



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MARIA JURACY SOLON PETROLA

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE LEUCEMIA
MIELÓIDE CRÔNICA**

FORTALEZA

2011

MARIA JURACY SOLON PETROLA

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

Coorientadora: Profa. Dra. Silvia M^a Meira Magalhães

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P591p Petrola, Maria Juracy Solon.
Perfil do estresse oxidativo em pacientes portadores de leucemia mieloide crônica / Maria Juracy Solon Petrola. – 2011.
79f. : il. color., enc. ; 30 cm.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2011.
Área de concentração: Patologia Tropical.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves.
Co-orientação: Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães

1. Leucemia Mielogênica Crônica BCR – ABL Positiva. 2. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 616.99419

MARIA JURACY SOLON PETROLA

**PERFIL DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES PORTADORES DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
à obtenção do título de mestre em patologia.

Aprovada em: ____/____/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^ª. Dr^ª. Maria da Silva Pitombeira

Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Jose Ajax Nogueira Queiroz

Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^ª. Dr^ª. Margarida Maria de Lima Pompeu

Universidade Federal do Ceará-UFC

Aos meus pais Luis Ubaldo Solon (in memoriam) e Maria Isabel Neves Solon.

Aos meus irmãos Ubaldo, Silvia, Ricardo, Silvana e Roberto.

Ao Petrola meu marido.

Aos meus filhos Antônio, Cecile, Lucas e Isabele.

AGRADECIMENTO

Agradeço com carinho e emoção:

À minha família, meu porto seguro;

À minha orientadora, Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, em especial, pelo constante apoio, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães pela co-orientação no desenvolvimento deste trabalho:

À amiga Alana Jocelina Montenegro de Castro pelo carinho e companheirismo;

À Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu pelo empenho e motivação contagiante;

À Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira pelo incentivo e exemplo;

Ao Prof. Dr. José Murilo Martins pelo exemplo e pioneirismo;

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia da UFC pela acolhida fraterna;

Aos alunos do Laboratório de Hemoglobinopatia do curso de Farmácia, em especial à Maritza pela inestimável ajuda;

Aos médicos do serviço de Hematologia do HUWC;

Aos colegas do mestrado;

A todos os colegas e funcionários do Hemoce.

Aos pacientes que participaram deste trabalho.

RESUMO

A Leucemia mielóide crônica (LMC) é caracterizada pela expansão clonal de células progenitoras hematopoéticas, resultante da translocação (9:22). O oncogene de fusão *BCR-ABL*, no cromossomo Ph, é transcrito e traduzido numa proteína de fusão BCR/ABL. A tirosina quinase (TK) ABL na proteína de fusão é constitutivamente ativada sendo necessária para os eventos leucemogênicos iniciais da LMC e sua atividade induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). De particular relevância para LMC é o fato de que um aumento de EROs pode ter consequências, facilitando a instabilidade genômica podendo contribuir para a progressão da doença. O objetivo do estudo foi determinar o perfil oxidativo em pacientes com LMC, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Trata-se de um estudo transversal constituído de 30 pacientes adultos, com diagnóstico clínico e laboratorial de LMC, em tratamento com inibidores de (TK) de 1ª e 2ª geração. As concentrações de malonaldeído (MDA) e de nitrito (NO_2^-) foram realizadas por método espectofotométrico. As atividades das enzimas Glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) foram determinadas no hemolisado, por *kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay® (Sigma-Aldrich)* e por espectrofotometria, respectivamente. Glutathione total, glutathione reduzida (GSH reduzida), glutathione oxidada (GSSG) foram determinadas por *kit Total Glutathione Activity® (Assay Designs, Inc)* e calculada a relação GSH/GSSG. Para a análise estatística de dados não paramétricos foi utilizado o ANOVA® e o teste de múltiplas comparações de Tukey. Foi considerado o nível mínimo de significância de 5%. As concentrações média de MDA e de NO_2^- foram aumentadas nos pacientes com LMC em relação ao controle, independente da atividade da doença. O perfil antioxidante foi caracterizado pela diminuição da CAT e aumento da GSH-Px também independente da atividade da doença. A GSH reduzida se apresentou diminuída, a GSSH, aumentada e a relação GSH/GSSG diminuída. Os pacientes em uso de inibidores de TK de 2ª geração apresentaram parâmetros do estresse oxidativo significativamente elevados em relação ao grupo controle. Conclui-se que os pacientes com LMC estão sob estresse oxidativo e com atividade antioxidante comprometida.

Palavras-chave: Leucemia Mielogênica Crônica BCR-ABL positiva; Estresse Oxidativo; proteínas Tirosina Quinase.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by clonal expansion of hematopoietic progenitor cells, result from the translocation (9:22). The oncogene BCR-ABL, in the Ph chromosome, is transcribed and translated into a fusion protein BCR / ABL. The ABL tyrosine kinase (TK) in the fusion protein is constitutively activated and is needed for the initial leukemogenic event of CML and its activity induces production of reactive oxygen species (ROS). Of particular relevance to CML is the fact that an increase of ROS can have consequences, facilitating genomic instability may contribute to disease progression. The aim of this study was to determine the oxidative status in patients with CML, in attendance at a university hospital (HUWC). This is a cross-sectional study consisted of 30 adult patients of both sexes with clinical and laboratory diagnosis of CML on treatment with inhibitors (TK) 1st and 2nd generation. The concentrations of malondialdehyde (MDA) and nitrite (NO_2^-) were performed by spectrophotometric method. The activities of enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) were determined in hemolysate by Glutathione Peroxidase Cellular Activity Kit ® Assay (Sigma-Aldrich) and spectrophotometry, respectively. Total glutathione, reduced glutathione (reduced GSH), glutathione (GSSG) were determined by Total Glutathione Activity Kit ® (Assay Designs, Inc) and calculated the ratio GSH / GSSG. For statistical analysis of nonparametric data, It was used ANOVA® and the Tukey test for multiple comparisons. It was considered the minimum level of significance of 5%. The average concentrations of NO_2^- and MDA were increased in CML patients compared to control, regardless of disease activity. The antioxidant profile was characterized by decreased CAT and GSH-Px increased also independent of disease activity. The reduced GSH is presented decreased, the GSSH, increased and GSH / GSSG decreased. It was observed that patients using protease inhibitors of TK 2nd generation of oxidative stress parameters were significantly elevated compared to controls. In the analysis of patients on imatinib were not detected significant changes in oxidative status. We conclude that patients with CML are under oxidative stress and impaired antioxidant activity.

Keywords: Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL Positive; Oxidative Stress; Protein-Tyrosine Kinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição dos grupos quanto à medicação em uso	52
Figura 2	Distribuição dos pacientes quanto ao tempo de doença e ao nível de atividade da doença	53
Figura 3	Distribuição dos pacientes estratificados pelo nível de atividade da doença quanto ao tempo médio de doença	54
Figura 4	Valores médios de MDA e Nitrito nos grupos	54
Figura 5	Níveis médios de GSH-Px e CAT nos grupos em estudo	55
Figura 6	Níveis dos tióis não protéicos e relação GSH/GSSG nos grupos	57
Figura 7	Valores de MDA e Nitrito nos grupos estudados	58
Figura 8	Valores de GSH-Px e CAT nos grupos estudados	59
Figura 9	Valores de tióis não protéicos e da relação GSH/GSSG nos grupos controle e de pacientes em atividade estratificados pela medicação em uso	61
Figura 10	Valores de MDA e Nitrito nos grupos controle e de pacientes em uso de imatinibe estratificados pelo nível de doença.	62
Figura 11	Valores de GSH-Px e CAT nos grupos controle e de pacientes em uso de imatinibe estratificados pelo nível de doença	63
Figura 12	Valores de tióis não protéicos e da relação GSH/GSSG nos grupos controle e de pacientes em uso de imatinibe estratificados pelo nível de doença	64
Figura 13	Níveis médios de MDA e Nitrito em pacientes estratificados pelo tempo de doença	65
Figura 14	Níveis médios de CAT e GSH-Px em pacientes estratificados pelo tempo de doença.	66
Figura 15	Níveis médios de tióis não protéicos e relação GSH/GSSG em pacientes estratificados pelo tempo de doença	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos pacientes quanto ao sexo	50
Tabela 2	Distribuição dos pacientes por faixa etária	50
Tabela 3	Distribuição dos pacientes com LMC de acordo com a fase da doença ao diagnóstico.	51
Tabela 4	Distribuição dos pacientes quanto ao escore de Sokal	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abi-1	<i>Abl interactor proteins 1</i>
Abi-2	<i>Abl interactor proteins 2</i>
ARG	<i>Abelson Relacion Gene</i>
ATP	trifosfato de adenosina
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of the cell death</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/Lymphoma 2</i>
bcl-x	<i>Bcl-2 related gene</i>
<i>BCR-ABL</i>	<i>Oncogene Breakpoint Cluster Region/Abelson</i>
BCR-ABL	<i>Protein Breakpoint Cluster Region/Abelson</i>
Bus	Bussulfan
Ca	Cálcio
CAT	Catalase
c-Kit	<i>stem cell factor receptor</i>
Cu, Zn-SOD	Cobre,Zinco-Superóxido Dismutase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
G2	Crescimento 2 (ciclo celular antes da divisão celular)
GSH REDUZIDA	Glutaciona Reduzida
GSH TOTAL	Glutaciona Total
GSH-Px	Glutaciona Peroxidase
GSSG	Glutaciona Oxidada
GSSG-redutase	Glutaciona-S-Redutase
GSSG-transferase	Glutaciona-S-Transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio

HNE	4 hidroxil 2 nonenal
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IFN- α	Interferon alfa
IRIS	<i>International Randomized Study of Interferon and STI571</i>
K	Potássio
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LOG	Logarítmo
LPHDGH	Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Doenças Genéticas Hematológicas
M	Mitose
MBCR	<i>Major breakpoint cluster region</i>
MDA	Malonaldeído
Mg	Magnésio
Mn-SOD	Manganês-Superóxido dismutase
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEED	Cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina
NO ⁻	anion nitroxil
NO	Óxido Nítrico
NO ⁺	Cátion Nitrosônio
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
O ₂ ⁻	Radical superóxido
O ₂	Oxigênio Molecular
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P190 ^{BCR-ABL}	Proteína BCR-ABL com peso molecular 190 kD
P210 ^{BCR-AB}	Proteína BCR-ABL com peso molecular 210 kD
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>

PDGF alfa	Fator de crescimento derivado das plaquetas alfa
PDGF beta	Fator de crescimento derivado das plaquetas beta
Ph	Filadélfia
RCgC	Resposta Citogenética Completa
RHC	Resposta Hematológica Completa
RMoC	Resposta Molecular Completa
RNA _m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT-PCR	<i>reverse transcription - Polymerase chain reaction</i>
S	Síntese
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SH3	<i>Src homology 3-tyrosine kinase</i>
SOD	Superóxido dismutase
STI171	<i>Specific Tyrosine Kinase Inhibitor 171</i>
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TK	Tirosina Kinase
TKF	Tirosina Kinase de Fusão
TMO	Transplante de Medula Óssea
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia mielóide crônica.....15

1.2 Estresse Oxidativo 24

1.3. Estresse oxidativo e câncer 29

1.3 Estresse oxidativo e LMC 31

2. OBJETIVOS..... 33

2.1 Objetivo geral 33

2.2 Objetivos específicos 33

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 34

3. 1 Casuística 34

3.1.1. Grupo de Estudo 34

3.1.3. Obtenção dos dados..... 35

3.2. Estratificação do Grupo de estudo 35

3.2.1. Estratificação em relação à atividade ou não da doença 35

3.2.2 Estratificados de acordo com o tipo de inibidor de TK 37

3.2.3. Estratificados de acordo com o tempo de doença..... 37

3.3. Local do Estudo 37

3.4 Aspectos Éticos 37

3.5 Métodos 38

3.5.1 Coleta e processamento das amostras 38

3.5.2 Análises do Perfil oxidativo 38

3.6 Descarte do Material Biológico 40

3.7 Análise Estatística 40

4. RESULTADOS..... 41

4.1 Características sócio demográficas dos pacientes	41
4.2 Caracterização clínica dos pacientes ao diagnóstico	41
4.3 Caracterização clínica atual dos pacientes	42
4.4 análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes estratificados de acordo com a atividade da doença	44
4.4.1 Marcadores do estresse oxidativo	44
4.4.2 Enzimas antioxidantes	45
4.4.3 Tióis não protéicos	46
4.5 Perfil oxidativo dos pacientes com doença em atividade estratificados pela medicação em uso	47
4.5.1 Marcadores do estresse oxidativo.	48
4.5.2 Enzimas antioxidante	48
4.5.3 Tióis não protéicos	49
4.6 Análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes em uso de imatinibe, estratificados pela atividade da doença	50
4.6.1 Marcadores do estresse oxidativo.	51
4.6.2 Enzimas antioxidantes	52
4.6.3 Tióis não protéicos	52
4.7 Análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes estratificados pelo tempo de doença	54
4.7.1 Marcadores do estresse oxidativo.	54
4.7.2 Enzimas antioxidantes	55
4.7.3 Tióis não-protéicos	56
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE 1	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia da medula óssea resultante da expansão clonal de uma célula precursora hematopoética. LMC é provavelmente a doença maligna humana mais extensivamente estudada, tendo sido a primeira a ser associada com uma alteração genética específica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph) (NOWELL, HUNGERFORD, 1960), em células primordiais e suas descendentes (FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999).

Essa anormalidade genética característica da LMC resulta da translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 [t(9;22)(q34;q11)] (ROWLEY, 1973). A translocação cria dois novos genes: *BCR-ABL* no cromossomo 22q- ou cromossomo Ph, e o recíproco *ABL-BCR* no cromossomo 9q+ (DE KLEIN, *et al.*, 1982; HEISTERKAMP, *et al.*, 1983).

A anormalidade genética característica da LMC, gene *BCR-ABL*, é observada em células das linhagens eritróide, granulocítica, megacariocítica e linfóide (KURZROCK, GUTTERMAN, TALPAZ, 1988). O gene quimérico *BCR-ABL*, por sua vez é transcrito e traduzido na oncoproteína BCR-ABL que apresenta como característica principal uma atividade tirosina kinase (TK) descontrolada (BEN-NERIAH, 1986; McLAUGHLIN, CHIANESE, WITTE, 1987; DALEY, VAN ETTEN, BALTIMORE, 1990).

A atividade da proteína BCR-ABL é necessária e suficiente para a atividade oncogênica da fase inicial da LMC: principalmente a superprodução de células da série granulocítica (DALEY, VAN ETTEN, BALTIMORE, 1990; PASTERNAK, HOCHLAUS, SCHUTEIS, 1998; FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999; GORDON, DAZZI, MARLEY, 1999).

A ativação do proto-oncogene *c-Abl* ocorre como resultado da adição de éxons do gene *BCR* e quebra do primeiro éxon do gene *ABL*. Variação na quantidade de éxons do gene *BCR* resulta em diferenças funcionais entre as proteínas de fusão de pesos moleculares diferentes (LUGO *et al.* 1990).

Dependendo do ponto de quebra *break cluster region* (*bcr*) no gene *BCR*, três principais tipos de genes *BCR-ABL* podem ser formados, levando à geração de proteínas de fusão de tamanhos diferentes (p190, p210, p230) (LUGO *et al.* 1990; MELO, 1996).

Proteína 190BCR-ABL (p190^{BCR-ABL}) tem uma atividade TK mais alta e está associada com o desenvolvimento de um fenótipo de leucemia aguda mais agressiva (LUGO *et al.*, 1990).

O gene híbrido predominante na LMC clássica é derivado da quebra na principal região de quebra (Mbc) com a geração de uma proteína de fusão citoplasmática com peso molecular de 210kd (P210^{BCR-ABL}), que está associado a uma doença com evolução mais indolente (LUGO, 1990; MELO, 1996; KANTARJIAN, *et al.*, 2000).

LMC é uma síndrome mieloproliferativa, termo primeiramente utilizado por Damesheck, em 1951, modificado para Neoplasia Mieloproliferativa Crônica, na 4ª edição da classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de Tumores Hematopoéticos e Tecidos Linfóides. Nesta categoria encontram-se mais outras sete doenças hematológicas, a saber: Leucemia Neutrófila Crônica, Policitemia Vera, Mielofibrose Primária, Trombocitemia Essencial, Leucemia Eosinofílica Crônica, Mastocitose e Neoplasia Mieloproliferativa não classificável (SWERDLON *et al.*, 2008).

A LMC é uma doença progressiva e geralmente evolui através de três fases distintas caracterizadas por piora do quadro clínico e laboratorial. São elas: fase crônica, fase acelerada e crise blástica (FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999; MELO; HUGHES; APPERLEY, 2000).

A maioria dos pacientes é diagnosticada na fase crônica, sendo o diagnóstico incidental. Durante esta fase ocorre uma expansão clonal maciça de células mielóides, que mantém a capacidade de diferenciação (KANTARJIAN, TALPAZ, 1993; FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999; SAWYERS, 1999).

A fase crônica tem duração média de 4 a 5 anos. A característica laboratorial, fundamental, ao diagnóstico, é a leucocitose com desvio não escalonado observado no hemograma. A contagem de leucócitos encontra-se na faixa de 100.000/mm³ a 300.000/mm³, às custas do aumento de neutrófilos em diferentes estágios de maturação, com picos nos percentuais de mielócitos e neutrófilos segmentados (SPIERS, BAIN, TURNER, 1977). Blastos são menos que 2% no sangue periférico e menos que 5% na medula óssea. Basofilia está usualmente presente podendo ser observado também eosinofilia. Anemia normocrômica e normocítica é comum. O número de plaquetas está elevado em aproximadamente 50% dos pacientes ao diagnóstico. A contagem de plaquetas acima de 700.000/mm³ é considerada um indicador prognóstico desfavorável (SOKAL, *et al.*, 1984).

A medula óssea é hiper celular, com intensa hiperplasia granulocítica, diferenciação preservada, e uma relação mielóide: eritróide acima de 10:1. O número de blastos é inferior a 10%. Hiperplasia megacariocítica pode ser observada. A biópsia óssea ratifica a hiper celularidade e é importante para avaliar a fibrose e a proliferação de fibras de reticulina (FARDEL, *et al.*, 1999).

Quando os sintomas aparecem, eles são relacionados à expansão das células do clone leucêmico e consistem de fadiga, perda de peso e desconforto devido à esplenomegalia. A leucocitose pode levar ao surgimento de sinais e sintomas relacionados à hiperviscosidade tais como hemorragia retiniana, priapismo, acidente vascular, confusão e estupor (FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999).

Em pacientes não tratados e em uso de terapêutica baseada em drogas citorreduzidoras, após em média três a cinco anos, o clone leucêmico perde a capacidade de diferenciação e a doença progride. O reconhecimento da progressão da doença da fase crônica para as fases transformadas (fase acelerada e fase blástica) é importante para o prognóstico e tratamento (KANTARJIAN, *et al.*, 1988).

