CORAL, F.; FREEMAN, G.J.; RITZ, J.; NADLER, L.M. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. **N Engl J Med**, v. 325, p. 1525-1533, 1991.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J Pharm Biomed Anal.**, [S.I], v. 43, n. 2, p. 619-24, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford Univ Press, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAWKINS, C.L.; PATTINSON, D.I.; DAVIES, M.J. Hypochlorite- induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 259-274, 2003.

HOROWITZ, M.M. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: BLUME, K.G.; FORMAN, S.J; APPELBAUM, F.R.; editores. Thomas' hematopoietic cell transplantation. 3^a ed. Oxford: Blackwell publishing 2004. P. 9-15.

HOROWITZ, M.M.; KEATING, A. IBMTR/ABMTR. **Newsletter**, v. 7, p. 3-10, 2000.

HUNNISETT, A.; DAVIES, S.; MCLAREN-HOWARD, J.; GRAVETT, P.; FINN, M.; GUERET- WARDLE, D. Lipoperoxides as an index of free radical activity in bone marrow transplant recipients. **Biol Trace Miner**. v. 47, p.125-132, 1995.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, A.M; PARK, Y.; KIRA, I.I.; UTSUMI, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Curr. Med. Chem.**, v. 10, p. 2495-2505, 2003.

JIN, N.R.; HILL, R.; SEGAL, G.; STILL, B.; PETERSEN, F.B.; AMOS, D.; BUCKNER, C.D.; CLIFT, R.; BENSINGER, W.; MARTIN, P. *et al.* Preparation of red-blood-cell-depleted marrow for ABO-incompatible marrow transplantation by density-gradient separation using the IBM 2991 blood cell processor. *Exp Hematol*, n.15, p. 93-98, 1987.

JONAS, C.R.; PUCKETT, A.B.; JONES, D.P.; GRIFFITH, D.P.; SZESZYCKI, E.E.; BERGMAN, G.F.; FURR, C.E.; TYRE, C.; CARLSON, J.I.; GALLOWAY, J.R.; BLUMBERG, J.B.; ZIEGLER, T.R: Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. **Am J Clin Nutr**. v.72, p. 181-189, 2000.

JOURD'HEUIL. Effect of nitric oxide on hemato-protein-catalysed oxidative reactions. **Nitric Oxide**. v. 2, p. 37-42, 1998.

KALYANAMARAN, B.; NEMEC, J.; SINHA, B.K. Characterization of free radicals produced during oxidation of etoposide (VP-16) and its catechol and quinone derivatives. Na ESR study. **Biochemistry**, v. 28, p. 4839-4846, 1989.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignances. **APMIS**, v. 115, p. 81-103, 2007.

KNIGHT, J.A. Free radicals: their history and current status in aging and disease, **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 28, p. 331-346, 1998.

KORBLING, M.; DORKEN, B.; HO, A.D.; PEZZUTTO, A.; HUNSTEIN, W.; FLIEDNER, T.M. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. **Blood**, v. 67, p. 529-532, 1986.

LADNER, C.; EHNINGER, G.; GEY, K.F.; CLEMENS, M.R. Effect of etoposide (VP16-213) on lipid peroxidation and antioxidant status in a high-dose radiochemotherapy regimen, **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 25, p. 210-212, 1989.

LEVÉSQUES, J.P.; TAKAMATSU, Y.; NILSSON, S.K.; HAYLOCK, D.N.; SIMMONS, P.J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1289-1297, 2001.

LIN, J.Q. Effect of nutrition intervention on antioxidant capacity and lipid peroxide in patients with bone marrow transplantation. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 22, p. 530-532, 2002.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 10630-10637, 1998.

LOEB, L.A. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, p. 450-457, 2011.

LORENZ, E.; UPHOFF, D.; REID, T.R.; SHELTON, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. **J Natl Cancer Inst**, v. 12, p. 197-201, 1951.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. **Mut. Res.-Fundo. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 424, p. 83-95, 1999.

MARTIN, P.J.; SCHOCH, G.; FISHER, L.; BYERS, V.; ANASETTI, C.; APPELBAUM, F.R.; BEATTY, P.G.; DONEY, K.; MCDONALD, G.B.; SANDERS, J.E.; SULLIVAN, K.M.; STORB, R.; THOMAS, E.D.; WITHERSPOON, R.P.; LOMEN, P.; HANNIGAN, J.; HANSEN J.A. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. **Blood**, v. 76, p. 1464-1472, 1990.