O diagnóstico de fase acelerada, segundo a OMS, pode ser feito na presença de qualquer um dos seguintes parâmetros: 1 - persistente aumento dos leucócitos ou do baço; 2- persistente trombocitose não responsiva à terapia; 3 - persistente trombocitopenia; 4- evolução citogenética clonal (KANTARJIAN, *et al.*, 1988) 5 – basofilia acima de 20% no sangue periférico; 6 – 10% a 19% de mieloblastos no sangue periférico ou na medula óssea. O surgimento de anormalidade clonal adicional à presença do cromossomo Ph é suficiente para caracterização da fase acelerada (SWERDLOW *et al.*, 2008).

A fase blástica, é definida pela presença de infiltração extramedular blástica (CORTES, TALPAZ, KANTARJIAN, 1996; FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999), ou mais que 20% de blastos no sangue periférico e/ou medula óssea (SWERDLOW, *et al.*, 2008).

Em 1/3 dos pacientes na fase aguda os blastos expressam marcadores linfóides e 2/3 dos pacientes apresentam fenótipo de leucemia mieloblástica aguda ou indiferenciada (KANTARJIAN, *et al.*, 1988). A linhagem dos blastos pode ser difícil de determinar pela morfologia, sendo necessária a análise citoquímica e imunofenotípica. A proliferação extramedular de blastos se observa mais comumente na pele, linfonodo, baço, osso e sistema

nervoso central. A expectativa de vida é de 3 a 6 meses após o início da crise blástica (QUINTÁS-CARDAMA, CORTES, 2006).

A análise citogenética é o teste padrão ouro para o diagnóstico de LMC, é também uma ferramenta valiosa na detecção de anormalidades cariotípicas adicionais que ocorrem com a resistência ao tratamento e a evolução da doença (MITELMAN, 1993).

O cromossomo Ph é observado nas células nucleadas do sangue periférico e da medula óssea em 90% dos pacientes com LMC. Nos pacientes nos quais a citogenética falha em detectar o cromossomo Ph (10% dos casos), a análise molecular (FISH ou PCR qualitativo) irá detectar o rearranjo BCR-ABL em até 50% destes casos (DEININGER, GOLDMAN, MELO, 2000; BRANFORD, *et al.*, 2004).

O estudo molecular não deveria substituir a citogenética tradicional uma vez que anormalidades cromossômicas adicionais nas células Ph⁺ poderiam não ser detectadas (DEININGER, GOLDMAN, MELO, 2000; DEININGER, 2008).

Embora possua uma origem molecular comum caracterizada pelo cromossomo Ph, o curso clínico da LMC é variável, com alguns pacientes progredindo rapidamente enquanto outros permanecem na fase crônica por um longo tempo (CORTES, TALPAZ, KANTARJIAN, 1996).

O prognóstico da LMC pode variar significativamente mesmo entre pacientes que se encontram na mesma fase da doença. Estratégias para estratificação de risco são importantes como um guia de prognóstico e para o manuseio do paciente (SOKAL *et al.*, 1984).

Há 2 grupos de fatores prognósticos a serem considerados em pacientes com LMC: aqueles que podem ser identificados antes do tratamento e os que são identificados durante o tratamento. Os principais fatores iniciais são a fase da doença e o risco relativo (RR).

A fase da doença influencia fortemente a resposta, a duração da respostas e a sobrevida total sendo observados melhores resultados na fase crônica que na fase acelerada e na fase acelerada que na crise blástica (QUINTAS-CARDAMA, CORTES, 2006).

Várias estratégias de estratificação de risco têm sido desenvolvidas na tentativa de orientar o manejo do paciente (SOKAL *et al.*, 1984; GRATWOHL, HERMANS, NIEDERWIESER, 1993; HASFORD, PFIRRMANN, HEHLMAN, 1998).

O sistema mais extensivamente utilizado é o escore de Sokal, neste sistema a taxa de risco de óbito é calculada utilizando características da doença. Este sistema de escore estabelece três

grupos prognósticos com taxas de risco de menos que 0,8; 0,8 a 1,2 e mais que 1,2 com médias de sobrevida de aproximadamente 4,5; 3,5 e 2,5 anos, respectivamente (SOKAL *et al.*, 1984).

Apesar deste sistema de estratificação ter sido criado a partir da observação de pacientes tratados com drogas que atualmente não se encontram mais em uso tais como bussulfan, e esplenectomia, estudos mais recentes tem demonstrado sua aplicabilidade em séries mais modernas (BACCARANI *et al.*, 2009).

Embora alguns fatores prognósticos tenham perdido seu valor preditivo com o uso de inibidores de TKs, o escore de Sokal ainda é capaz de identificar pacientes com diferentes probabilidades de responder ao imatinibe apesar de que os pacientes com escores de alto risco apresentam agora uma melhor resposta (QUINTAS-CARDAMA, KANTARJIAN, TALPAZ, 2005).

O RR, baseado no sistema de Sokal consegue predizer a resposta citogenética. Os fatores de significância prognóstica no sistema de Sokal são idade superior a 60 anos, tamanho do baço, plaquetas acima de 700.000, o número de basófilos e de blastos no sangue periférico e medula óssea (SOKAL *et al.*, 1984).

Outros sistemas de escore propostos são o escore de Hasford, 1998 e o de Gratwohl, 1993 que foram desenvolvido para serem utilizado em pacientes tratados com IFN- α e submetidos a transplante de células tronco, respectivamente.

A LMC tem uma incidência anual em todo o mundo de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes. Dos 44.240 novos casos de leucemias diagnosticadas nos EUA, em 2007, aproximadamente 4.600 foram LMC, representando em torno de 10% de todas as leucemias, com incidência maior no sexo masculino (JEMAL, *et al.*, 2007).

A média de idade de apresentação é de 45 a 55 anos, porém pode ocorrer em qualquer idade (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2006). Kalidas, Kantarjian, Talpaz (2001) observaram a idade média de diagnóstico entre 50 e 60 anos e o percentual de pacientes diagnosticados acima de 60 anos variava de 12 a 30%. Em revisão de Redaelli e colaboradores, 2004, foi observado que a faixa etária mais comum de apresentação da LMC era dos 40 a 60 anos. Pasquini e colaboradores (2010) verificaram que a média de idade do diagnóstico variava de acordo com a região estudada sendo mais elevada nos Estados Unidos (53 anos) e mais baixa na Ásia, 41 anos.

O fator responsável pela indução do cromossomo Ph é desconhecido, embora tenha sido observado um aumento da frequência de LMC em indivíduos expostos à explosão da bomba

atômica, em 1945 no Japão (MALONEY, LANGE, 1954; TANAKA *et al*, 1989) e em expostos a radiação ionizante (DEININGER, *et al*, 1998) como radiologistas e pacientes tratados com radioterapia (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2006).

Na LMC, a molécula de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) transcrita do gene híbrido, *BCR-ABL*, contém uma das duas junções, designadas *e13a2* (formalmente *b2a2*) e *e14a2* (*b3a2*). Ambos os RNAs são traduzidos em uma oncoproteína de peso molecular de 210 kD (QUINTAS-CARDAMA; CORTES, 2006) necessária e suficiente para induzir as alterações observadas na fase crônica da LMC (DALEY, VAN ETTEN, BALTIMORE, 1990; DALEY, VAN ETTEN, BALTIMORE, 1991; PEAR, *et al.*, 1998).

O potencial leucemogênico da p210^{*BCR-ABL*} reside no fato de que a atividade TK ABL, normalmente regulada, é constitutivamente ativada pela justaposição da seqüência estranha do *BCR*. O *BCR* age promovendo dimerização da oncoproteína que fosforila as moléculas *BCR-ABL* adjacentes. A atividade quinase descontrolada da *BCR-ABL* usurpa a função fisiológica da enzima ABL normal, através da interação com uma variedade de proteínas efetoras (WILSON-RAWS *et al.*, 1996; MELO, HUGHES, APPERLEY, 2003 ou 2000).

Quatro principais mecanismos tem sido implicados na transformação maligna pelo *BCR-ABL*:

Adesão alterada ao estroma e matriz extracelular – a regulação da hematopoese normal envolve a interação entre as células do estroma e as células progenitoras hematopoéticas. A LMC é clinicamente caracterizada pela prematura liberação de células progenitoras da medula óssea, um fenômeno que pode ser atribuído a defeitos nas propriedades de adesão destas células. Alguns eventos leucemogênicos como observados na LMC produzem seletiva vantagem de crescimento pela diminuição da capacidade das células de aderir ao estroma da medula óssea (GORDON, *et al.*, 1987; VERFAILLIE *et al.*, 1997).

Sinalização mitogênica ativada – O *BCR-ABL* pode revogar a dependência aos fatores de crescimento. Vários mecanismos podem ser operativos, incluindo ativação de moléculas sinalizadoras intracelulares (ILARIA JR, VAN ETTEN, 1996), interação de receptores de fatores de crescimento (por exemplo, receptores para interleucina-3 e fator de células tronco) (WILSON-RAWLS *et al.*, 1996; DONATO *et al.*, 2001) e o aumento da expressão dos próprios fatores de crescimento (JIANG, *et al.*, 1999).

Reduzida apoptose – a expressão da oncoproteína BCR-ABL prolonga a sobrevivência das células progenitoras mielóides e granulócitos maduros através da inibição da apoptose. Este mecanismo pode permitir às células acumularem alterações genéticas secundárias que tem um papel importante na expansão clonal, progressão tumoral e resistência à terapia citotóxica (BEDI *et al.*, 1994).

Degradação de proteínas inibitórias da Abl TK – o domínio SH3 (*Src-homology 3*) tem um papel crítico na regulação da atividade TK da proteína Abl. a oncoproteína BCR-ABL induz a degradação das *Abl interactor proteins 1 and 2* (Abi-1 e Abi-2) as quais ativam a função inibitória do domínio SH3. Portanto tal degradação é outra maneira através da qual BCR-ABL induz transformação celular (DAI, *et al.*, 1998).

Uma vez confirmado o diagnóstico de LMC, o tratamento está indicado em todos os pacientes. Pacientes diagnosticados atualmente podem esperar ter uma sobrevivência substancialmente maior que pacientes diagnosticados há 20 ou mesmo 10 anos atrás em vista das novas abordagens terapêuticas (CORTES, KANTARJIAN, 2005).

O tratamento da LMC acompanhou a evolução do conhecimento sobre a patogênese desta doença conforme descrito por Geary, 2000, em sua revisão histórica da LMC. No século XIX, era utilizado arsênico. A irradiação esplênica foi utilizada como opção terapêutica a partir do final do século XIX até meados do século XX (GEARY, 2000; TEFFERI, 2008).

O Bussulfan (Bus) foi introduzido em 1959, dez anos mais tarde hidroxiurea (Hu) se tornou disponível para o tratamento de LMC com demonstrado aumento da sobrevivência em relação ao Bus (HEHLMANN, *et al.*, 1993). Tais agentes são capazes de normalizar rapidamente as elevadas contagens de leucócitos na fase crônica da doença, porém não induzem remissão citogenética, portanto não estão associados a mudanças no curso natural da doença (HEHLMANN *et al.*, 1993).

Na década de 70, transplante de medula óssea (TMO) e regimes de tratamento com interferon alfa (INF- α) demonstraram ser mais eficazes que a quimioterapia convencional para o tratamento da LMC, sendo potencialmente capazes de modificar a história natural da doença, porém associados com diferentes taxas de riscos e benefícios (GRATWOHL, HERMANS, NIEDERWIESER, 1993).

O TMO é considerado a única forma de tratamento curativa, cujo sucesso depende de múltiplos fatores como idade, fase da doença, compatibilidade HLA, e está associado a uma alta

taxa de morbidade e mortalidade (GRATWOHL, HERMANS, NIEDERWIESER, 1993). O IFN- α era a terapia padrão para os casos de LMC na fase crônica até a descoberta do mesilato de imatinibe (MI) (KANTARJIAN, TALPAZ, GUTTERMAN, 1987).

As pesquisas objetivando o tratamento da leucemia através da inibição do oncogene se iniciaram na década de 90 (BURKE JR, *et al*, 1992) e culminaram em 1996 com a síntese do composto GCP571148B (imatinibe) que inibe a Abl e várias outras TKs (BUCHDUNGER *et al*, 1996), tais como c-Kit, fator de crescimento derivado das plaquetas alfa e beta (PDGF alfa e beta) e gene relacionado ao Abl (ARG) (DRUKER *et al.*, 1996; BERAN *et al.*, 1998; DRUKER *et al.*, 2001).

O oncogene *BCR-ABL* funciona como um ativador natural da proteína TK. Esta proteína liga-se ao ATP e transfere fosfato do adenosina trifosfato (ATP) para resíduos de tirosina em proteínas específicas. Estas proteínas, agora fosforiladas, tornam-se responsáveis por uma série de etapas que levam aos defeitos fisiopatológicos observados na LMC. Por essa razão, sendo a ligação do ATP com essa tirosina bloqueada, todas as etapas envolvidas também serão bloqueadas. O conhecimento desse mecanismo foi essencial para o desenvolvimento de uma terapia efetiva e seletiva para a LMC (DEININGER, GOLDMAN, MELO, 2000).

Estudos clínicos estabeleceram a ação do composto em pacientes com LMC (DRUKER *et al.*, 1996), e em 1998, Imatinibe foi introduzido no arsenal de drogas para o tratamento da LMC (DEININGER, GOLDMAN, MELO, 2000).

A partir do ano 2000, Imatinibe se tornou o tratamento inicial para LMC, conduta que foi respaldada por estudos populacionais *International Randomized Study of Interferon and STI571* (DRUKER *et al.*, 2001; DRUKER *et al.*, 2006). A introdução do imatinibe iniciou a era da terapia molecular, com resultados marcantes, incluindo completa resposta citogenética em até 90% dos pacientes e com resposta molecular na maioria (CORTES, KANTARJIAN, 2005).

O Imatinibe também induz resposta em uma significativa porcentagem de pacientes que se encontram nas fases acelerada e blástica. Esta resposta é, porém, transitória. Alguns pacientes com LMC, particularmente, aqueles em estado avançado, poderão apresentar resistência primária ou secundária ao imatinibe (DRUKER, *et al.*, 2006; MELO, CHUAH, 2007; BACCARANI, *et al.*, 2009).

Novos inibidores das TKs Abl tem sido desenvolvidas com aumento da potência e menor necessidade de ligações estritas, e em alguns casos com ação inibitória sobre outras quinases envolvidas no mecanismo de resistência ao imatinibe (MELO; CHUAH, 2007).

Os agentes que bloqueiam *BCR-ABL* de uma maneira não ATP-competitiva podem representar uma alternativa para paciente que desenvolveram mutações, tornando-os insensíveis ao imatinibe (MELO; CHUAH, 2007).

Nilotinibe (AMN107) - É estruturalmente não relacionado ao imatinibe, ele inibe membros da família de quinase Src. O Nilotinibe é 20 a 30 vezes mais potente que o imatinibe. Este aumento de potencia se deve provavelmente a um melhor ajuste ao domínio da *Kinase* Abl. O Nilotinibe inibe a atividade TK da maioria dos mutantes *BCR-ABL* clinicamente importantes (O'HARE *et al.*, 2005).

O dastinibe (354825) é um agente com capacidade inibitória contra outras *kinases*, é um ATP competitivo, inibidor duplo específico para Src e *Abl-kinase*, com potencia 100 a 300 vezes maior que o imatinibe. Assim como o nilotinibe, ele não inibe o mutante T315I (LOMBARDO *et al.*, 2004; O'HARE *et al.*, 2005).

É possível que só a inibição da *BCR-ABL* não seja suficiente para erradicar as células da LMC, particularmente as células tronco quiescentes que são imatinibe insensíveis (BARNES, MELO, 2006; QUINTAS-CARDAMA, CORTES, 2006).

Eventos imune-mediados têm papel importante na supressão do clone de LMC. O uso de vacinas que elicitam resposta imune específica dirigida a antígenos tumorais restritos à LMC estão em estudo (PINILLA-IBARZ, , KORONTSVIT, 2000; CATCHART, *et al.*, 2004; BOCCHIA, *et al.*, 2005;. A imunomodulação também poderia eliminar pequena quantidade de doença residual (BARNES; MELO, 2006).

Estudos têm demonstrado que a inibição da formação de EROs através do uso concomitante de antioxidantes N acetilcisteina e vitamina E diminui a taxa de mutagênese e a frequência de resistência ao imatinibe (KOPTIRA *et al.*, 2006).

Algumas questões permanecem a serem respondidas, porém “A despeito de todas as incertezas, as perspectivas de tratamento para pacientes com LMC nunca foram tão claras” (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2006).

1.2 Estresse Oxidativo

Oxigênio é uma molécula essencial para todos os organismos aeróbios e tem papel predominante na geração de ATP. Espécies reativas são geradas, como subproduto, durante este processo. Um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, e sua eliminação pelos mecanismos protetores, os antioxidantes é definido como estresse oxidativo (GUTTERIDGE, 1995).

A produção de espécies reativas ou radicais livres é gerada durante o metabolismo normal de toda célula eucarionte em diversas localizações celulares. As mitocôndrias são consideradas as principais fontes de geração intracelular destas espécies, ocorrendo também no retículo endoplasmático, no citosol e nos peroxissomas (GUTTERIDGE, 1995).

Os oxidantes são também gerados por diferentes tipos de radiação com a irradiação X gerando radical hidroxila, irradiação com luz ultravioleta gerando estados eletronicamente excitados com subsequente formação de radicais. Ultrassom e radiação de micro-ondas podem também gerar EROs (SIES, 1997). Os radicais mais relevantes na regulação biológica são:

- Os formados durante o processo de redução do O_2 à água, também conhecidos como espécies reativas do oxigênio (EROs): O ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila HO^\cdot (SIES, 1997);
- O Óxido Nítrico (NO), produzido pela oxidação de um dos átomos terminais de nitrogênio da L-arginina, processo catalizado pela enzima Óxido Nítrico Sintetase (NOS). Dependendo do meio ambiente, NO pode ser convertido a várias outras espécies reativas de nitrogênio (ERNs) tais como o cátion nitrosônio (NO^+), o anion nitroxil (NO^-) ou peroxinitrito ($ONOO^-$) que podem modificar macromoléculas incluindo proteínas lipídios e ácidos nucleicos (MARLETTA, 1994).

Os radicais têm uma capacidade de reagir de maneira indiscriminada podendo lesar qualquer componente celular. Para proteger os componentes celulares das lesões induzidas por estes radicais, existem defesas antioxidantes (SIES, 1997).

Na definição de Halliwell e Gutteridge, 1997, “antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparado com a concentração do substrato oxidável, significativamente diminui ou inibe a oxidação daquele substrato”.

Os princípios básicos que regem as funções antioxidantes são:

1 – Prevenção - A primeira linha de defesa contra as espécies reativas de Oxigênio é a proteção contra a sua formação. A quelatação de metais, principalmente cobre e ferro, é o principal mecanismo de controle da peroxidação lipídica e fragmentação do DNA. Portanto a ligação das proteínas ferritina, transferrina, ceruloplasmina e outras metalotioninas aos metais, são de importância central no controle de rações potencialmente geradoras de radicais.

2 – Intercepção - este é o domínio dos antioxidantes propriamente ditos. Os radicais lesivos, uma vez formados, são interceptados para prevenir as suas ações deletérias.

3 - Reparo e eliminação de moléculas com danos excessivos – Os processos de prevenção e a intercepção não são completamente efetivos. Produtos de lesões oxidativas podem se acumular causando lesão no DNA na forma de bases lesadas, quebras de fitas de DNA simples ou dupla; danos na membrana e lesões protéicas e em outros compostos. Existem múltiplos sistemas enzimáticos envolvidos no reparo do DNA, enzimas lipolíticas e proteolíticas capazes de restituir funções ou mesmo substituir compostos extremamente lesados (SIES,1993).

A função de interceptar os radicais lesivos pode ser realizada pelos antioxidantes não-enzimáticos e os antioxidantes enzimáticos.

1 - Os antioxidantes não enzimáticos estão envolvidos nos processos de desativação, isto é, a formação de não radicais e produtos finais não reativos a partir de compostos radicais ou a transferência de radicais livres de sítios mais sensíveis para compartimentos celulares no qual o estresse oxidativo possa ser menos deletério. Em geral, isto significa transferir os agentes oxidantes de fases hidrofóbicas para fases aquosas, isto é, da membrana para o citosol ou da lipoproteínas para o meio aquoso do plasma (YOUNG, WOODSIDE, 2001).

Os Antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada. Entre os antioxidantes não enzimáticos podemos citar as vitaminas Lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, beta-caroteno) e Vitaminas Hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B) os oligoelementos (Zinco, cobre, selênio, magnésio etc.), os bioflavonóides (derivados de plantas) e os tióis antioxidantes (Glutationa, Thioredoxina e Ácido Lipóico) que são radicais hidrofílicos decompositores (BECKMAN, AMES, 1998).

A capacidade antioxidante dos compostos Tiois é devido ao átomo de enxofre que facilmente aceita a perda de um elétron ((KAROUI *et al.*,1996; SIES,1997).

As principais funções protetoras da glutathiona contra o estresse oxidativo são: agir como cofator para várias enzimas detoxificantes; participar do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática e decompor radicais hidroxila (MEISTER, ANDERSON, 1983).

Elevados níveis de GSH são observados em vários tipos de células cancerosas e tumores sólidos tornando estas células mais resistentes à quimioterapia. CALVERT, *et al.*, 1998; BALENDIRAN, DABUR, FRASER, 2004; ESTRELA, ORTEGA, OBRADOR, 2006).

2 - Antioxidantes enzimáticos – todas as células eucarióticas possuem poderosas enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes catalizam a quebra dos radicais livres principalmente no meio intracelular (SIES, 1993).

As três principais classes de enzimas antioxidantes são:

Superóxido dismutase (SOD) que representam o principal sistema antioxidante enzimático intracelular: Cobre e Zinco superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD) no citoplasma e manganês Superóxido Dismutase (Mn-SOD) na mitocôndria, rapidamente e especificamente reduzem HO^- a H_2O_2 (MARKLUND, 1982; MATES, PEREZ-GOMEZ, DE CASTRO, 1999);

Glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a oxidação da glutathiona através da conversão do hidroxiperóxido que pode ser peróxido de hidrogênio ou outra espécie tais como hidroxiperóxido lipídico. A glutathiona peroxidase parece ser o principal mecanismo de decomposição do peróxido de hidrogênio no citosol (MEISTER, ANDERSON, 1983);

Catalases (CAT) cataliza os dois estágios de conversão do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. Está localizada dentro das células, nos peroxissomos, que também contem a maioria das enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogênio. (KIRKMAN, GALIANO, GAETANI, 1987).

Alem disso existem enzimas com função antioxidante indireta; Glutathiona S redutase (GSSG-redutase) que repõe a GSH a partir da GSSG; e Glutathiona S transferase (GSSG-transferase) responsável pelo transporte e eliminação de compostos reativos e pelo sistema de transporte para os conjugados S-glutathiona (SIES, 1997).

Quando há um desequilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes dentro da célula, nas membranas e no espaço extracelular, com aumento das espécies reativas pode ocorrer lesão de importantes biomoléculas e células, com potencial impacto em todo o organismo (REUTER *et al.*, 2010).

As principais ações das espécies reativas nos sistemas biológicos são: peroxidação lipídica, oxidação protéica e dano ao DNA.

A peroxidação lipídica um processo através do qual as EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, desta feita, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares, resultando na ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg); Mutações do DNA; Oxidação dos lipídios insaturados; Formação de resíduos químicos como o malonaldeído; Comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina (GUTTERIDGE, 1995).

A modificação protéica determinada pelas EROs é iniciada principalmente por reações com radical hidroxila (OH[•]). Coletivamente os radicais formados neste processo podem levar a oxidação de resíduos de aminoácidos das cadeias laterais, formação de ligações cruzadas entre proteínas e oxidação do arcabouço resultando na fragmentação protéica (BERLETT, STADTMAN, 1997).

A oxidação de resíduos de aminoácidos que contem enxofre, são particularmente sensíveis a ação das EROs porém são os únicos que podem converter os seus resíduos oxidados à sua forma não modificada. Portanto são as únicas modificações oxidativas protéicas passíveis de reparação.

A clivagem oxidativa de proteínas leva à formação de derivados carbonil que podem ser usado como marcador de oxidação protéica mediada por EROs. O nível intracelular de proteína oxidada reflete o equilíbrio entre a taxa de oxidação protéica e a taxa de degradação de proteína oxidada que também é dependente de muitas variáveis, incluindo a concentração de proteases cuja ação lítica pode gerar inúmeros fatores que, por sua vez, podem afetar sua atividade proteolítica (BERLETT, STADTMAN, 1997).

Danos ao DNA tem sido observado em muitos tipos de células, de invertebrados a mamíferos, e em resposta a formas múltiplas e diferentes de estresse oxidativo. O O₂^{-•} e o H₂O₂ não estão envolvidos diretamente em danos ao DNA, entretanto, sua interação com metais de transição, por meio da reação de Fenton, promove oxidação dos filamentos de DNA e modificações em sua base. Em situações de estresse crônico, EROs são produzidas ao longo do tempo e então pode ocorrer dano significativo na estrutura e na função celular, podendo levar a mutações somáticas e transformação neoplásica (FANG; SEKI; MAEDA, 2009).

A observação do aumento do estresse oxidativo em condições patológicas tem sugerido o uso de biomarcadores de estresse oxidativo/nitrosativo para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, terapêuticas e preventivas para impedir ou retardar o desenvolvimento de complicações.

Produtos da peroxidação lipídica tem sido comumente utilizado como biomarcadores do estresse e dano oxidativo. A peroxidação lipídica gera uma variedade de produtos finais de decomposição relativamente estáveis. Os reativos de aldeído alfa beta insaturados, tais como malonaldeído (MDA), 4 hidroxi 2 nonenal (HNE) e 2-propenal (acroleína) e isoprostano podem ser medidos no plasma e urina como um índice indireto de estresse oxidativo (DALLE-DONNE, *et al*, 2006).

A técnica mais largamente utilizada para avaliar a peroxidação lipídica é a análise do TBARS que inclui MDA. MDA é um cetoaldeído produzido pela decomposição peroxidativa de lipídios insaturados (DALLE-DONNE, *et al*, 2006). TBA reage com o MDA e produz um cromógeno que pode ser quantificado pelo espectrofotômetro (DRAPER, HADLEY, 1990).

Autores tem medido as concentrações de GHS e GSSG no sangue total ou hemácias, comparando os resultados obtidos em indivíduos saudáveis com os encontrados em pessoas afetadas por várias doenças, reportando a correlação entre a doença e as alterações nas concentrações de GSSG, GSH ou GSH/GSSG (ISIDÓRIO, SILVEIRA, 2008)

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema redox está íntegro, haverá recuperação da GSH via glutathione reductase na presença de NADPH (ISIDÓRIO, SILVEIRA, 2008).

A formação de compostos carboniol é o mais largamente utilizado marcador de severa oxidação protéica (DALLE-DONNE *et al*, 2006).

As EROs geram sob certas condições lesão no DNA da célula, e várias técnicas tem sido desenvolvidas para medir as modificações observadas nas bases do DNA.

1.3 Estresse oxidativo e câncer

A superprodução de EROs ou a supressão da habilidade celular de eliminar as EROs , pode resultar num aumento de espécies reativas no meio intracelular, levando a lesão celular incluindo peroxidação lipídica, modificações oxidativas do DNA, oxidação protéica e inativação enzimática (REUTER *et.al*, 2010).

O acúmulo de lesão oxidativa tem sido implicada na formação de vários tipos de doenças, inclusive câncer (KLAUNIG *et.al*, 1998).

Os efeitos biológicos do estresse oxidativo no câncer são múltiplos e não lineares (FANG, SEKI, MAEDA, 2009).

A lesão oxidativa aguda pode produzir morte celular seletiva e aumento compensatório da proliferação celular que pode resultar na expansão clonal seletiva de células preneoplásicas latentes. Níveis baixos ou intermediários de estresse oxidativo, lesão oxidativa subletal, são mais efetivos em produzir lesões do DNA causando mutação, reação inflamatória e finalmente induzindo à carcinogênese (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002; FANG, SEKI, MAEDA, 2009).

Espécies reativas de oxigênio tem um potencial carcinogênico pois elas facilitam a mutagênese, a promoção e progressão tumoral (DREHER, JUNOD,1996). EROs tem sido consideradas como uma classe endógena de carcinógeno visto que desencadeia mutação nas células (GUYTON, KENSLER, 1993; CERUTTI, 1994; FANG; SEKI; MAEDA, 2009).

O estágio inicial envolve uma mutação somática e não letal que confere vantagem de crescimento. Espécies reativas podem mediar esta ativação Inicial através da formação de bases de DNA hidroxiladas, uma lesão oxidativa comum considerada um importante evento na carcinogênese, pois interfere com o crescimento celular normal causando mutações genéticas e alterando a transcrição gênica normal.

O estágio de promoção tumoral envolve uma expansão clonal seletiva da população de células mutadas através do aumento da divisão celular e/ou diminuição da morte celular. Patologicamente, resultando na formação de uma lesão paraneoplásica (GUYTON, KENSLER, 1993).

As próprias células iniciadas, e as células inflamatórias são fontes de EROs. Estas múltiplas fontes de EROs podem contribuir para o persistente estresse oxidativo que resulta em alterações fisiopatológicas e permitem o crescimento destas células preneoplásicas (KLAUNIG *et.al*, 1998).

Altos níveis de espécies reativas podem alterar as vias de sinalização através de lesão oxidativa da membrana celular, de mudanças na atividade enzimática e/ou de ativação dos fatores de transcrição, que são proteínas de baixo peso molecular que se ligam à região promotora do gene e regulam a transcrição dos genes envolvidos no desenvolvimento, crescimento e envelhecimento celular (VELLANOWETH; SUPRAKAR; ROY, 1994).

O estresse oxidativo está envolvido no processo de regulação da localização subcelular dos fatores de transcrição, do citoplasma para o núcleo. A localização nuclear dos fatores de transcrição é um dos primeiros passos para que tais fatores iniciem suas atividades (REUTER *et al*, 2010).

No estágio de progressão tumoral, o estresse oxidativo tem um papel direto no desenvolvimento das características das células malignas, tais como crescimento descontrolado e instabilidade genômica.

Através do processo de carcinogênese surgem células com genes supressores de tumor deletados e oncogenes ativados e capazes de produzir seus próprios fatores de crescimento (TOYOKUNI *et al*, 1995).

Inúmeros fatores de estresse celular, inclusive EROs são responsáveis por características das células tumorais tais como sobrevivência, proliferação, invasão, quimioresistência, radioresistência e autorenovação que fornece indesejável vantagem às células malignas (TOYOKUNI *et.al*, 1995). Células cancerosas possuem mecanismos antioxidantes super regulados que irão protegê-las contra as espécies reativas de oxigênio ou utilizá-las a seu favor (TOYOKUNI *et.al*, 1995).

A produção de EROs pode ser necessária porém não suficiente para induzir o crescimento da célula maligna (DROGE, 2002). Fatores adicionais tais como defeito na imunovigilância bem como alterações hereditárias na expressão de genes regulatórios de antioxidantes naturais podem fornecer o ambiente necessário para o acúmulo de aberrações no DNA mediada por EROs (PENSERGA; SKORSKI, 2007).

1.4 Estresse oxidativo e LMC

Estresse oxidativo, radiação, químicos genotóxicos e ou estresse de replicação podem induzir quebras de dupla fita de DNA. O reparo infiel destas quebras pode fazer surgir translocações cromossômicas recíprocas. Os genes que codificam tirosinas kinases (TK) são alvo destes mecanismos de erros genéticos, resultando na geração de genes quiméricos que codificam tirosinas kinase de fusão (TKF). As TKF apresentam atividade kinase descontrolada que levam ao desenvolvimento de neoplasias (PENSERGA, SKORSKI, 2007).

A proteína *BCR-ABL*, resultado da translocação (9:22), é uma TKF associada à LMC e a um grupo de LLA. A constitutiva atividade kinase desta oncoproteína é responsável pelo aumento de leucócitos, característica da fase crônica da LMC. Além da proliferação desregulada, na ausência de fatores de crescimento as TKFs protegem as células malignas contra a apoptose e levam também a desregulação da diferenciação e da adesão (BEDI *et al.*, 1994; GORDON *et al.*, 1987; WILSON-RAWLS, *et al.*, 1996; DONATO, *et al.*, 2001; PENSERGA; SKORSKI, 2007).

As TKFs tem um papel importante na modulação da resposta a lesões no DNA, aumentando a habilidade das células malignas de sobreviver ao estresse genotóxico e oxidativo que normalmente induziriam resposta apoptótica em células não leucêmicas (AMARANTE *et al.*, 1998).

As principais linhas de defesa elucidadas pela atividade kinase *BCR-ABL* para dotar às células fenotipicamente anormais de mecanismos de vantagem de crescimento são:

- Estimulo de proteínas antiapoptóticas tais como BCL2 e BCL-X (AMARANTE, *et al.*, 1998) e inibição das proteínas proapoptóticas BAD e BAX como foi demonstrado por Yoshida e colaboradores, 2007.
- Prolongamento das fases S e G₂/M do ciclo celular, estendendo o tempo de reparo bem como ativando os mecanismos de reparo (SLUPIANEK *et al.*, 2006; PENSERGA, SKORSKI, 2007).
- Aumento da atividade dos mecanismos de reparo de quebras de duplas fitas de DNA (TAKEDA, SHIBUYA, MARU, 1999).

Tais mecanismos facilitam a instabilidade genômica manifestada pelo acúmulo de aberrações cromossômicas e mutações levando à progressão da LMC para as fases mais

avançadas (fase acelerada e crise blástica) e aquisição de resistência às moléculas inibidoras das TKFs, como o Imatinibe (HOCHHAUS *et al.*, 2002; BURKE; CARROLL, 2010)

As células *BCR-ABL* positivas são fonte de EROs as quais causam lesão oxidativa no DNA, contribuindo também para a geração de mutações. EROs trabalham em conjunto com *BCR-ABL* para introduzir novas mutações na proteína de fusão, incluído aquelas que codificam resistência ao imatinibe. A inibição da *BCR-ABL* associado à ação de antioxidantes poderia evitar o processo cíclico de mutagênese (KOPTYRA *et al.*, 2006).

Identificar abordagens que reduzam mutações na kinase oncogênica pode ter um grande impacto na eficiência terapêutica da LMC. Avaliar os fatores e mecanismos responsáveis pela resistência à morte celular induzida pelos EROs ainda não estão totalmente elucidados. Entender estes mecanismos pode levar a um maior avanço na prevenção da evolução e no tratamento da LMC (YOSHIDA *et.al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Determinar o perfil oxidativo dos pacientes com LMC acompanhados no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC-UFC).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil clínico (fase da doença e escore de Sokal) e demográfico (idade, sexo) dos pacientes com LMC, ao diagnóstico;
- Comparar os pacientes em relação à atividade da doença com o uso de medicamentos e com o tempo de doença;
- Comparar os parâmetros do perfil oxidativo dos pacientes portadores de LMC estratificados pela a atividade da doença;
- Comparar o perfil oxidativo, dos pacientes com doença ativa estratificados pela inibidor TK em uso (1ª geração ou 2ª geração);
- Comparar o perfil oxidativo dos pacientes com LMC em uso de imatinibe estratificados pela atividade da doença;
- Confrontar o perfil oxidativo dos pacientes com LMC estratificados pelo tempo de doença.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Grupo de estudo

O estudo foi do tipo transversal, em 30 pacientes adultos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de LMC segundo os critérios de classificação da OMS (SWERDLON *et al.*, 2008), acompanhados no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). Os pacientes foram selecionados de forma aleatória obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão definidos abaixo.

- **Crítérios de Inclusão**

Pacientes adultos de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e laboratorial (hemograma, mielograma, citogenética e/ou molecular) de LMC, que estavam em uso de inibidores TK acompanhados no ambulatório de hematologia do HUWC-UFC /HEMOCE.

- **Crítérios de exclusão**

Pacientes com o diagnóstico de LMC na ausência de tratamento com inibidores de TK ou com avaliação citogenética ou molecular há mais de 6 meses, em relação a época do estudo. Pacientes que se recusaram a participar do estudo.

3.1.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 20 indivíduos adultos, de ambos os sexos, com idade variando de 23 a 50 anos, supostamente sadios, selecionados aleatoriamente entre os doadores de

sangue do HEMOCE, não tabagistas e nem etilistas e que não estavam fazendo uso de suplementos vitamínico (Vitamina C e/ou vitamina E).

3.1.3 Obtenção dos dados

Foram obtidas informações, nos prontuários dos pacientes localizados no Serviço de Arquivo Médico-Hospitalar (SAME), do HUWC, e anotadas em ficha clínica padronizada (Apêndice 1, pag. 92), a qual continha a identificação dos pacientes, dados demográficos, clínicos e exames complementares, ao diagnóstico e durante o estudo.

3.2. Estratificação do Grupo de estudo

3.2.1 Estratificação em relação à atividade ou não da doença

Os pacientes com LMC foram estratificados em dois grupos, de acordo com as evidências de atividade da doença, definidas levando-se em conta: 1 - avaliação clínica; 2 - hemograma e os estudos citogenéticos e molecular realizado dentro do período de no máximo 6 meses antes da avaliação do perfil oxidativo de acordo com as recomendações para monitoramento individual dos pacientes com LMC em uso de inibidores TK (BACCARANI *et al.*, 2009).