MASSUMOTO, C.; MIZUKAMI, S. **Transplante autólogo de medula óssea e imunoterapia pós-transplante**. Simpósio: transplante de medula óssea- 2ª parte. Capítulo IX. Medicina, Ribeirão Preto, v. 33; p. 405-414, 2000.

MASSUMOTO, C.M.; MENDRONI, A.; CARBONELL, A.L.; MOTA, M.A.; MIZUKAMI, S. Mobilização e coleta de células-tronco hematopoéticas de sangue periférico. **Rev Hem Hemot**, v. 2, p. 224-27, 1996.

MASSUMOTO, C.M.; MIZUKAMI, S.; CAMPOS, M.F.; SILVA, L.A.G.; MENDRONE JUNIOR, A.; SAKASHITA, A.; ZAMBON, E.; OSTRONOFF, M.; MACEDO, M.C.; MEDEIROS, R.C.; DORLHIAC, P.; CHAMONE, D.; DULLEY, F. Criopreservação de medula óssea utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, p. 93-98, 1997.

MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MCCALL, M.R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 60409-60455, 1969.

McKENZIE, R.C.; REFFETY, T.S.; BECKETT, G.J. Selenium: an essential element for immune function. **Imm Today.**, v. 19, p. 324-345, 1998.

MITCHELL, J.R.; SMITH, C.V.; HUGHES, H.; LAUTERBURG, B.H.; HORNING, M.G. Overview of alkylation and peroxidation mechanisms in acute lethal hepatocellular injury by chemically reactive metabolites, **Semin. Liver Dis.**, v. 1, p. 143-150, 1981.

MITSUYASU, R.T.; CHAMPLIN, R.E.; GALE, R.P.; HO, W.G.; LENARSKY, C.; WINSTON, D.; SELCH, M.; ELASHOFF, R.; GIORGI, J.V.; WELLS, J.; TERASAKI, P.; BILLING, R.; FEIG, S. Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease: a prospective, randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med*, v. 105, p. 20-26, 1986.

MONTAVON, P.; KUKIC, K.R.; BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical Biochemistry**, v. 360, p. 207-215, 2007.

MORECKI, S.; MARGEL, S.; SLAVIN, S. Removal of breast cancer cells by soybean agglutinin in an experimental model for purging human marrow. **Cancer Res**, v. 48, p. 4573-4577, 1988.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J Histochem Cytochem**, v. 9, p. 1183-6, 2001.

NYSKA, A.; KOHEN, R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v 30, p. 620-650, 2002.

OSGOOD, E.E.; RIDDLE, M.C.; MATHEWS, T.J. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. **Ann Intern Med**, v. 13, p.357-367, 1939.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.** v 70, p. 158-159, 1967.

PINCHUK, I.; SCHNITZER, E.; LICHTENBERG, D. BIOCHIM. Kinect analysis of copper-induced peroxidation of LDL. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.**, v. 1389, n. 2, p. 155-172, 1998.

PONNUSWAMY, P.; OSTERMEIER, E.; SCHRÖTTLE, A.; CHEN, J.; HUANG, P.L.; ERTL, G.; NIESWANDT, B.; KUHLENCORDT, P.J. Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase. **Am J Pathol.**, v. 174, n. 6, p. 2400-2410, 2009.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airways diseases. **Eur J Pharmacol.**, v. 533, p. 222-239, 2006.

RAMSAY, N.K.; KERSEY, J.H.; ROBISON, L.L.; MCGLAVE, P.B.; WOODS, W.G.; KRIVIT, W.; KIM, T.H.; GOLDMAN, A.I.; NESBIT, M.E. Jr. A randomized study of the prevention of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, v. 306, p. 392-397, 1982.

REIFFERS, J.; BERNARD, P.; DAVID, B.; PEZZUTTO, A.; HUNSTEIN, W.; FLIEDNER, T.M. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. **Exp Hematol**, v. 14, p. 312-315, 1986.

ROWLEY DS. Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques. **J Hematother**, v. 1; p. 233-250, 1992.

ROY, D.C.; GRIFFIN, J.D.; BELVIN, M.; BLATTLER, W.A.; LAMBERT, J.M.; RITZ, J. Anti-MY9-blocked-ricin: an immunotoxin for selective targeting of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, v. 77, p. 2404-2412, 1991.