Grupo 1 - Sem evidências de atividade da doença

Critérios clínicos e hematológicos

Baço impalpável

Leucócitos $\leq 10.000/\text{mm}^3$

Plaquetas $\leq 450.000/\text{mm}^3$

Ausência de células imaturas no sangue periférico

Basófilos $< 5\%$.

Obs.: pacientes que apresentavam contagem plaquetas abaixo de $150.000/\text{mm}^3$ porém igual ou superior a $100.000/\text{mm}^3$ não foram considerados como em atividade da doença sendo esta citopenia imputada à medicação (TALPAZ *et al.*,2006; KANTARJIAN, *et al.*,2006; KANTARJIAN, *et al.*,2011; GNONI *et al.*, 2011).

Critério Citogenético

Ausência de Cromossomo Ph nas metáfases analisadas

Critério Molecular

Queda no número de transcritos BCR-ABL da ordem de 3 ou mais Logs. Baseado no estudo *IRIS* que forneceu evidências que a redução de transcritos BCR-ABL de 3 logs ou mais estava associada à maior sobrevida livre de doença (BACCARANI *et al.*, 2009).

Grupo 2 - Com evidências de doença em atividade

Critérios clínicos e hematológicos (Qualquer um dos abaixo listados)

Baço palpável

Leucócitos $> 10.000/\text{mm}^3$

$100.000/\text{mm}^3 > \text{Plaquetas} > 450.000/\text{mm}^3$

Presença de células imaturas no sangue periférico

Basófilos $\geq 5\%$.

Critério Citogenético

Presença de Cromossomo Ph nas metáfases analisadas

Critério Molecular

Queda no número de transcritos BCR-ABL de 2 Logs ou menos. (BACCARANI *et al.*, 2009).

3.2.2 Estratificados de acordo com o tipo de inibidor de TK

Os pacientes foram estratificados quanto ao uso de Imatinib ou inibidores de 2ª geração de TK no momento do estudo.

3.2.3. Estratificados de acordo com o tempo de doença

Os pacientes foram estratificados de acordo com o tempo de doença, no momento do estudo, tendo como parâmetro a data do diagnóstico: 3 a 5 anos, 6 a 10 anos e > 10 anos de doença.

3.3. Local do Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Doenças Genéticas Hematológicas (LPHDGH) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC), no período de maio a outubro de 2010.

3.4 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC, tendo sido emitido parecer favorável para a execução da pesquisa, sob o protocolo N° 042.05.10.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1 Pag. 95), foi assinado pelos pacientes e pelos voluntários (doadores de sangue) utilizados como controle.

3.5 Métodos

3.5.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas seguindo o procedimento padrão. Foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos de coleta a vácuo contendo heparina para a realização das dosagens dos marcadores do perfil oxidativo (MDA e NO_2^-) e das dosagens das enzimas antioxidantes (CAT e GSH-Px), e tiois: Glutaciona Reduzida(GSH), glutaciona oxidada(GSSH) e glutaciona total.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHDGH), do Curso de Farmácia da UFC onde foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm. O plasma sobrenadante foi retirado, separado em alíquotas em triplicata, enumerados e armazenados a -80°C , para posterior análise. O hemolisado eritrocitário foi obtido da amostra com anticoagulante heparina após processo de remoção completa do plasma e da camada leucocitária por aspiração, de sucessivas lavagens com solução salina (NaCl 0,9%) e da hemólise por adição de água destilada 1:1. O hemolisado foi alicotado em triplicata, identificados e armazenado em freezer a -80°C até a análise. Ambas as amostras foram armazenadas até a análise, cerca de 2 meses após a coleta.

3.5.2 Análises do Perfil oxidativo

- **Protocolo para determinação da concentração de Nitrito (NO_2^-) (GREEN et.al., 1982)**

Este método se baseia na detecção da presença de nitrito em amostras biológicas (urina, plasma, homogenado tecidual) através de uma reação de diazotização com formação de um cromóforo de cor rósea. O método consta da adição de 100 μL da amostra plasmática em 100 μL do reativo de Griess (sulfanilamida 1% cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina (NEED) 0,1% / H_3PO_4 5% / água destilada na proporção de 1:1:1) e absorbância medida em leitor de microplacas em 540 nm. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO_2 (variando de 0,75 à 100 μM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 μL do

reativo de Griess a 100 μL do plasma e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

- **Protocolo para determinação da concentração de Malonaldeído (MDA) (DRAPER, HADLEY, 1990)**

O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico -TBARS. Nessa reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo que tem absorbância máxima em solução ácida em 532nm a 535nm. A quantificação foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo empregado, que consiste na incubação de 150 μL de plasma em banho-maria a 37° por 1 h, seguido por adição de 200 μL de ácido perclórico a 35%, para precipitar as proteínas. Em seguida realizou-se a centrifugação a 14.000rpm por 10 min, após, foi adicionado ao sobrenadante, 100 μL de uma solução de tiobarbiturato de Sódio a 0,6%. A amostra permaneceu em banho-maria aquecido entre 90 e 100°C por 30 min. Após resfriada, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 560nm.

- **Protocolo para determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) (AEBI, 1984)**

A atividade da CAT nos eritrócitos foi determinada por método espectrofotométrico em ultravioleta a 240nm, baseado na monitorização da decomposição de H_2O_2 . Os valores brutos obtidos em Δa (delta/min) foram corrigidos por um fator de correção de decaimento da atividade por diluição do hemolisado, divididos pela absorvidade molar de H_2O_2 a 240nm (ϵ 0,0394 $\text{L mmo}^{-1}\text{mm}^{-1}$).

- **Protocolo para determinação da atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GSH-Px)**

A medida da GSH-Px nos eritrócitos foi determinada utilizando o *kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay® (Sigma-Aldrich)*. O kit utiliza método de determinação indireta da enzima. A análise é baseada na oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG), catalizada pela GPx utilizando a glutathiona redutase (GR) e fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). A diminuição na absorbância do NADPH medida a 340 nm, durante a oxidação de NADPH para NADP é indicativo da atividade de GPx.

- **Determinação das concentrações de Glutathione**

A determinação das concentrações de Glutathione Total, GSH e GSSG foram realizadas utilizando o método empregado no kit Total *Glutathione Activity*® (*Assay Designs, Inc*). A quantificação da Glutathione Total utiliza um método otimizado de reciclagem enzimática. A GR reduz a GSSG a GSG. O grupo sulfidril da GSH reage com o reagente de Ellman, o ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), produzindo um ácido de cor amarela, o ácido 5,5-thio-2-nitrobenzoico (TNB), que é determinado espectrofotometricamente em uma absorvância entre 405 a 414 nm. A taxa de produção de TNB é diretamente proporcional à concentração de Glutathione total na amostra. A medição da absorvância do TNB fornece uma estimativa precisa da glutathione na amostra.

3.6 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.

3.7 Análise Estatística

Os dados coletados foram organizados em planilha eletrônica Microsoft Excel® para a análise estatística de dados não paramétricos foi utilizado o ANOVA® e o Teste de múltiplas comparações de Tukey. Para todos os testes foi considerado o nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 características sócio demográficas dos pacientes

Participaram do estudo 30 pacientes com diagnóstico de LMC, sendo 14 do sexo masculino e 16 do sexo feminino, todos classificados como pardos (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes quanto ao sexo (n=30)

Sexo	Pacientes n=30	%
Masculino	14	47,7
Feminino	16	53,3

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

A idade dos pacientes variou de 22 a 73 anos, com média de 44,13 anos. O pico de prevalência foi observado na faixa etária de 31 a 40 anos. (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes por faixa etária

Faixa etária	Pacientes n=30	%
22 a 30 anos	6	20
31 a 40 anos	10	33,3
41 a 50 anos	3	10
51 a 60 anos	6	20
61 a 70 anos	4	13,3
Acima de 70 anos	1	3,3

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.2 Caracterização clínica dos pacientes ao diagnóstico

Ao diagnóstico, 83,3% dos pacientes se encontravam na fase crônica da doença como se observa pela tabela 3. Nenhum paciente do estudo foi diagnosticado em crise blástica.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes de acordo com a fase da doença ao diagnóstico. (n=30)

Fase da doença	Pacientes n=30	%
Crônica	25	83,3
Acelerada	5	16,7
C. Blástica	0	0

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

O prognóstico dos pacientes foi avaliado através do sistema de prognóstico de Sokal, conforme dados apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes quanto ao escore de Sokal (n=30)

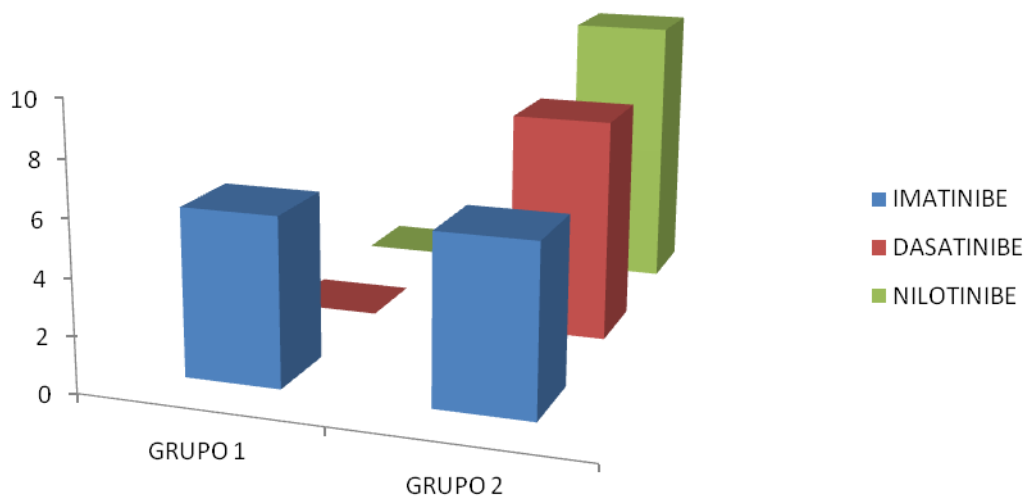
Escore de Sokal	Pacientes (n=30)	(%)
Baixo	8	26
Intermediário	11	37
Alto	11	37

Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.3 Caracterização clínica atual dos pacientes

Na figura 1 se observa que 6 pacientes foram classificados como pertencentes ao grupo 1, sem evidências de atividade da doença. A grande maioria dos pacientes, 24, foi classificada como pertencente ao grupo 2, isto é apresentava evidências de atividade da doença. Todos os pacientes do grupo 1 estavam em uso de imatinibe. Seis pacientes do grupo 2 também faziam uso de imatinibe, 10 estavam em uso de nilotinibe e 8 pacientes estavam em uso de dasatinibe.

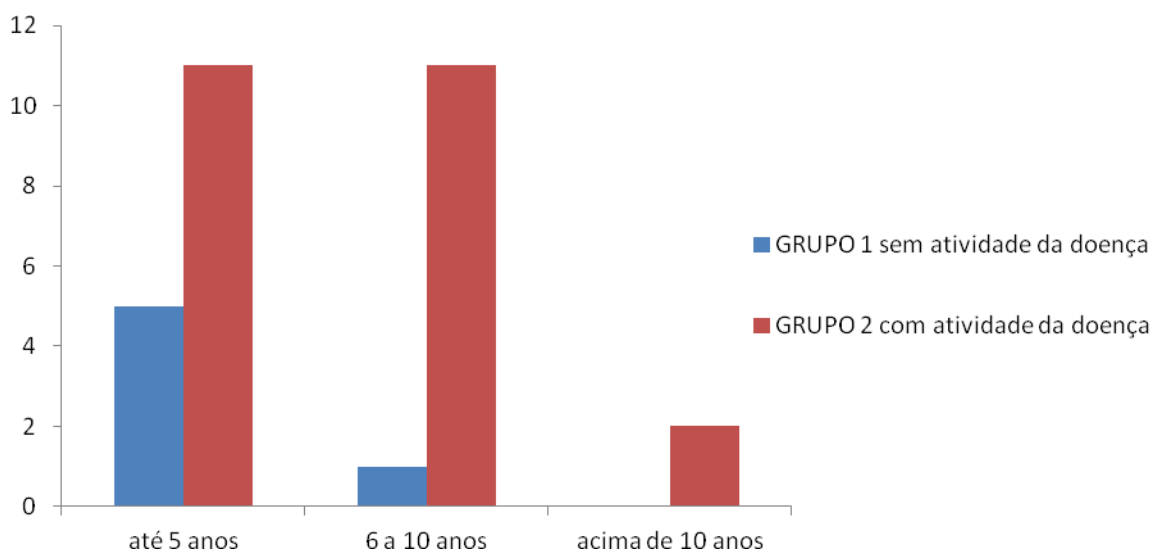
Figura 1 - Distribuição dos grupos quanto à medicação em uso



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

Entre os pacientes com mais de 5 anos de diagnóstico havia 2 pacientes que estavam com mais de 10 anos de doença (19 e 24 anos), tais pacientes se apresentavam com doença em atividade (figura 2).

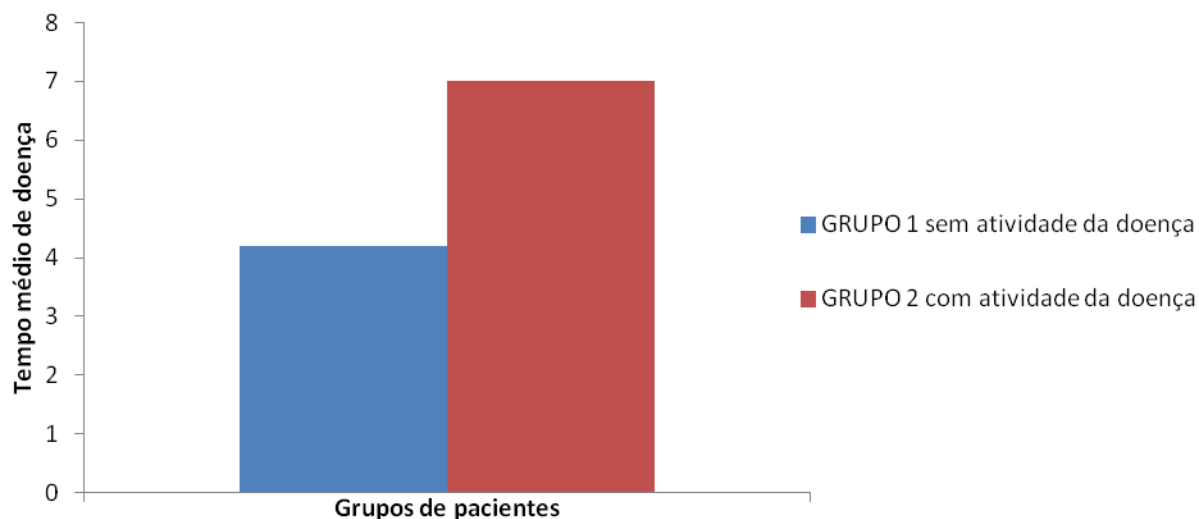
Figura 2 – Distribuição dos pacientes quanto ao tempo de doença e ao nível de atividade da doença.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

O tempo médio de diagnóstico da doença, nos pacientes do grupo 1 foi de 4,2 anos. O grupo 2 tinha em média 7 anos de doença (figura 3).

Figura 3 – Distribuição dos pacientes estratificados pelo nível de atividade da doença quanto ao tempo médio de doença.



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.4 análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes estratificados de acordo com a atividade da doença

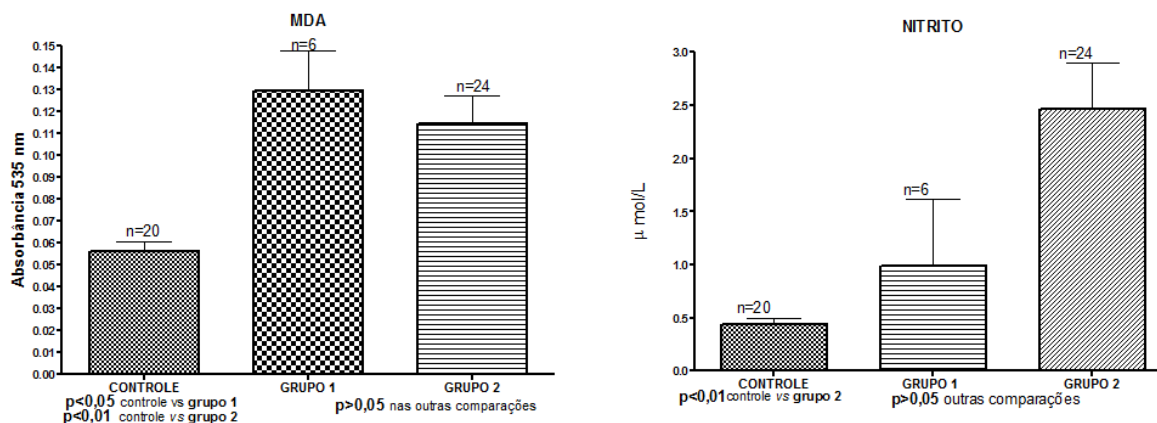
4.4.1 Marcadores do estresse oxidativo

Os níveis de MDA se apresentaram elevados nos grupos de pacientes, em comparação com o grupo controle, observando-se diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Na comparação dos grupos de pacientes entre si não foi observado diferença significante embora tenha havido discreto aumento nos pacientes sem atividade em relação aos com atividade (Figura 4).

Diferença estatisticamente significante ($p < 0,01$) foi observada entre as concentrações de nitrito do grupo controle e do grupo formado por todos os pacientes com doença em atividade. Os pacientes classificados como estando com doença sem atividade, embora apresentassem níveis de

nitrito mais elevados que o grupo controle tal diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 4).

Figura 4 - Valores médios±desvio padrão de MDA e Nitrito no grupo controle (n=20) nos pacientes do grupo 1 sem atividade da doença (n=6) e no grupo 2 com atividade da doença (n=24)



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

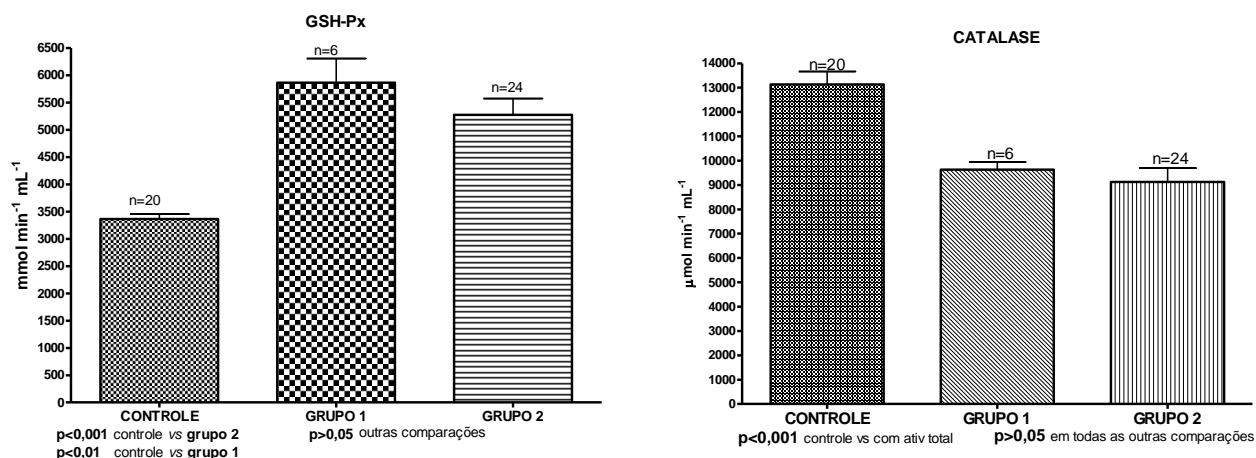
4.4.2 Enzimas antioxidantes

Como pode ser observada na figura 5 a atividade da GSH-Px foi significativamente mais elevada nos grupos de pacientes em comparação com o grupo controle.

Ao contrário, os níveis de CAT foram mais elevados no grupo controle que nos dos pacientes, com diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 2 (p < 0,001).

Quando foram comparados os níveis das duas enzimas, entre os grupos formados por pacientes, as diferenças não foram significantes (Figura 5).

Figura 5 – Níveis médios \pm desvio padrão da atividade enzimática da GSH-Px e da CAT no grupo controle (n=20), nos pacientes do grupo 1 sem atividade da doença (n=6) e grupo 2 com atividade da doença (n=24).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.4.3 Tióis não protéicos

Na figura 6 é demonstrado o comportamento dos tióis não protéicos e o resultado da relação GSH/GSSG nos grupos em estudo.

Resultados elevados de GSH Total foram encontrados nos pacientes do grupo 2, porém não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias das dosagens de glutathiona total (GSH+GSSG) nos diferentes grupos (Figura 6).

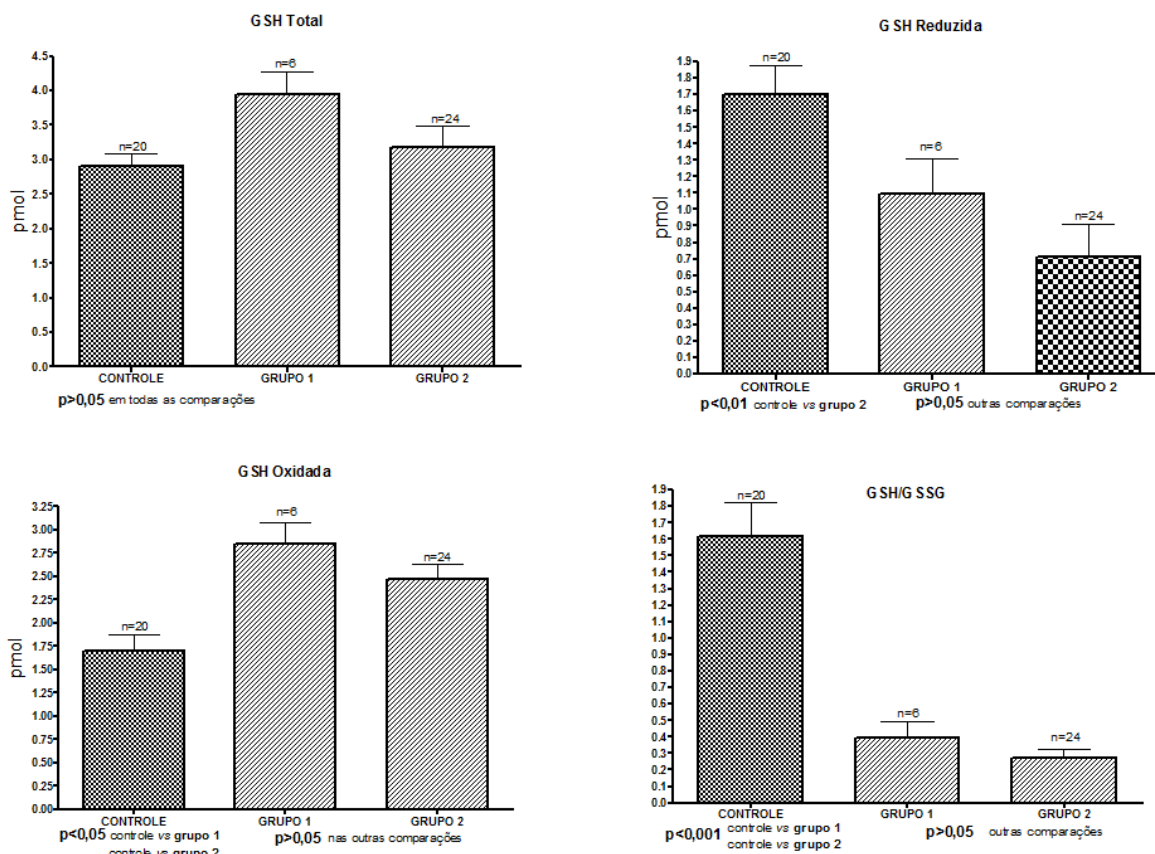
Níveis inferiores de GSH reduzida foram observados nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle, demonstrando significância estatística em relação ao grupo 2 (p < 0,01).

Os pacientes do grupo 1 apresentavam níveis mais elevados da enzima em relação ao grupo 2, embora com diferença não estatisticamente significativa (p > 0,05).

Quando compararam-se os níveis médios de GSSG, observaram-se níveis significativamente elevados nos grupos 1 e 2 em comparação com o grupo controle (p < 0,05), sendo mais elevado no grupo 1 que no grupo 2 porém sem significância (p > 0,05).

Analisando a relação da GSH/GSSG, observou-se que este índice foi inferior em todos os grupos de pacientes em relação ao grupo controle, sendo a diferença significativa (p < 0,001).

Figura 6 – Concentrações médias±desvio padrão da glutatona no grupo controle (n=20), nos pacientes do grupo 1 sem atividade da doença (n=6) e do grupo 2 com atividade da doença (n=24)



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

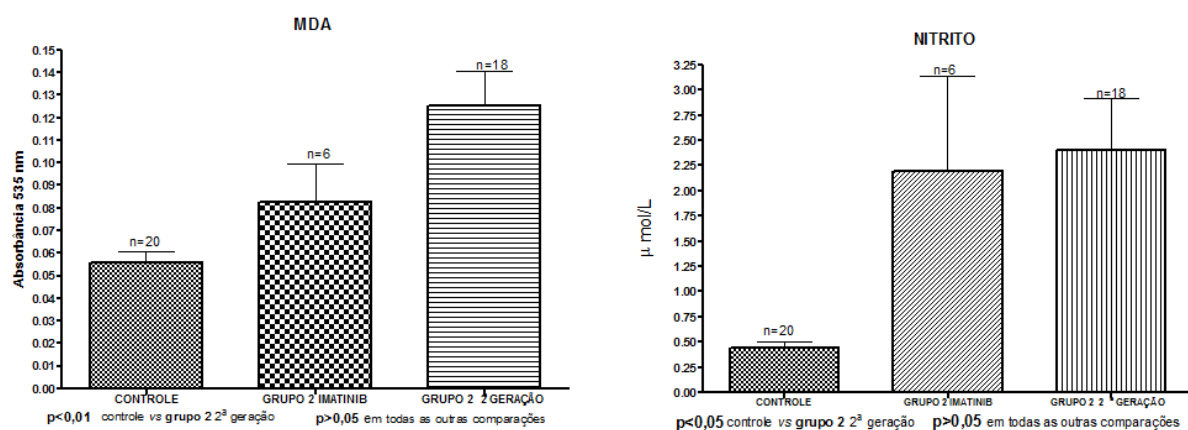
4.5 Perfil oxidativo dos pacientes com doença em atividade estratificados pela medicação em uso

Os pacientes definidos como estando com doença ativa, grupo 2, foram agrupados de acordo com a medicação em uso: de primeira geração (imatinibe) ou de segunda geração (dastinibe e nilotinibe).

4.5.1 Marcadores do estresse oxidativo.

Foi observado aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de MDA nos pacientes do grupo 2 em uso de inibidores de 2ª geração em relação ao grupo controle. O mesmo perfil foi obtido em relação aos níveis de nitrito, significância ($p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7 – Valores médios \pm desvio padrão de MDA e Nitrito no grupo controle ($n=20$) e no grupo de pacientes com doença em atividade, em uso de Imatinib ($n=6$) e de inibidores TK de 2ª geração ($n=18$).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

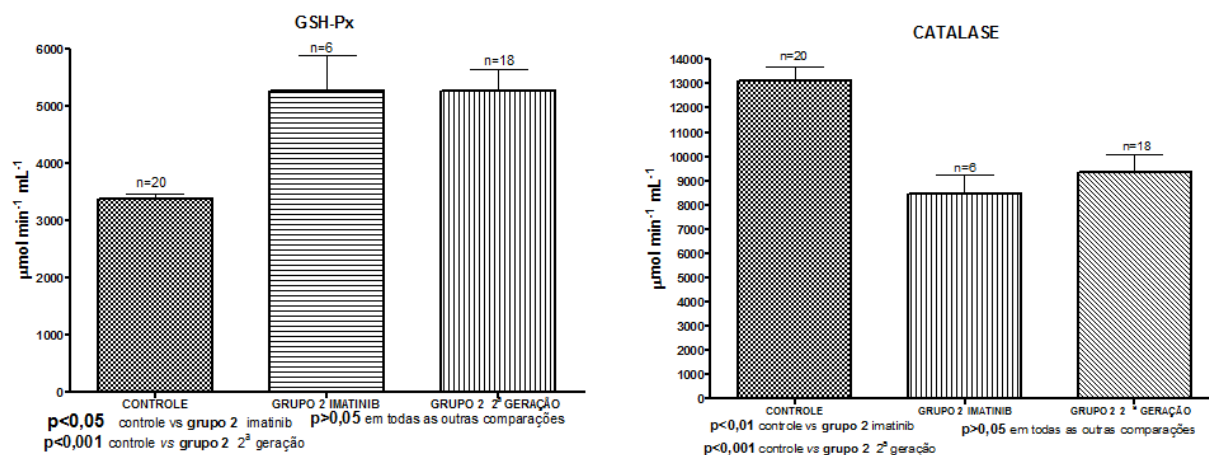
4.5.2 Enzimas antioxidante

As concentrações de GSH-Px demonstraram diferenças significantes ($p < 0,001$ e $p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos de pacientes com doença ativa em uso de medicações de 2ª geração ou de imatinibe, respectivamente (Figura 8).

O comportamento da CAT demonstrou que pacientes com doença ativa em uso de imatinibe apresentavam os níveis mais baixos de atividade enzimática com diferença estatisticamente significante na comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). Pacientes do grupo 2 em uso de medicação de 2ª geração também apresentaram diferença com significância estatística ($p < 0,01$) (Figura 8).

As concentrações enzimáticas não apresentaram diferenças significantes entre os grupos de pacientes (Figura 8).

Figura 8 –Valores médios±desvio padrão da atividade da GSH-Px e CAT no grupo controle (n=20) e no grupo de pacientes com doença em atividade, em uso de Imatinib (n=6) e de inibidores TK de 2ª geração (n=18).



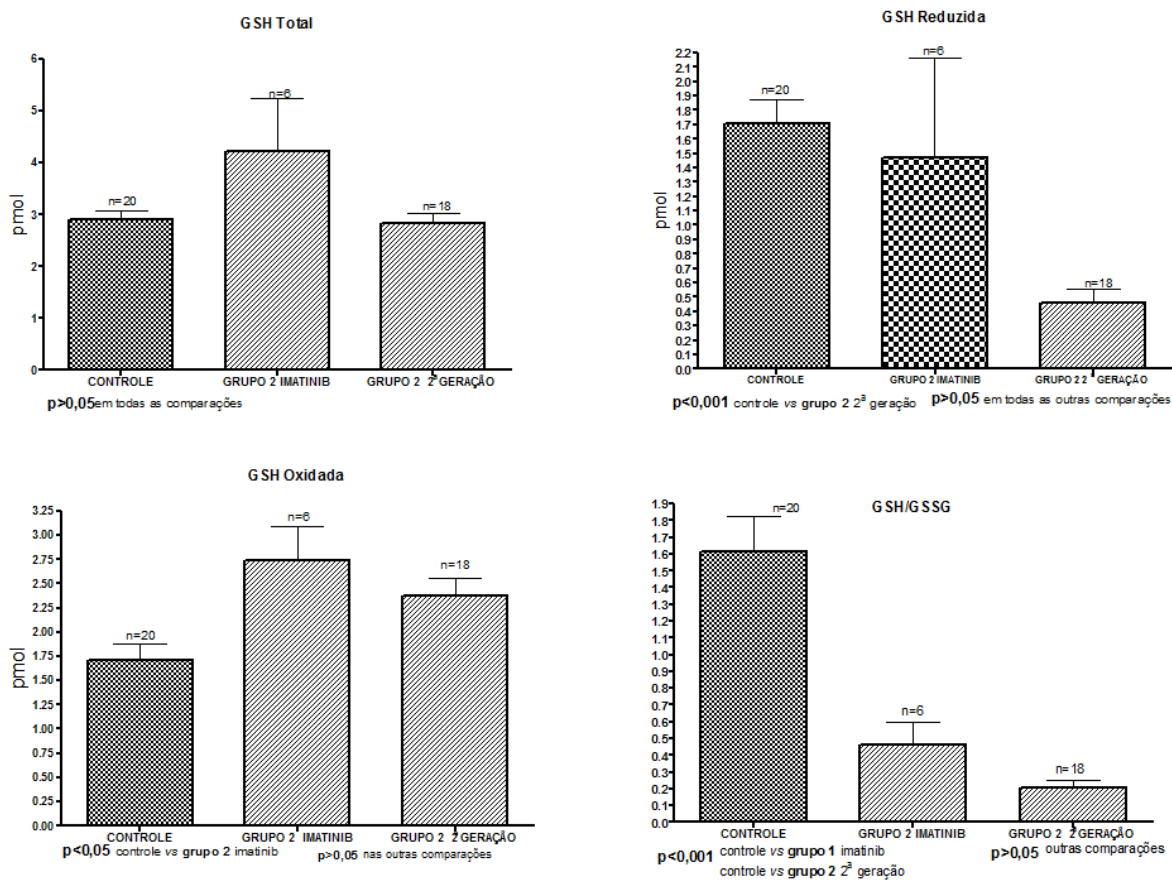
Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.5.3 Tióis não protéicos

A concentração de Glutathiona Total não apresentou diferença significativa na comparação entre todos os grupos (Figura 9). Na figura 9 observa-se que quando os pacientes foram estratificados pela atividade da doença e medicação em uso, os pacientes do grupo 2 em uso de inibidores de 2ª geração apresentavam concentrações mais baixas de GSH reduzida com diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo controle (p < 0,001).

Pacientes com doença ativa e em uso de inibidores de 2ª geração apresentaram concentrações de GSSG inferiores aos pacientes em uso de imatinibe porem com diferença não significativa (p > 0,05) (Figura 9). A relação GSH/GSSG apresentou significativa queda (p < 0,001) nos grupos de pacientes em relação ao grupo controle (Figura 9).

Figura 9 – Valores médios±desvio padrão da glutatona do grupo controle (n=20) e nos grupos de pacientes com doença em atividade, em uso de Imatinib (n=6) e de inibidores TK de 2ª geração (n=18).



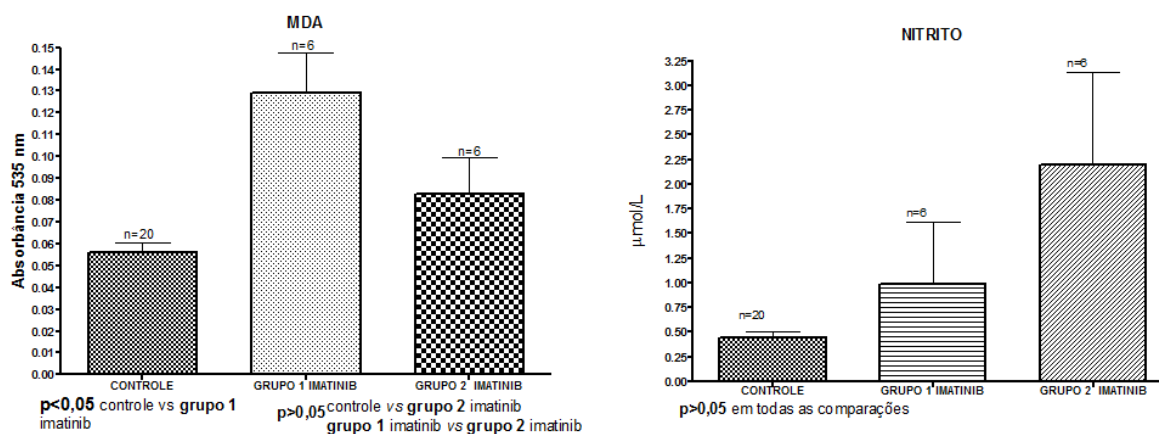
Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.6 Análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes em uso de imatinibe, estratificados pela atividade da doença

4.6.1 Marcadores do estresse oxidativo

Os níveis de MDA apresentaram-se elevados com diferença significativa quando comparou-se os paciente do grupo 1 em uso de imatinibe com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 10). Níveis mais altos de Nitrito foram observados nos paciente do grupo 2 em uso de imatinibe em comparação com o grupo de pacientes sem doença ativa e com o grupo controle, porem as diferenças não foram significantes (Figura 10).

Figura 10 –Valores médios±desvio padrão do MDA e Nitrito no grupo controle (n=20) e nos grupos de pacientes em uso de imatinib, grupo 1 sem doença em atividade (n=6) e grupo 2 com doença em atividade (n=6).