RUBINSTEIN, P.; CARRIER, C.; SCARADAVOU, A.; KURTZBERG, J.; ADAMSON, J.; MIGLIACCIO, A.R.; BERKOWITZ, R.L.; CABBAD, M.; DOBRILA, N.L.; TAYLOR, P.E.; ROSENFELD, R.E.; STEVENS, C.E. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, v. 339, p. 1565-1577, 1998.

SABUNCUOĞLU, S.; ÖZTAŞ, Y.; ÇETINKAYA, D.U.; ÖZGÜNEŞ, N.; ÖZGÜNEŞ, H. Oxidative protein damage with carbonyl levels and nitrotyrosine expression after chemotherapy in bone marrow transplantation patients. **Pharmacology**. v. 89, p.283-286, 2012a.

SABUNCUOĞLU, S.; KUŞKONMAZ, B.; UCKUN, Ç. D, ÖZGÜNEŞ, H. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients. **Bone Marrow Transplant.**, v. 47, n. 5, p. 651-656, 2012b.

SAINTOT, M.; ASTRE, C.; PUJOL, H.; GERBER, M. Tumor progression and oxidant-antioxidant status. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1267-1271, 1996.

SANGEETHA, P.; DAS U.; KORATKAR, R.; SURYAPRABHA, P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer, **Free Radical Biol. Med.**, v. 8, p. 15-19, 1990.

SARI, I.; CETIN, A.; KAYNAR, L.; SARAYMEN, R.; HACIOGLU, S.K.; OZTURK, A.; KOCYIGIT, I.; ALTUNTAS, F.; ESER, B. Disturbance of pro-oxidative/antioxidative balance in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Ann Clin Lab Sci**, v. 38, p. 120-125, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Br J Med Biol Res**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHMITZ, N.; DREGER, P.; LINCH, D.C.; GOLDSTONE, A.H.; BOOGAERTS, M.A.; DEMUYNCK, H.M.S.; FERRANT, A.; ZANDER, A.; LINK, H.; BARGE, A.; BORKETT, K. Randomised trial of filgrastin-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation in lymphoma patients. **Lancet**. v.347, p. 353-357, 1996.

SHPALL, E.J.; STEMMER, S.M.; JOHNSTON, C.F.; HAMI, L.; BEARMAN, S.I.; BERENSON, R.; JONES, R.B. Purging of autologous bone marrow transplantation: the protection and selection of the hematopoietic progenitor cell. *J Hematother*, v. 1, p. 45-54, 1992.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. v.175, p. 184-191, 1988.

SNIECINSKY, I. Management of ABO incompatibility in allogeneic bone marrow transplantation. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, eds. *Bone marrow transplantation. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications*; 1994.p. 497-503.

STORB, R.; DEEG, H.J.; PEPE, M.; APPELBAUM, F.; ANASETTI, C.; BEATTY, P.; BENSINGER, W.; BERENSON, R.; BUCKNER, C.D.; CLIFT, R.; DONEY, K.; LONGTON, G.; HANSEN, J.; HILL, R.; LOUGHRAN, T.; MARTIN, JR.P.; SINGER, J.; SANDERS, J.; STEWART, P.; SULLIVAN, K.; WITHERSPOON, R.; THOMAS, E. D. Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial. *Blood*, v. 73, p. 1729-1734, 1989.

STORB, R.; DEEG, H.J.; WHITEHEAD, J.; APPELBAUM, F.; BEATTY, P.; BENSINGER, W.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R.; DONEY, K.; FAREWELL, V.; HANSEN, J.; HILL, R.; LUM, L.; MARTIN, P.; MCGUFFIN, R.; SANDERS, J.; STEWART, P.; SULLIVAN, K.; WITHERSPOON, R.; YEE, G.; THOMAS, E.D. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*, v. 314, p. 729-735, 1986.

THOMAS, E.D.; COLLINS, J.A.; HERNAN JR, E.C.; FERREBEE, J.W. Marrow transplantations in lethally irradiated dogs given methotrexate. **Blood**, v. 19, p. 217-228, 1962.

THOMAS, E.D.; STORB, R. Technique for human marrow grafting. **Blood**, v. 36, p. 507-515, 1970.

THOMAS, E.D.; STORB, R.; CLIFT, R.A.; FEFER, A.; JOHNSON, F.L., NEIMAN, P.E.; LERNER, K.G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C.D. Bone marrow transplantation. **N Engl J Med**, v. 292, p. 832-843, 1975.

TOYOKUNI, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. **Pathol. Int.**, v. 49, p. 91-102, 1999.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERDEGUER, A.; PARDO, N.; MADERO, L.; MARTINEZ, A.; BUREO, E.; FERNÁNDEZ, J.M.; MUÑOZ, A.; OLIVÉ, T.; FERNÁNDEZ-DELGADO, R.; CUBELLS, J.; DIAZ, M.A.; SASTRE, A. Autologous stem cell transplantation for advanced Hodgkin's disease in children. Spanish group for BMT in children (GETMON), Spain. **Bone Marrow Transplant.**, v. 25, n. 1, p. 31-34, 2000.

VOSE, J.M.; ANDERSON, J.R.; KESSINGER, A.; BIERMAN, P.J.; COCCIA, P.; REED, E.C.; GORDON, B.; ARMITAGE, J.O. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 11, p. 1846-1851, 1993.

WALLACE, S.S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. **Free Radical Biol. Med.**, v. 33, p. 1-14, 2002.

WASSON, G.R.; MARTIN, V.J.M.; DOWNES, C.S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**. v. 23, n. 3, p. 153-162, 2008.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radical and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer treat rev**. v. 23, p. 209-240, 1997.

WEST, J.D; MARNETT, L.J. Review Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chem Res Toxicol.**, v. 19, n. 2, p. 173-194, 2006.

WHITE, A.C.; SOUSA, A.M.; BLUMBERG, J.; RYAN, H.F.; FANBURG, B.L.; KAYYALI, U.S. Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 38, n. 7, p. 513-520, 2006.

WONG, V.W.C.; SZETO, Y.T. ANDREW R. COLLINS, A.R.; BENZIE, I.F.F. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Nut Res**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2005.

**APÊNDICE A – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
GENOTOXICIDADE NOS 37 PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH AUTÓLOGO.**

GRUPO	IDADES	SEXO	CM Pré- RC	CM D-1	CM D+1	CM D+10	CM D+20	MDA Pré-RC	MDA D-1	MDA D+1	MDA D+10	MDA D+20
1 GE	67	M	16	73	41	23	13	3,49	4,55	3,56	3,68	2,65