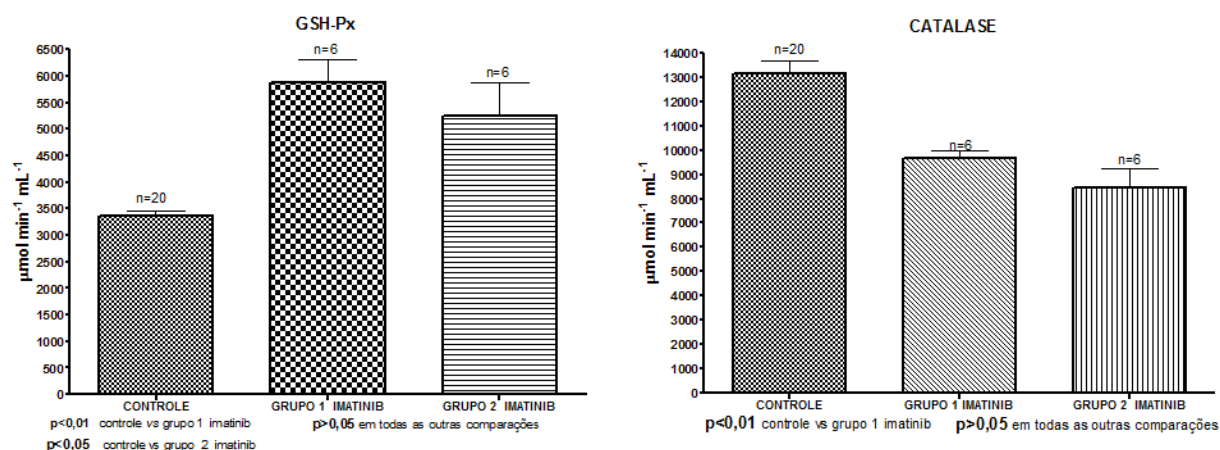


Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.6.2 Enzimas antioxidantes

A comparação dos pacientes do grupo 1, em uso de imatinibe e de pacientes do grupo de doença ativa em uso da mesma medicação demonstrou níveis mais elevados de GSH-Px no primeiro grupo, porem sem significância. Diferença significativa foi observada na comparação do controle com os grupos de pacientes (Figura 11).

Figura 11 – Valores médios±desvio padrão da atividade da GSH-Px e da CAT no grupo controle (n=20) e nos grupos de pacientes em uso de imatinib, grupo 1 sem doença em atividade (n=6) e grupo 2 com doença em atividade (n=6).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.6.3 Tióis não protéicos

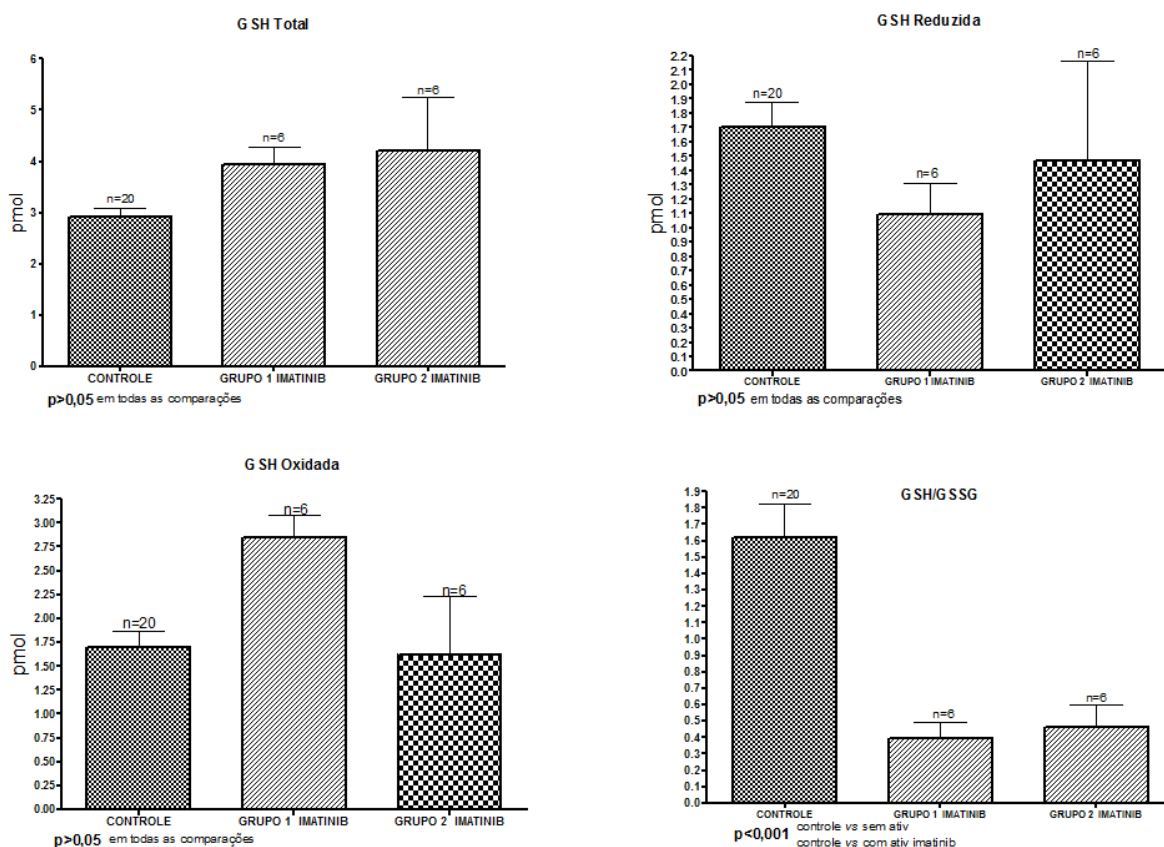
A estratificação dos pacientes em uso de imatinibe pelo nível de atividade da doença não demonstrou diferenças significantes nos níveis de Glutathiona total entre os grupos de pacientes, bem como na comparação com o grupo controle (figura 12).

Não se observaram diferenças significantes nos níveis de GSH reduzida quando compararam-se o grupo controle e os grupos de pacientes em uso de imatinibe (Figura 12).

Níveis mais elevados de GSSG, sem significância, foram observados nos pacientes em uso de imatinibe que estavam sem evidências de atividade da doença. Não houve diferenças significantes nas comparações entre os grupos.

A relação GSH/GSSG foi significativamente mais elevada no grupo controle em relação aos grupos de pacientes ($p < 0,001$). Na comparação dos dois grupos de pacientes em uso de imatinibe, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 12).

Figura 12– Valores médios \pm desvio padrão da glutaciona no grupo controle ($n=20$) e nos grupos de pacientes em uso de imatinib, grupo 1 sem doença em atividade ($n=6$) e grupo 2 com doença em atividade ($n=6$).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

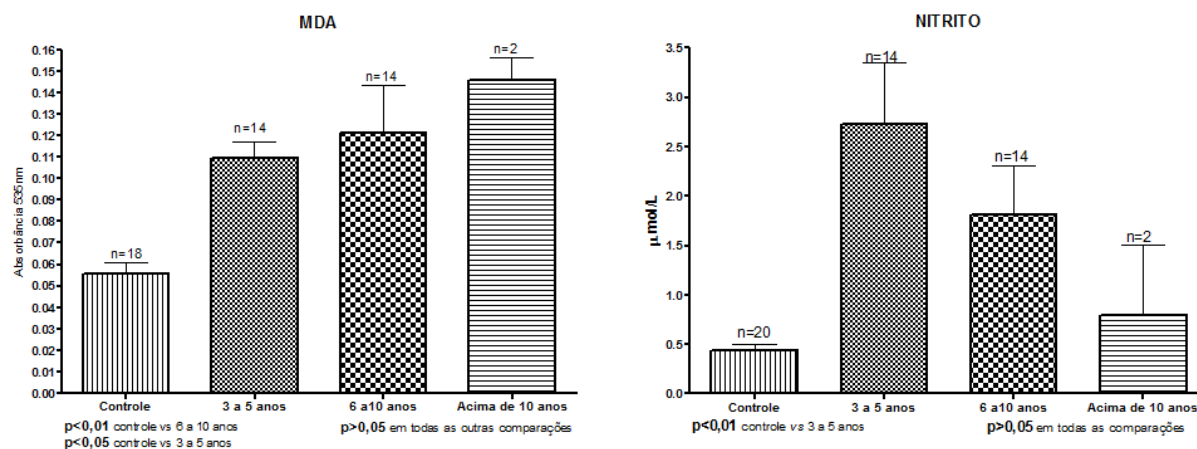
4.7 Análise dos parâmetros do perfil oxidativo nos pacientes estratificados pelo tempo de doença

4.7.1 Marcadores do estresse oxidativo

Os níveis dos marcadores de estresse oxidativo MDA e Nitrito não apresentaram diferenças significante na comparação dos pacientes estratificados pelo tempo de doença. Observou-se uma tendência dos pacientes com mais tempo de doença a apresentarem níveis mais elevados de MDA (Figura 13). Observou-se diferença significante $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente, quando se comparou o grupo controle com o grupo de pacientes com mais de 10 anos de doença e com o grupo com 6 a 10 anos de doença (Figura 13).

A estratificação dos pacientes por tempo de doença demonstrou níveis mais elevados de nitrito em pacientes com menos tempo de doença (Figura 13).

Figura 13 – Valores médios \pm desvio padrão do MDA e Nitrito no grupo controle ($n=20$) e nos grupos de pacientes com 3 a 5 anos de doença ($n=14$), 6 a 10 anos ($n=14$) e acima de 10 anos de doença ($n=2$).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.7.2 Enzimas antioxidantes

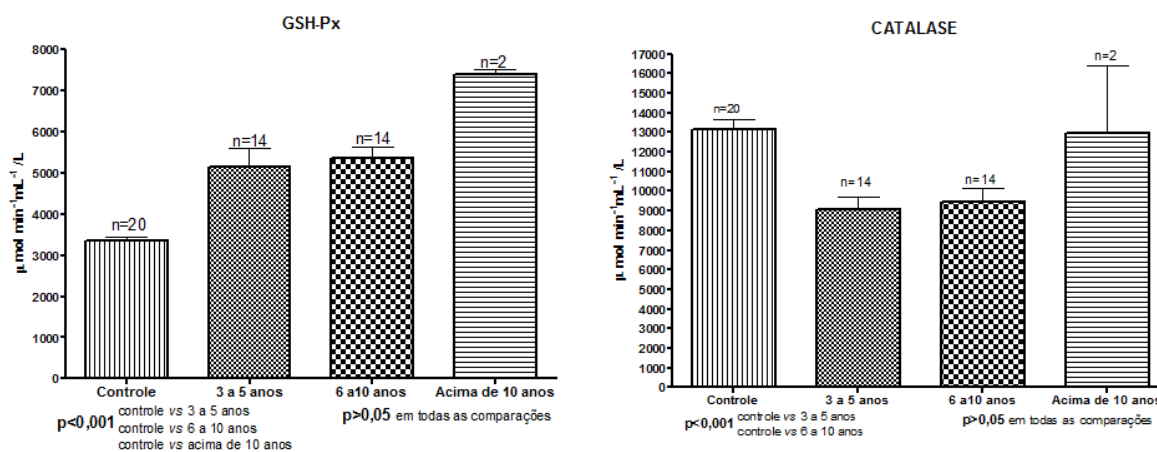
Os níveis das enzimas GSH-Px e CAT eram elevados nos grupos de pacientes em relação ao controle ($p < 0,001$).

As enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px não demonstraram diferenças significantes entre os vários grupos de pacientes estratificados pelo tempo de doença (Figura 14).

Grupos de pacientes com mais tempo de doença apresentavam níveis mais elevados, não significativos, de GSH-Px.

Observou-se aumento CAT no grupo de pacientes com mais de 10 anos de doença, em relação aos demais grupos de pacientes, porém tal diferença não foi significativa (figura 14).

Figura 14 – Valores médios \pm desvio padrão da atividade da GSH-Px e da CAT no grupo controle ($n=20$) e nos grupos de pacientes com 3 a 5 anos de doença ($n=14$), 6 a 10 anos ($n=14$) e acima de 10 anos de doença ($n=2$).



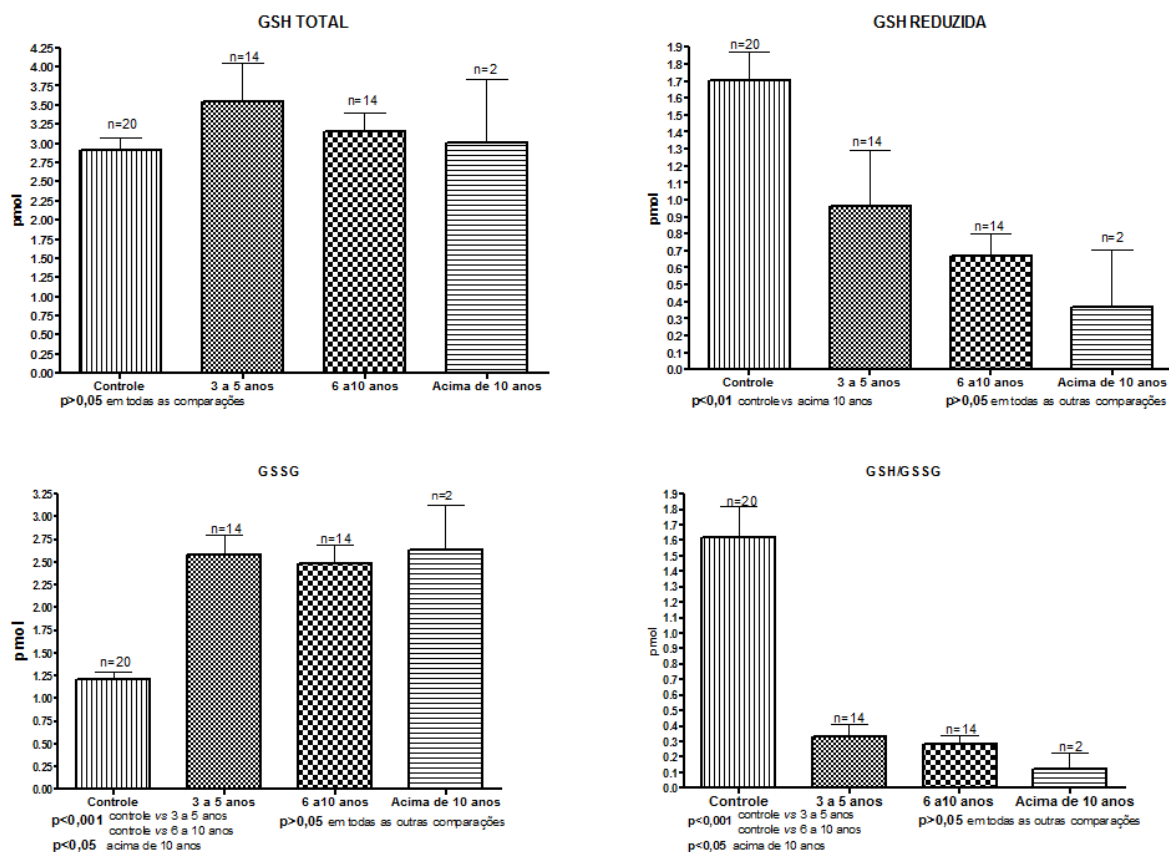
Fonte: Dados da pesquisa, 2011

4.7.3 tióis não-protéicos

Quando os níveis de GSH Total, GSH Reduzida e GSSG bem como a relação GSH/GSSG foi determinada nos pacientes estratificados pelo tempo de doença não foi observada diferença significativa, embora tenha sido observada uma tendência de aumento de GSH Reduzida inversamente proporcional ao tempo de doença, tal comportamento também foi observado quando se calculou a relação GSH/GSSG. (Figura 15).

Diferenças com significância estatística foram observadas nos níveis de GSH reduzida, de GSSG e da relação GSH/GSSG quando foram comparados os grupos formados por paciente com o grupo controle.

Figura 15 – Valores médios±desvio padrão da glutatona no controle (n=20) e nos grupos de pacientes com 3 a 5 anos de doença (n=14), 6 a 10 anos (n=14) e acima de 10 anos de doença (n=2).



Fonte: Dados da pesquisa, 2011

5 DISCUSSÃO

A LMC é uma neoplasia mieloproliferativa crônica caracterizada pela expansão das células mielóides associada à alteração genética característica, o oncogene *BCR-ABL* (FARDEL, KANTARJIAN, TALPAZ, 1999).

A LMC acomete todas as faixas etárias, estudo recente demonstra que a média de idade do diagnóstico não é a mesma em todas as regiões do mundo (PASQUINI et al, 2010). Na população estudada, os pacientes foram diagnosticados com a idade média de 44 anos, inferior à observada na América Latina (47anos) (PASQUINI et al, 2010).

Os resultados do presente estudo demonstraram uma maior predominância do gênero feminino 53,3% em desacordo com a literatura que aponta para um discreto aumento de prevalência no sexo masculino (JEMAL *et al.*, 2011). De acordo com os dados do IBGE, 2010. A população feminina no Ceará é em torno de 5% maior que a masculina o que poderia explicar este achado.

A avaliação clínica dos pacientes ao diagnóstico mostrou que a maioria se apresentava na fase crônica (83,3%). Resultado semelhante ao observado na literatura (HEHLMANN *et al.*, 1993; KANTARJIAN, TALPAZ 1993; FARDEL, *et al.*, 1999).

A população analisada se encontrava em tratamento, no momento do estudo, em uso de diferentes inibidores da TK, no entanto com histórico de tratamento prévio com outras drogas como hidreia, IFN α e inclusive bussulfan. O tempo médio de doença dos pacientes à época do estudo foi de 6 anos. Resultado superior ao observado, para a sobrevida global, em trabalhos anteriores ao advento dos inibidores de TK (KANTARJIAN, *et al.*, 1988). Este achado pode ser atribuído ao fato de que os pacientes deste estudo apresentavam, ao diagnóstico, parâmetros associados a prognóstico favorável: idade mais jovem (44 anos), diagnóstico na fase crônica (83,3%) e como risco baixo ou intermediário pelo escore de Sokal (63% dos pacientes) (SOKAL *et al*, 1984; QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2006).

Os pacientes do grupo 1 sem evidência de doença em atividade estavam com menos tempo de evolução da doença (4.2 anos) em comparação com os do grupo 2, com doença em atividade, que estavam com 6.6 anos de doença. Este achado pode refletir a observação de que

com a evolução da LMC há acúmulo de aberrações cromossômicas levando à progressão da doença (HOCHHAUS *et al*, 2002).

No presente estudo foram avaliados dois importantes marcadores de dano celular que são: as dosagens de malonaldeído (MDA), um bem caracterizado produto da peroxidação lipídica que também modula a expressão de genes relacionados à promoção tumoral (CERUTTI, 1985) e de nitrito (NO_2^-), tendo sido observado aumento significativo dos produtos da lesão oxidativa nos pacientes com LMC, com e sem evidência de atividade da doença, em relação ao grupo controle. Os resultados sugerem que os pacientes portadores de LMC apresentam elevadas e persistentes taxas de estresse.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ahmad e colaboradores, em 2010, em 128 pacientes adultos com LMC em relação ao grupo controle. O aumento dos produtos da peroxidação lipídica correlacionou-se com a fase da doença (crônica e acelerada). No presente estudo, não verificamos diferença significativa dos parâmetros de MDA e nitrito nos pacientes sem e com doença ativa. Este fato se deve provavelmente a fatores tais como ao pequeno tamanho da amostragem e ao não pareamento entre os grupos sem atividade e com atividade da doença.