1 MFS	55	F	15	62	21	64	24	2,88	14,84	5,87	3,77	2,31
1 LRS	63	F	12	55	15	16	29	4,21	5,27	3,56	2,65	2,80
1 EVS	61	M	7	75	7	16	9	2,92	12,72	3,05	2,77	2,80
1 ABC	30	M	16	64	32	23	16	2,65	8,33	3,74	3,65	3,38
1 FEOA	55	F	14	63	46	32	15	3,18	3,30	2,16	3,01	2,88
1 MSSL	61	F	17	63	36	31	16	3,49	2,46	2,80	1,06	2,84
1 SRL	48	F	15	75	49	16	29	2,97	1,71	2,27	2,58	3,41
1 RMO	60	M	27	89	55	16	9	1,56	2,24	2,27	2,16	3,11
1 RCN	53	M	16	52	31	32	12	2,33	3,18	1,52	3,33	2,35
1 EAC	53	F	12	51	39	31	11	2,20	4,21	3,35	3,81	2,84
1 FMP	44	F	17	55	35	37	12	2,16	2,05	2,12	2,31	1,90
1 ERR	51	F	14	46	31	19	8	1,86	2,05	2,43	2,20	1,10
1 RNP	69	M	24	64	32	10	12	1,55	1,86	1,67	1,74	1,48
1 PPF	47	M	15	47	29	9	11	2,96	3,60	2,20	1,59	1,45
1 RMHTO	62	F	27	54	26	7	10	2,12	2,58	1,90	2,27	1,56
1 HMPS	60	F	29	46	24	7	10	2,58	2,69	3,11	3,49	2,61
3 DRSS (LNH)	18	M	10	72	35	22	13	2,27	5,15	3,54	1,90	3,56
2 MFM	58	F	9	50	24	18	11	1,59	1,86	1,78	1,90	1,97
2 GF	34	M	8	51	28	24	24	2,69	3,75	3,21	2,46	3,60
2 HBM	27	M	10	58	17	10	8	2,31	4,02	3,97	3,79	3,94
2 FARC	41	M	6	27	19	6	12	2,73	5,80	2,56	2,58	3,15
3 JMN (LNH)	59	M	5	63	16	13	10	2,73	6,44	3,90	3,10	4,02
2 AFSA	32	M	6	39	23	4	4	2,65	7,16	2,92	4,24	2,77
3 RJA (LNH)	56	M	11	73	27	22	13	4,70	6,33	2,16	5,87	5,49
2 FCNS	22	M	18	73	31	20	12	1,97	6,78	4,89	4,96	3,98
2 RSMC	27	F	10	49	23	26	14	1,33	6,93	4,23	2,65	2,27
2 RRN	35	F	8	50	28	27	12	1,48	1,29	3,75	2,69	1,86
3 DSL (LNH)	25	M	7	49	35	8	14	2,09	2,92	3,11	1,78	1,35
2 AGS	40	M	30	57	28	18	11	1,48	1,82	1,74	1,77	2,16
3 VPS (LNH)	45	M	24	43	22	15	13	5,57	5,95	6,59	4,49	5,81
3 MAHP (LNH)	50	M	22	44	21	11	7	4,66	4,28	4,66	7,16	4,88
3 WL (LNH)	39	F	22	47	27	7	10	3,83	3,15	4,93	10,38	7,08
2 EOS	47	M	24	51	19	10	9	8,33	9,62	7,76	6,36	4,96
3 ROM (LNH)	60	M	18	53	21	8	5	3,85	5,2	8,9	8,0	3,98
3 CABO (LNH)	43	M	21	50	24	12	8	4,73	5,08	5,64	5,42	4,59
3 JLBN (LNH)	25	M	23	47	28	17	11	4,36	4,90	4,18	4,29	4,34

**APÊNDICE B – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
GENOTOXICIDADE NOS 37 PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH AUTÓLOGO.**

GRUPO	IDADES	SEXO	SOD Pré-RC	SOD D-1	SOD D+1	SOD D+10	SOD D+20	GPx Pré-RC	GPx D-1	GPx D+1	GPx D+10	GPx D+20
1 GE	67 M		2232,71	2130,17	3643	2694,62	5716,96	412,19	445,84	452,23	462,66	563,60
1 MFS	55 F		1683,96	831,92	1578	1462,45	2032,35	302,83	210,3	309,41	361,72	344,89
1 LRS	63 F		1849,97	831,92	2656	3519,41	757,27	243,95	235,54	336,25	479,484	284,12
1 EVS	61 M		1331,21	913,93	1103,02	1685	2745	462,66	319,66	386,95	303,87	432,63
1 ABC	30 M		1996,13	1084,45	2707,13	2856,27	2035,51	437,42	226,10	296,36	310,97	410,96
1 FEOA	55 F		2340,17	2232,71	1849,97	2032,35	2130,17	396,25	195,45	309,85	356,73	352,99
1 MSSL	61 F		1849,97	871,00	2452,82	5992,14	1689,31	740,26	479,48	588,84	409,23	628,96
1 SRL	48 F		1983,96	519,89	2340,17	1532,84	3572,71	504,72	269,18	403,78	361,72	584,12
1 RMO	60 M		2452,82	233,79	1749,97	1395,29	831,92	336,48	252,36	243,95	336,48	393,48
1 RCN	53 M		757,27	340,00	4964,95	3744,68	1052,36	252,36	168,24	109,36	218,712	220,6
1 EAC	53 F		793,72	1395,29	1683,96	5454,42	1052,36	593,89	184,12	109,36	192,532	605,36
1 FMP	44 F		193,72	2130,17	3744,68	3408,64	3252,11	284,12	841,2	357,71	336,48	117,77
1 ERR	51 F		1532,84	1311,86	4113,85	5454,42	1270,08	484,12	336,48	420,6	357,08	493,56
1 RNP	69 M		5203,93	1252,11	2960,27	1395,29	1211,75	159,83	134,59	269,18	167,30	136,54
1 PPF	47 M		793,72	1462,45	1156,11	1270,08	1689,31	374,69	342,06	319,68	176,65	422,06
1 RMHTO	62 F		2824,33	1736,94	3744,68	3744,69	1957,92	385,45	189,52	299,36	403,78	100,94
1 HMPS	60 F		4113,85	757,00	3572,71	913,93	1606,63	197,23	109,36	151,42	116,82	185,48
3 DRSS (LNH)	18 M		1606,63	913,93	6789,00	8040,75	1683,96	471,07	260,77	398,34	403,78	370,128
2 MFM	58 F		4736,94	1052,36	9865,00	1939,02	4311,86	353,30	311,24	289,29	513,13	386,95
2 GF	34 M		2452,82	1331,21	2468,00	1765,01	5454,42	521,54	336,48	359,28	386,95	344,89
2 HBM	27 M		2746,00	3744,68	4688,00	2452,82	3252,11	294,04	186,95	305,26	437,42	288,84
2 FARC	41 M		1532,84	3102,76	5992,14	1211,75	2130,17	368,24	282,40	336,48	350,64	336,48
3 JMN (LNH)	59 M		2454,42	952,82	1532,84	1331,21	3584,00	134,59	108,41	143,00	125,24	146,51
2 AFSA	32 M		1793,72	627,45	2452,82	4736,94	5765,00	672,96	336,48	841,2	850,64	641,20
3 RJA (LNH)	56 M		3102,76	913,93	5716,96	1765,01	2694,62	504,72	267,30	288,41	351,42	475,71
2 FCNS	22 M		4519,41	2340,17	1765,01	5454,42	4311,86	209,44	195,58	336,48	168,24	154,16
2 RSMC	27 F		3102,76	913,93	3252,11	2130,17	722,49	672,96	472,96	509,44	572,96	636,48
2 RRN	35 F		3572,71	975,74	3789,85	3408,64	1103,02	336,48	201,89	285,06	233,65	275,71
3 DSL (LNH)	25 M		1019,89	571,96	4964,95	2232,71	1331,21	231,58	100,94	186,25	219,45	209,44
2 AGS	40 M		957,92	473,24	5716,96	3408,64	1103,02	668,24	504,72	582,40	605,92	677,68
3 VPS (LNH)	45 M		3252,11	1939,02	2960,27	3508,91	2028,06	504,72	368,24	486,24	499,56	536,52
3 MAHP (LNH)	50 M		4736,94	1211,75	2824,33	5203,93	3056,15	336,48	168,24	236,48	306,48	386,27
3 WL (LNH)	39 F		3572,71	115,50	3924,93	6280,56	451,51	168,24	122,49	159,54	178,39	189,51
2 EOS	47 M		2694,62	871,96	1331,21	1849,97	2452,82	100,94	84,12	92,53	158,88	108,41
3 ROM (LNH)	60 M		2965,05	149,55	2032,35	2340,17	2033,02	292,54	100,94	168,24	304,72	320,49
3 CABO (LNH)	43 M		2805,01	1331,21	3744,68	1683,96	2563,25	269,34	117,77	148,29	207,94	295,37
3 JLBN (LNH)	25 M		2821,01	901,58	3675,25	3806,96	2578,36	336,48	288,31	297,35	315,28	359,16