A elevação nos níveis de marcadores do estresse oxidativo observado nestes pacientes estão de acordo com vários estudos descritos na literatura avaliando o estresse oxidativo em diferentes neoplasias hematológicas (OLTRA *et al*, 2001; BATTISTI *et al*, 2008; ZHOU *et al*, 2003). Porém resultado discordante foi observado em pacientes com diferentes tipos de leucemias (LLA, leucemia não linfoblástica aguda, e leucemia mielóide crônica), quando comparados com o controle normal (DEVI *et al*, 2000). Ciarcia e colaboradores (2010) comparando as células mononucleares de pacientes com LMC com controle normal encontrou níveis elevados de MDA nas células dos pacientes.

Os resultados da avaliação do estresse oxidativo são conflitantes, no entanto a relação entre estresse oxidativo e leucemia está bem documentada na literatura (BARTSCH; NAIR, 2004; AL-GAYYAR *et al.*, 2007). Células leucêmicas produzem maiores quantidades de EROs que as células não leucêmicas em condições normais (ABDEL-WAHAB, LEVINE, 2010).

Com relação aos parâmetros antioxidantes intracelulares, foi observado que a atividade média da enzima CAT apresentou-se diminuída nos pacientes com LMC, com diferença estatisticamente significativa, quando comparada ao controle. Porém não foi observado diferença

quando comparados os grupos de pacientes entre si. Battisti e colaboradores, (2008), observaram uma redução na atividade média da CAT plasmática em crianças portadoras de LLA em relação ao grupo controle, sendo a redução mais proeminente no grupo sem tratamento. Oltra e colaboradores, (2001) observaram reduzida atividade da CAT nos linfócitos isolados de pacientes com LLC em relação ao grupo controle. Sentürker e colaboradores, (1997) relataram níveis reduzidos das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GSH-Px nos linfócitos de crianças portadoras de LLA, sem tratamento. A redução da atividade média da CAT nos eritrócitos dos pacientes com LMC, independente da atividade da doença, sugere aumento do consumo da enzima em decorrência do elevado estresse oxidativo. Alternativamente, é possível que o sistema antioxidante esteja comprometido como consequência de uma anormalidade no metabolismo antioxidante devido ao processo neoplásico. No entanto deve-se ressaltar que a avaliação das enzimas antioxidantes foi realizada em eritrócitos, sendo a avaliação ideal no clone neoplásico. Estresse oxidativo induz desequilíbrio redox que tem sido encontrado em vários tipos de câncer (DEVI *et al*, 1999; OLTRA *et al*, 2001; BATTISTI *et al*, 2003; ZHOU *et al*, 2003; AHMAD *et al*, 2008; AHMAD *et al* 2010;) em diferentes fases da doença e etapas do tratamento.

A atividade média da GSH-Px se apresentou significativamente aumentada nos pacientes com LMC tanto com doença ativa quanto não ativa, em relação ao controle. A enzima GSH-Px tem um importante papel na detoxificação do peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e peróxidos lipídicos, sendo importante para a proteção das membranas lipídicas contra a oxidação. A GSH-Px reduz peróxidos usando a GSH reduzida como um doador de elétron gerando a forma dimérica oxidada, GSSG (COHEN, HOCHSTEIN, 1963; MEISTER, ANDERSON; 1983; RODRIGUES, REDDY, SATTLER, 2008). O aumento da atividade média da GSH-Px sugere que no processo leucêmico ocorra um mecanismo adaptativo contra o aumento de H₂O₂ e outros peróxidos, não sendo, entretanto suficiente para prevenir o estresse oxidativo (BLUME , PANIKER, BLEUTLER, 1973).

Alterações no perfil antioxidante são frequentes no câncer, porem resultados conflitantes podem ocorrer assim como em relação aos marcadores do estresse oxidativo. Estudos na literatura reportam resultados discordantes principalmente em relação à enzima GSH-Px (ZUO *et al*, 2006; SENTÜRKER *et al*, 1997) e os níveis de GSH reduzida (GODWIN *et al*, 1992; MULCAHY, BAILEY, GIPP, 1994; OLTRA *et al*, 2001). O estudo de enzimas com função antioxidante indireta como: glutathione S-reductase (GSSG-reductase) e glutathione S transferase

(GSSG-tranferase) talvez elucidem vias que possam esclarecer achados até então discrepantes (BLUME et al., 1973; SIES, 1997).

A elevação nos níveis de EROs que induzem morte das células leucêmicas faz parte de novas abordagens em estudo para o tratamento da LMC (HUANG, *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008). Recentemente, tem sido demonstrado que a inibição da GSH-Px através do composto *β*-phenylethyl isothiocyanate (βPEITC) é efetiva em destruir as células transformadas pela BCR-ABL, provavelmente através do elevado estado oxidativo resultante da depleção de GSH-Px. Se o aumento da GSH-Px é de fato relevante para a resistência das células leucêmicas, a sua inibição pode elevar o estresse oxidativo resultando na morte das células leucêmicas (ZHANG *et al.*, 2008).

As concentrações de glutatona no sangue refletem o perfil da mesma em outros tecidos menos acessíveis. Sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG o que caracteriza o estresse oxidativo. A GSH é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A medida de ambas, glutatona reduzida (GSH) e glutatona dissulfídica (GSSG) no sangue tem sido considerada como um indicador da concentração do GSH no organismo, sendo, portanto um indicador do estresse oxidativo. (LANG *et al.*, 2000; DALLE-DONNE et al, 2006). Tem sido proposto que a queda na concentração sanguínea de GSH reduzida possa ser utilizada como marcador de risco para doença crônica incluindo as doenças neoplásicas (LANG *et al.*, 2000).

Com respeito ao nível de tiol, os achados do presente estudo revelaram uma tendência dos grupos de pacientes estratificados pela atividade da doença a apresentar níveis mais elevados de GSH total, em comparação com o grupo controle. A GSH total representa o somatório da GSH reduzida+GSSG, portanto aumento em qualquer uma das formas resulta num aumento da t GSH total.

Os níveis de GSH reduzida se apresentaram significativamente diminuídos nos pacientes com LMC com e sem atividade da doença em relação ao grupo controle, demonstrando um grau maior de redução com a atividade da doença. Resultados semelhantes foram obtidos por Ahmad e colaboradores (2010) em pacientes com LMC e por Battisti e colaboradores (2008) na avaliação dos níveis de tiol de pacientes com LLA. Os resultados sugerem que a redução nos níveis da GSH reduzida possam ser atribuídos ao aumento dos hidroperóxidos e à maior atividade da GSH-

Px que decompõe os peróxidos oxidando a GSH reduzida, logo refletindo a depleção das reservas de antioxidantes não-enzimáticos nos pacientes em estudo.

Estudos também sugerem que o aumento de GSH reduzida possa estar associado ao desenvolvimento, pelas células neoplásicas, de mecanismos de resistência ao estresse oxidativo, como demonstrado por Godwin e colaboradores (1991), através do achado do aumento da GSH reduzida em linhagem de células de tumor de ovário associado à resistência à quimioterapia. Sagara e colaboradores (1998) também relacionaram o aumento da GSH reduzida, em cultura de células do hipocampo, à maior resistência ao estresse oxidativo.

Os níveis de GSSG aumentados podem ser também resultantes da maior atividade da GSH-Px, cuja ação antioxidante ocorre com a oxidação da GSH reduzida, como mencionado anteriormente. Porém resultados discordantes foram obtidos por Oltra e colaboradores (2001) que não obtiveram elevação dos níveis da GSSG diante do aumento da atividade da GSH-Px, nos linfócitos de paciente com LLC.

Glutationa oxidada, GSSG, é acumulada dentro da célula e a razão da GSH/GSSG é uma boa medida do estresse oxidativo de um organismo (ISIDÓRIO *et al.*, 2008). Esta razão se encontra elevada em células normais, pois existe mecanismos para reduzir GSSG novamente a GSH, realizado pela glutatona redutase a qual catalisa a reação. No presente estudo observou-se uma queda, com diferença significativa da GSH/GSSG nos pacientes com LMC, independente da atividade da doença em relação ao grupo controle sendo mais acentuado no grupo com doença em atividade.

Ao se analisar o perfil oxidativo nos pacientes com LMC, com doença em atividade, em uso dos inibidores de TK (1ª e de 2ª geração), verificou-se que os níveis médios de MDA e de nitrito foram significativamente elevados nos pacientes em uso dos inibidores de 2ª geração em comparação com o grupo controle. Os resultados sugerem que a lesão oxidativa está associada com a refratariedade da doença ao tratamento com os inibidores de TK.

Na avaliação da atividade da CAT e da GSH-Px, observou-se diminuição na atividade da CAT e aumento de GSH-Px em relação ao grupo controle porém não houve diferença entre os pacientes em uso de inibidores de 1ª e 2ª geração. Já em relação aos tióis foram verificadas concentrações inferiores da GSH reduzida e da GSH/GSSG no grupo de LMC em uso de inibidor de TK de 2ª geração em relação ao controle. Resultado que sugere um comprometimento maior no estado antioxidante nos pacientes com doença refratária em uso de imatinibe. Ahmad e

colaboradores (2010) observaram significativa elevação nos níveis de MDA nos pacientes em uso de hidréia na comparação com os pacientes em tratamento com imatinibe bem como queda nos níveis de GSH reduzida nos pacientes em uso de hidréia.

Os inibidores TK são capazes de bloquear a formação de EROs (SATTLER, 2000). No entanto, os resultados demonstram que o uso dos inibidores de TK não repercutiu de forma efetiva no combate ao estresse oxidativo.

A análise do MDA nos pacientes com LMC, em uso de imatinibe, demonstrou um aumento significativo, nos pacientes sem atividade da doença em relação ao controle. Já os níveis médios de nitrito não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Vários fatores podem justificar este achado dentre eles a pequena amostragem.

Na avaliação da atividade da GSH-Px e da CAT observou-se aumento de GSH-Px e diminuição na atividade da CAT em relação ao grupo controle porem não houve diferença entre os pacientes, em uso de imatinibe, com e sem atividade. Foram verificadas concentrações inferiores da GSH reduzida e da GSH/GSSG no grupo de LMC em uso de imatinibe com e sem atividade, em relação ao controle. Pode-se verificar que a estratificação dos pacientes com LMC em uso de imatinibe em relação à atividade da doença não foi sensível para avaliar o dano oxidativo e a defesa antioxidante.

Os grupos de pacientes estratificados pelo tempo de doença não demonstraram diferenças significativas no perfil oxidativo quando foram comparados entre si. Porém observou-se uma tendência dos pacientes com mais tempo de doença a apresentarem níveis mais elevados de MDA e elevação progressiva nos níveis de GSH-Px e queda nos níveis de GSH reduzida e da GSH/GSSG. O tempo de doença parece contribuir para definir o quadro do perfil oxidativo de pacientes com LMC estratificados pela atividade da doença.

Oltra e colaboradores, 2001, conseguiram demonstrar uma relação direta entre elevação significativa nos níveis de MDA e de GSH-Px, nos linfócitos de paciente com LLC, e o tempo de doença. .

Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que os pacientes com LMC apresentam um estado hiperoxidativo com níveis elevados dos produtos do estresse oxidativo, diminuição da atividade da CAT, da GSH reduzida e da relação GSH/GSSH e aumento da atividade da GSH-Px e sugerem que os marcadores possam ser utilizados como indicadores da atividade da doença.

6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que há um significativo aumento do estresse oxidativo nos pacientes com LMC independente da atividade da doença.

Os achados sugerem que existem alterações no sistema enzimático antioxidantes nos pacientes como LMC caracterizado pelo aumento de GSH-Px

Portanto, os marcadores do perfil oxidativo MDA, CAT , GSH-Px, GSH e a relação GSH/GSSG podem ser utilizados para auxiliar na monitorização dos pacientes.

Em suma os resultados sugerem que nos pacientes com LMC os níveis plasmáticos dos marcadores de dano celular e o perfil do estado antioxidante enzimático e não enzimático eritrocitário podem refletir a magnitude do estresse oxidativo na doença, logo podendo serem utilizados como marcadores do estresse oxidativo e da resposta a inibidores de TK.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** v. 105, p 121-126, 1984.
- ABDEL-WAHAB, O.;LEVINE, R.L. Metabolism and the leukemic stem cell. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 4, p. 677-680, 2010.
- AHMAD, R.; ANIL.K, T.; PAYAL, T; RANJANA, S.; SUSHMA, S.; RAJ, K. S. Oxidative stress and antioxidant status in patients with chronic myeloid leukemia. **Indian Journal of Clinical biochemistry**, v. 23, n.4, p. 328-333, 2008.
- AHMAD, R.; TRIPATHI, A.K.; TRIPATHI, P.; SINGH, R.; SINGH, S.; SINGH R.K. Studies on lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant status as indices of oxidative stress in patients with chronic myeloid leukaemia. **Singapore Med J.** v. 51, n.2, p.110-115, 2010.
- AL-GAYYAR, M.M.H.; EISSA, L.A. ; RABIE, A.M.; EL-GAYAR, A.M. Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients. **J Pharm Pharmacol.**, v.59, n.3, p. 409-417, 2007.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; KIM, C.N.; LIU, L.; CHARLES, L.P.;GREEN, D.R.; BHALLA,K. *BCR-ABL* Exerts Its Antiapoptotic Effect Against Diverse Apoptotic Stimuli Through Blockage of Mitochondrial Release of Cytochrome C and Activation of Caspase-3. **Blood**, v. 91, n. 5, p.1700-1705, 1998.
- BACCARANI, M.; CORTES, J.; PANE, F.; NIEDERWIESER, D.; SAGLIO, G.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GUILHOT, F.; HOCHHAUS, A.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; RADICH, J.; SIMONSSON, B.; SILVER, R. T; GOLDMAN, J.; HEHLMANN, R. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European Leukemia Net **J Clin Oncol.**,v.27, n.35, 2009.
- BALENDIRAN, G. K.; DABUR, R.; FRASER, D. The role of glutathione in cancer. **Cell Biochem Funct.**, v. 22, n. 343–352, 2004.
- BARNES, D.J.; MELO, J.V. Primitive, Quiescent and Difficult to Kill The Role of Non-Proliferating Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. **Cell Cycle**, v. 5, n. 24, p. 2862-2866, 2006.
- BARTSCH, H.; NAIR, J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. **Cancer Detect Prev.** v.28,n.6, p. 385-391, 2004.
- BATTISTI, V.; MADERS, L.D.K.; BAGATININI, M.D.; SANTOS, K.F.; SPANEVELLO, R.M.; B, MALDONADO, P.A.; BRULÉ, A.O.; ARAÚJO, M.C.; C, SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clin Biochem**, v.41, n.7-8, p.511-518, 2008.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N.. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, v. 78, p. 547–581, 1998.

- BEDI, A.; ZEHNBauer, B.A.; BARBER, J.P.; SHARKIS, S.J.; JONES, R.J. Inhibition of apoptosis by *BCR-ABL* in chronic myeloid leukemia. **Blood**. v. 83, p.2038-2044,1994.
- BEN-NERIAH, Y.; DALEY, G.Q.; MES-MASSON, A-M.; WITTE, M.N.; BALTIMORE, D. The Chronic Myelogenous Leukemia-specific P210 Protein Is the Product of the *ber/abl* Hybrid Gene. **Sciences**, v. 233, p. 212-214, 1986.
- BERAN, M.; CAO, X.; ESTROV, Z.; et al. Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). **Clin Cancer Res.**, v.4, p.1661-1672, 1998.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E.R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **J Biol Chem.**, v.272, p.20313–20316, 1997.
- BLUME, K.G.; PANIKER, N.V.; BEUTLER, E. Enzymes of glutathione synthesis in patients with myeloproliferative disorders. **Clin Chim Acta**, v. 45, n.3, p. 281-285, 1973.
- BOCCHIA, M, GENTILI, S; ABRUZZESE, E; FANELLI, A; IULIANO, F; TABILIO, A; AMABILE, M; FORCONI, F; GOZZETTI, A; RASPADORI, D; AMADORI, S; LAURIA, F. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. **Lancet.**, v. 365, p.657-662, 2005.
- BRANFORD, S; RUDZKI, Z; PARKINSON I, GRIGG, A; TAYLOR, K; SEYMOUR, J.F; DURRANT, S; BROWETT, P; SCHWARER, A.P; ARTHUR, C; CATALANO, J; LEAHY, M.F; FILSHIE, R; BRADSTOCK, K; HERRMANN, R; JOSKE, D; LYNCH, K; HUGHES, T. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have *BCR-ABL* kinase domain mutations. **Blood.**, v.104, p.2926-2932, 2004.
- BUCHDUNGER, E; ZIMMERMANN, J; METT, H; MEYER, T; MÜLLER, M; DRUKER, B.J; LYDON, N.B. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. **Cancer Research.**, v.56, p.100-104,1996.
- BURKE JR, T.R; FORD, H; OSHEROV, N; LEVITZKI, A; STEFANOVA, I; HORAK, I. D; MARQUEZ, V. E. Arylamides of hydroxylated isoquinolines as protein-tyrosine kinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.**, v. 2, p. 1771-1774, 1992.
- BURKE, B.A.; CARROLL, M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogeneous leukemia. **Leukemia**. v.24, n.6, p.1105-1112, 2010.
- CALVERT, P.; YAO, K. S.; HAMILTON, T. C.; O'DWYER, P. J. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. **Chem. Biol. Interact.**, v. 111–112, p.:213–224, 1998.
- CATHCART, K.; PINILLA-IBARZ, J.; KORONTSVIT, T.; SCHWARTZ, J.; ZAKHALEVA, V.; PAPADOPOULOS, E.B.; SCHEINBERG, D.A. A multivalent *BCR-ABL* fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. **Blood.**, v. 103, p.1037-1042, 2004.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, p.862–863, 1994.

- CERUTTI, P.A. Pro-oxidant status and tumor promotion. **Science**. v. 227, p.375-381, 1985.
- CIARCIA, R.; D'ANGELO, D.; PACILIO, C.; PAGNINI, D.; GALDIERO, M.; FIORITO, F.; DAMIANO, S.; MATTIOLI, E.; LUCCHETTI, C.; FLORIO, S.; GIORDANO, A. Dysregulated Calcium Homeostasis and Oxidative Stress in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Cells. **J Cell Physiol.**, v. 224, p. 443–453, 2010.
- COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, v. 2, p.1420, 1963.
- CORTES, J.E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: a review. **Am J Med.**, v.100, p.555-570, 1996.
- CORTES, J.E.; KANTARJIAN, H. New Targeted Approaches in Chronic Myeloid Leukemia. **J Clin Oncol**, v.23, n.26, p. 6316-6324, 2005.
- DAI, Z.; QUACKENBUSH, R.C.; COURTNEY, K.D.; GROVE, M.; CORTEZ, D.; REUTHER, G.W.; PENDERGAST, A.M. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. **Genes Dev.**, v. 12, p.1415-1424, 1998.
- DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.A.; BALTIMORE, D. Blast crisis in a murine model of chronic myelogenous leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.11335–11338, 1991
- DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v. 247, p.824-830, 1990.
- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n.4, p. 601–623, 2006.
- DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. **Blood**, v. 6, p. 372–375, 1951.
- DE KLEIN, A.; VAN KESSEL, G.; GROSVELD, G.; BARTRAM, C.R.; HAGEMEIJER, A.; BOTSMA, D.; SPURR, N.K.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; STEPHENSON, J.R. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 300, p. 765-767, 1982.
- DEININGER, M. W.N.; GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v.96, n.13, p. 3343-3356, 2000.
- DEININGER, M.W.N.; BOSE S, GORA-TYBOR J, YAN XH, GOLDMAN JM, MELO JV. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. **Cancer Res.**, v.58, p.421-425,1998.
- DEININGER, M.W.N.; Milestones and Monitoring in Patients with CML Treated with Imatinib. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**.p.419-426, 2008.