**APÊNDICE C – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
GENOTOXICIDADE NOS 37 PACIENTES SUBMETIDOS A TCTH AUTÓLOGO.**

IRUPO	IDADES	SEXO	CAT Pré-RC	CAT D-1	CAT D+1	CAT D+10	CAT D+20	NIT Pré-RC	NIT D-1	NIT D+1	NIT D+10	NIT D+20
1 GE	67	M	330,99	230,99	309,35	215,49	191,55	51,46	61,99	55,74	41,42	18,32
1 MFS	55	F	153,52	70,42	169,26	107,04	115,49	61,50	70,67	65,30	88,23	59,96
1 LRS	63	F	301,41	80,28	208,31	215,49	115,49	61,06	36,24	45,78	76,77	61,25
1 EVS	61	M	184,51	76,06	325,46	456,09	611,27	113,17	113,79	100,11	80,44	65,28
1 ABC	30	M	304,12	166,90	263,98	360,55	338,54	57,62	45,46	51,13	40,19	33,60
1 FEOA	55	F	133,80	53,52	202,82	132,39	153,28	109,91	57,43	56,63	82,25	47,92
1 MSSL	61	F	304,23	114,08	142,25	321,13	319,28	57,00	50,84	51,27	69,13	55,48
1 SRL	48	F	242,06	153,52	228,17	123,94	264,79	23,99	26,20	25,28	17,15	18,57
1 RMO	60	M	291,55	107,04	190,14	111,27	181,69	66,42	25,77	44,80	18,38	53,61
1 RCN	53	M	380,28	215,49	288,73	242,25	384,51	39,01	32,85	38,15	22,51	19,55
1 EAC	53	F	309,86	177,46	221,13	173,24	320,03	81,82	48,87	53,92	27,07	25,83
1 FMP	44	F	487,32	294,37	378,87	307,04	687,32	12,65	31,44	80,96	29,16	78,06
1 ERR	51	F	254,93	209,86	214,08	207,04	290,14	33,66	17,27	37,84	10,19	33,41
1 RNP	69	M	381,69	245,07	476,06	538,03	322,54	13,33	17,64	14,44	2,98	24,36
1 PPF	47	M	283,67	115,49	178,87	160,56	306,59	30,62	41,54	21,71	28,54	23,87
1 RMHTO	62	F	630,99	421,13	483,10	676,06	784,51	46,53	13,45	26,20	22,51	51,76
1 HMPS	60	F	112,68	105,63	207,04	181,69	145,07	39,81	36,00	36,37	14,25	24,60
3 DRSS (LNH)	18	M	273,24	98,59	152,80	185,92	164,79	8,90	45,24	35,26	40,49	50,10
2 MFM	58	F	319,72	116,90	138,75	138,03	102,82	47,27	48,44	43,04	40,68	49,79
2 GF	34	M	321,13	150,70	198,59	316,90	338,03	73,14	55,13	52,48	73,14	46,65
2 HBM	27	M	239,79	170,42	201,40	833,80	308,45	51,02	42,16	40,35	49,24	47,08
2 FARC	41	M	267,61	73,24	187,32	347,89	525,35	75,66	47,02	45,42	58,26	88,66
3 JMN (LNH)	59	M	226,76	102,82	332,39	414,08	280,4	58,85	25,03	40,86	29,41	56,36
2 AFSA	32	M	315,49	69,01	57,75	45,07	290,36	23,74	79,36	27,93	19,61	24,69
3 RJA (LNH)	56	M	156,34	60,56	245,07	425,35	180,28	41,60	46,34	49,92	33,29	32,05
2 FCNS	22	M	136,62	128,56	361,97	119,72	261,97	84,59	63,69	68,64	46,65	69,63
2 RSMC	27	F	316,90	92,96	259,15	370,42	332,39	67,10	29,41	40,18	45,48	96,05
2 RRN	35	F	101,41	87,32	146,48	164,79	310,25	85,02	43,33	35,13	28,97	78,09
3 DSL (LNH)	25	M	352,11	105,63	181,69	170,42	287,32	40,99	52,81	22,88	24,29	46,53
2 AGS	40	M	383,10	359,15	335,21	262,91	274,65	52,50	26,20	41,05	41,87	58,35
3 VPS (LNH)	45	M	419,72	163,38	745,07	267,40	395,26	46,22	21,83	18,75	38,63	45,81
3 MAHP (LNH)	50	M	145,07	76,06	178,87	166,20	156,08	42,71	36,80	41,35	29,96	41,62
3 WL (LNH)	39	F	257,75	60,56	67,61	94,37	90,14	45,73	37,78	27,99	35,81	42,16
2 EOS	47	M	139,44	28,17	42,25	29,58	18,31	40,12	45,71	36,06	27,56	31,19
3 ROM (LNH)	60	M	283,10	107,04	163,38	239,83	240,15	38,52	24,36	33,96	39,81	37,98
3 CABO (LNH)	43	M	311,17	46,48	12,68	415,49	327,99	40,25	41,11	52,69	105,60	42,95
3 JLBN (LNH)	25	M	205,63	91,24	231,06	255,61	236,52	34,27	42,72	39,68	41,42	36,54

**APÊNDICE D – PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
GENOTOXICIDADE NOS 30 INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS QUE PARTICIPARAM DO
ESTUDO.**

			CM	MDA	SOD	GPx	CAT	NIT
1	53	M	5	0,57	2232,71	1085,15	80,28	0,58
2	45	F	6	0,25	2570,88	622,49	25,35	0,40
3	28	F	5,5	0,26	1245,05	277,60	33,80	0,40
4	40	M	3,5	0,84	5454,42	168,24	83,10	0,46
5	58	M	7,5	0,25	2960,27	353,30	204,23	0,27
6	61	F	4	0,23	957,92	386,95	409,86	0,52
7	47	M	1	0,72	3102,75	386,95	54,93	0,10
8	45	F	3,33	1,93	4519,41	269,18	69,01	0,40
9	58	M	4,5	1,44	3744,68	328,07	38,03	0,40
10	42	F	5,33	2,73	3102,76	370,13	28,17	0,46
11	33	F	3	1,06	1939,02	378,54	30,99	0,33
12	63	M	7	1,10	1606,63	344,89	77,46	0,64
13	19	F	1	1,97	1765,01	286,01	67,61	0,89
14	33	M	5	1,59	5716,96	420,60	45,07	0,09
15	46	M	3,33	1,56	2570,88	227,12	35,21	0,21
16	48	M	5,33	1,78	4519,41	420,60	502,82	1,07
17	65	F	4,5	1,14	1156,11	294,42	2,82	0,52
18	54	F	2,5	0,80	139529	412,19	36,62	0,52
19	37	F	7,5	0,38	2694,62	227,12	59,15	0,46
20	56	M	5	0,50	5716,96	328,07	225,35	0,15
21	49	M	7,66	1,05	3102,76	370,13	26,76	na
22	58	F	10	0,99	5203,93	269,18	228,17	na
23	66	F	6	1,16	1849,97	302,83	59,15	na
24	30	F	5,5	1,06	3408,64	269,18	59,15	na
25	46	M	5,33	0,98	5716,96	361,72	230,99	na
26	64	F	4	0,99	5454,42	395,36	115,49	na
27	36	M	4,55	1,09	2232,71	218,71	197,18	na
28	53	F	5,44	1,11	4736,94	361,72	136,62	na
29	60	M	3,45	0,99	2232,71	277,60	354,93	na
30	59	M	5,33	1,06	3102,76	359,11	121,32	na

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- TCLE.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação do Perfil Oxidativo e da Genotoxicidade em Pacientes Submetidos a Transplante Autólogo de Células Tronco Hematopoéticas”, que tem por objetivo principal avaliar o perfil oxidativo e a genotoxicidade nas diversas fases que envolvem o TCTH, comparando os diferentes regimes de condicionamento em pacientes submetidos a transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. Serão coletadas de cada paciente amostras de sangue, através de punção periférica da veia do antebraço, em cinco momentos: antes da quimioterapia, 24 horas após a quimioterapia, 1 dia após o transplante 30 dias após o transplante e 20 dias após o transplante. Após a coleta serão realizados uma série de exames laboratoriais para avaliar o perfil oxidativo e a genotoxicidade nos diferentes momentos que envolvem o transplante de células tronco hematopoéticas autólogo, comparando também os regimes de condicionamento. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício direto para o participante. Espera-se que o resultado desses exames poderá contribuir na validação de novos parâmetros que direcionem intervenções médicas capazes de melhorar a qualidade do transplante e a evolução do paciente.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Thayna Nogueira dos Santos, que reside na rua Paraná, 700, Apto 102, bairro Demócrito Rocha, Fortaleza, CE. Fone: (0xx85) 3482-9099/ 88646683. Para tanto, necessitamos que a Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUWC- Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3366-8589- E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor(a) concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data: / /

Assinatura da testemunha

Data: / /

*Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: / /

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO E DA GENOTOXICIDADE EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTIICAS.

Pesquisador: Thayna Nogueira dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08022912.8.0000.5045

Instituição Proponente: Hospital Universitário Walter Cantídio/ Universidade Federal do Ceará/

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 167.483

Data da Relatoria: 10/12/2012

Apresentação do Projeto:

Estudo do tipo longitudinal prospectivo com a finalidade de investigar o perfil oxidativo e a genotoxicidade em pacientes adultos que serão submetidos a transplante autólogo de células tronco hematopoéticas (TACTH). Tem como hipótese que possivelmente tanto o perfil do estresse oxidativo quanto da genotipagem vão variar quanto ao regime de condicionamento, podendo com isso haver mutações nas hélices do DNA e prejuízo no tratamento e prognóstico do paciente. Assim a pergunta de partida é se há regime de condicionamento mais tóxico que outro?

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil oxidativo e a genotoxicidade nas diversas fases que envolvem o TCTH, comparando os diferentes regimes de condicionamento em pacientes submetidos a transplante autólogo de células tronco hematopoéticas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será possível validação de novos condicionamentos e parâmetros que direcionem intervenções médicas capazes de melhorar a qualidade do transplante e o prognóstico do paciente. Os riscos serão referentes à coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está adequada.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)366-8613

Fax: (853)281-4961

E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados corretamente

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas. Pesquisa adequada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá encaminhar a este CEP relatório via Plataforma Brasil até 30 dias após conclusão do projeto.

FORTALEZA, 10 de Dezembro de 2012

Assinador por:

Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290

Bairro: RodolfoTeófilo

CEP: 60.430-370

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)368-8813

Fax: (853)281-4961

E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br