- DONATO, N.J.; WU, J.Y.; ZHANG, L.; KANTARJIAN, H.; TALPAZ, M. Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor betachain in *BCR-ABL* human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after *BCR-ABL* inhibition. **Blood.**, v.97, p.2846-2853, 2001.
- DRAPER, H.H, HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v.186, p. 421-431,1990.
- DREHER, D.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Cancer**, v. 32A, p.: 30–38, 1996.
- DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev.**, v.82, p.47–95, 2002.
- DRUKER BJ; GUILHOT, F; O'BRIEN, S.G; GATHMANN, I.; KANTARJIAN, H.; GATTERMANN, N.; DEININGER, M.W.N.; SILVER, R.T.; GOLDMAN, J.M.; STONE, R.M., CERVANTES, F.; HOCHHAUS, A., POWELL, B.L.; GABRILOVE, J.L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; CORNELISSEN, J.J.; HUGHES, T.; AGIS ,H.; FISCHER, T.; VERHOEF, G.; SHEPHERD, J.; SAGLIO, G.; GRATWOHL, A.; NIELSEN, J.L.; RADICHBENGT SIMONSSON, J.P.; TAYLOR, K.; BACCARANI, M.; SO, C.; LETVAK, L.; LARSON, R.A. *for the IRIS Investigators*. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med.**, v. 355, p. 2408–2417, 2006.
- DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J.; PENG, B., BUCHDUNGER, E., FORD, J.M.; LYDON, N.B., KANTARJIAN, H., RENAUD CAPDEVILLE, R., SAYURI OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C., L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the *BCR-ABL* tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med.**, v.344, p.1031-1037, 2001.
- DRUKER, B.J; TAMURA, S; BUCHDUNGER, E; OHNO, S; SEGAL, G.M; FANNING, S; ZIMMERMANN, J; LYDON, B.L. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. **Nat Med.**, v.2, p. 561–566, 1996.
- ESTRELA, J. M.; ORTEGA, A.; OBRADOR, E. Glutathione in cancer biology and therapy. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v.43, p.143–181, 2006.
- FANG, J.A; SEKI, T.; MAEDA, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 61, p. 290–302, 2009.
- FARDEL, S.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. **Oncology**, v.13, p.169-180,1999.
- FARDEL, S.; TALPAZ, M.; STROV, Z.; O'BREIN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H. M. The biology of Chronic Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, p.164-172, 1999.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S.; radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.
- GEARY, C.G. The story of chronic myeloid leukemia. **British Journal of Haematology**, v. 110, p.2-11, 2000.

- GNONI, A.; MARECH, I.; SILVESTRIS, N.; VACCA, A.; LORUSSO, V. Dasatinib: an anti-tumour agent via Src inhibition. **Current Drug Targets**, v.12, n.4, p.563-578, 2011.
- GODWIN, A.K.; MEISTER, A.; O'DWYER, P.J.; HUANG, C.S.; HAMILTON, T.C.; ANDERSON, M.E. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3070-3074, 1992.
- GORDON, M.Y.; DAZZI, F.; MARLEY, S.B. Cell biology of CML cells. **Leukemia**; 13 (sup 1): S65-S71. 1999
- GORDON, M.Y.; DOWDING, C.R.; RILEY, G.P.; GOLDMAN, J.M.; GREAVES, M.F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. **Nature**. v.328, p.342-344,1987.
- GRATWOHL, A.; HERMANS, J.; NIEDERWIESER, D. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. Chonic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v.12, p.509-516, 1993.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. **Clin. Chem**. v.41, n.12, p.1819-1828, 1995.
- GUYTON, K.Z.; KENSLER, T.W.; Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **Br Med Bull**, v. 49, n.3, p.523-544,1993.
- HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. M. C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, 2^a Edição. Clarendon Press, Oxford, UK. **Apud** SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.
- HASFORD, J.; PFIRRMANN, M.; HEHLMANN, R.; *et al*, Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. **J Natl Cancer Inst.**, v. 90, p.850-858, 1998.
- HEHLMANN, R.; HEIMPEL, H.; HASFORD, J.; KOLB, H.J.; PRALLE, H.; HOSSFELD, D.K.; QUEISSER, W.; LOFFLER, H.; GERMAN, B., HEINZE, B.; GEORGII, A.: Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: Prolongation of survival by hydroxyurea. **Blood**, v. 82, p.398, 1993.
- HEISTERKAMP, N.; STEPHENSON, J.R.; GROFFEN, J.; HANSEN, P.F.; DE KLEIN, A.; BARTRAM, C.R.; GROSVELD, G. Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 306, p. 239-242, 1983.
- HOCHHAUS, A.; KREIL, S.; CORBIN, A.S.; LA, R.P.; MULLER, M.C.; LAHAYE, T.; HANFSTEIN, B.; SCHOCH, C.; CROSS, N.C.; BERGER, U.; GSCHAIDMEIER, H.; DRUKER, B.J.; HEHLMANN, R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. **Leukemia**, v.16, p.2190-2196, 2002.
- HUANG, P, FENG, L.; OLDHAM, E.A.; KEATING M.J.; PLUNKETT, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. **Nature**, v.407, p. 390-395, 2000.

IBGE, Censo demográfico 2010. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br>. Acesso em: maio de 2011.

ILARIA, R.L. JR, VAN ETTEN, R.A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. **J Biol Chem.**, v.271, p.31704-3110, 1996.

ISIDÓRIO, M.,S.; SILVEIRA, L.R. Modulação do balanço redox em crianças atletas: possíveis efeitos do exercício e da suplementação antioxidante. **Rev Bras Nutr Clin.**, v.23, n.2, p.127-134, 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin.**,v.61, n.2, p. 69-90, 2011.

JIANG, X.; LOPEZ, A.; HOLYOAKE, T.; EAVES, A.; EAVES, C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 96, p.12804-12809, 1999.

KALIDAS, M.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Chronic Myelogenous Leukemia. **JAMA**, v. 286, p. 895-898, 2001.

KANTARJIAN, H.; GILES, F.; BHALLA, K.; PINILLA, J.; LARSON, R.A.; GATTERMANN, N.; OTTMANN, O.G ; GALLAGHER, N.J.; BACCARANI, M. Nilotinib in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase (CML-CP) with imatinib (IM) resistance or intolerance: Longer follow-up results of a phase II study. *Blood*, v. 117, n.4, p.1141-5, 2011.

KANTARJIAN, H.; GILES, F.; WUNDERLE, L.; BHALLA, K.; O'BRIEN, S.; WASSMANN, B.; TANAKA, C.; MANLEY, P.; RAE, P.; MIETLOWSKI, W.; BOCHINSKI, K.; HOCHHAUS, A.; GRIFFIN, J.D.; HOELZER, D.; ALBITAR, M.; DUGAN, M.; CORTES, J.; ALLAND, L.; OTTMANN, O.G. Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive A. **N Engl J Med.**, v.354, p.2542-2551, 2006.

KANTARJIAN, H.M.; DIXON, D.; KEATING, M.J.; TALPAZ, M.; WALTERS, R.S.; MCCREDIE, K.B.; CHB, FREIREICH, E.J. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous Leukemia. **Cancer.**, v.61, p.1441-1446, 1988.

KANTARJIAN, H.M.; MELO, J.V; TURA, S; GIRALT, S; TALPAZ, M. Chronic Myelogenous Leukemia: Disease Biology and Current and Future Therapeutic Strategie. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 90-109, 2000.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M. Therapy of chronic myelogenous leucemia. **Stem Cells.**,v.11, n. 3, p.8-9, 1993.

KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, M.; GUTTERMAN, J. Biologic therapy of chronic myelogenous leukemia. **Oncology (Williston Park).**, v. 1, n.7, p.35-40, 48-9, 52, 1987.

KAROUI, H.; HOGG, H. N.; FREJAVILLE, C.; TORDO, P.; KALYANARAMAN, B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols

and sulfite by peroxynitrite—ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 6000–6009, 1996.

KIRKMAN, H.N.; GALIANO, S.; GAETANI, G.F. The function of catalase-Bound NADPH. **J Biol Chem**, v.262, p.660–665, 1987.

KLAUNIG, J.E.; YONG XU, Y.;ISENBERG, J.S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA,K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D.E.; WALBORG, E.F. JR. The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis. **Environ Health Perspect**, v.1, p. 106, 1998.

KOPTYRA, M.; FALINSKI, R.; NOWICKI, M.O.; STOKLOSA, T.; MAJSTEREK, I.; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M.; BLASIAK, J.; SKORSKI, T. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. **Blood**, v.108, n.1, p. 319-327, 2006.

KURZROCK, R.; GUTTERMAN, J.U.; TALPAZ, M. The Molecular Genetics of Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. **N Engl J Med** , p. 319 – 990, 1988.

LANG, C.A.; MILLS, B.J.; MASTROPAOLO, W.; LIU, M.C. Blood glutathione decreases in chronic diseases. **J Lab Clin Med.** v 135, n 5, p. 402-405, 2000.

LOMBARDO, L.J.; LEE, F.Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; J.C.; BEHNIA, K.; CASTANEDA, S.; CORNELIUS, L.A.M.; DAS, J.; DOWEYKO, A.M.; FAIRCHILD, C.; HUNT, J.T.; NIGO, I.; JOHNSTON, K.; KAMATH, A.; KAN, D.; KLEI, H.; MARATHE, P.; PANG, S.; PETERSON, R.; PITT, S.; SCHIEVEN, G.L.; SCHMIDT, R.J.; TOKARSKI, J.; WEN, M.; WITYAK, J.; BORZILLERI, R.M. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-mino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **J Med Chem**, v.47, p.6658-6661, 2004.

LUGO, T.G.; PENDERGAST, A.M.; MULLER A.J.; WITTE , O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *BCR-ABL* oncogene products. **Science.**, v.247, n.4946, p. 1079-1082, 1990.

MALONEY, W.; LANGE, R. Leukemia in atomic bomb survivors: II. Observations pn early phases leukemia: **Blood**, v. 9, p. 663-685, 1954.

MARKLUND, S. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.79, p.7634-7638, 1982.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n.6, p.927–930, 1994.

MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Cellular Response to Oxidative Stress: Signaling for Suicide and Survival. **J Cell Physiol.**, v. 192, p.1–15, 2002.

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

- McLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, N.W. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 84, p. 6558-6562, 1987.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v.52, p.711-760, 1983.
- MELO, J.V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Lett.**, v.249, p.121-132, 2007.
- MELO, J.V.; HUGHES, T.P.; APPERLEY, J.F. Chronic Myeloid Leukemia. **Am Soc Hematol Educ Program**, p. 90-109, 2000.
- MELO, J.V. The diversity of *BCR-ABL* fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. **Blood.**, v. 88, n.7, p.2375-2384, 1996.
- MITELMAN, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma.**, v.11, n.1, p.11-15, 1993.
- MULCAHY, R.T.; BAILEY, H.H.; GIPP, J.J. Up-regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase activity in melphalan-resistant human multiple myeloma cells expressing increased glutathione levels. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v.34, n.1, p.67-71. 1994.
- NOWELL, P.C.; HUNGERFORD, D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science.** v.132, p.1497, 1960.
- O'HARE, T.; WALTERS, D.K.; STOFFREGEN EP, *et al.* In vitro activity of *BCR-ABL* inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib resistant Abl kinase domain mutants. **Cancer Res.** v.65, p.4500-4505, 2005.
- OLTRA, A.M.; CARBONELL, F.; TORMOS, C.; IRADI, A.; GUILLERMO T. SAEZ, G.T. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dg in chronic lymphocytic leukemia. **Free Radic Biol Med**, v.30, n.11, p. 1286-1292, 2001.
- PASQUINI, R.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H.M.; JOSKE, D.; MEILLON, L.A.; MONGAY, L.; REYNOLDS, J.; HUGHES, T.; KIM, D.K. Worldwide Observational Registry Collecting Longitudinal Data on Management of Chronic Myeloid Leukemia Patients (The WORLD CML Registry) – **2nd Annual Interim Analysis. Oral and Poster Abstracts Poster Session: Chronic Myeloid Leukemia - Therapy: Poster II Sunday, December 5, 2010, 6:00 PM-8:00 PM Hall A3/A4 (Orange County Convention Center) Poster Board II-172**
- PASTERNAK, G.; HOCHLAUS, A.; SCHUTHEIS, B. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v.124, p.643-660, 1998.
- PEAR, W.S.; MILLER, J.P.; XU, L.; PUI, J.C.; SOFFER, B.; QUACKENBUSH, R.C.; PENDERGAST, A.M.; BRONSON, R.; ASTER, J.C.; SCOTT, M.L.; BALTIMORE, D. Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. **Blood.**, v. 92, p.3780-3792, 1998.
- PENSERGA, E.T.; SKORSKI, T. Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability. **Oncogene.** v.26, n.1, p.11-20, 2007.

PINILLA-IBARZ, J.; CATHCART, K.; KORONTSVIT, T.; *et al.* Vaccination of patients with chronic myelogenous Leukemia with *BCR-ABL* oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. **Blood.**, v. ;95, p.1781-1787, 2000.

QUINTAS-CARDAMA A, KANTARJIAN H, TALPAZ M, *et al.* Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. **Blood.**, v.105, p.2281-2286, 2005.

QUINTÁS-CARDAMA, A. Q.; CORTES, J.E. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. Symposium on Oncology Practice: Hematological Malignancies. **Mayo Clin Proc.**, v.81, n.7, p.973-988, 2006.

REDAELLI, A.; BELL, C.; CASAGRANDE, J.; STEPHENS, J.; BOTTEMAN, M.; LASKIN, B.; PASHOS, C. Clinical and epidemiologic burden of chronic mielogenous leukemia. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.4, n.1, p. 85-96, 2004.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; BHARAT B. AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, p.1603–1616, 2010.

RODRIGUES MS, REDDY MM, SATTLER M. Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**. Oct, v.10, n.10, p.1813-48, 2008.

ROWLEY, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature.**, v.243, p.290-293, 1973.

SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, J.; SCHUBERT, D.; MAHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 24, n.9, p.1375-1389, 1998.

SATTLER, M.; VERMA, S.; SHRIKHANDE, G.; BYRNE, C.H.; PRIDE, Y.B.; WINKLER, T.; GREENFIELD, E.A.; SALGIA, R.; GRIFFIN JD. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. **J Biol Chem.**, v.275, n.32, p. 24273-24278, 2000.

SAWYERS, C.L. Chronic myeloid leukemia. **New Eng Journal of Medicine**, v. 340, p.1330-1338, 1999.

SENTÜRKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MÜSLÜMANOĞLU, H.; GEDIKOĞLU, G.; DIZDAROĞLU ,M. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. **FEBS Lett.**, v.416, n.3, 286-290, 1997.

SIES, H. (). Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SLUPIANEK A, NOWICKI MO, KOPTYRA M, SKORSKI T. BCR/ABL modifies the kinetics and fidelity of DNA double-strand breaks repair in hematopoietic cells. **DNA Repair.**; v.5, p. 243-250, 2006.

SOKAL, J.E.; COX, E.B.; BACCARANI, M.; TURA, S.; GOMEZ, G.A.; ROBERTSON, J.E.; TSO, C.Y.; BRAUN, T.J.; CLARKSON, B.D.; CERVANTES, F.; ROZMAN, C.; GRUPO DE ESTUDO COOPERATIVO ITALIANO DE LMC. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. **Blood.**, v.63, p.789-799, 1984.

SPIERS, A.S.; BAIN, B.J.; TURNER, J.E. The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia-positive cases. **Scand J Haematol**, v.18, n.1, p.25-38, 1977.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC**: Lyon 2008.

TAKEDA, N.; SHIBUYA, M.; MARU, Y. The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. **Proc Natl Aca. Sci USA.**, v. 96, p. 203-207, 1999.

TALPAZ, M.; SHAH, N.P.; KANTARJIAN, H.; DONATO, N.; NICOLL, J.; PAQUETTE, R.; CORTES, J.; O'BRIEN, S.; NICAISE, C.; BLEICKARDT, E.; BLACKWOOD-CHIRCHIR, M.A.; IYER, V.; CHEN, T.T.; HUANG, F.; DECILLIS, A.P.; SAWYERS, C.L. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. **N Engl J Med.**, v.354, n.24, p.2531-2541, 2006.

TANAKA, K.; TAKECHI, M.; HONG, J.; SHIGETA, C.; OGUMA, N.; KAMADA, N.; TAKIMOTO, Y.; KURAMOTO, A.; DOHY, H.; KYO, T. 9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. **J Radiat Res.**, v.30, p.352-358, 1989.

TEFFERI, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. **Leukemia.**, v. 22, p.3-13, 2008.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Lett.**, v. 358, n.1, p.1-3, 1995.

VELLANOWETH, R.L.; SUPRAKAR, P.C.; ROY, A.K. Biology of disease transcription factors in development, growth, and aging. **Lab Invest**, v.70, p.784-799, 1994.

VERFAILLIE, C.M.; HURLEY, R.; LUNDELL, B.I.; ZHAO, C.; BHATIA, R. Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? **Acta Haematol.**, v. 97, p.40-52, 1997.

WILSON-RAWLS, J.; XIE, S.; LIU, J.; LANEUVILLE, P.; ARLINGHAUS, R.B. P210 BCR-ABL interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. **Cancer Res.**, v.56, p. 3426-3430, 1996.

YOSHIDA, C.; YOSHIDA, F.; SEARS, D.E.; HART, S.M.; IKEBE, D.; MUTO, A.; BASU, S.; IGARASHI, K.; MELO, J.V. *BCR-ABL* signaling through the PI-3/S6 kinase pathway inhibits nuclear translocation of the transcription factor Bach2, which represses the antiapoptotic factor heme oxygenase-1 **Blood**, v.109, n.3, p. 1211-1219, 2007.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **J Clin Pathol**, v.54, p.176-186, 2001.

ZHANG, H.; TRACHOOTHAM, D.; LU, W.; CARE, J.; GILES, W.F.J.; KEATING, M.J.; ARLINGHAUS, R.B.; HUANG, P. Effective killing of Gleevec-resistant CML cells with T315I mutation by a natural compound PEITC through redox-mediated mechanism. **Leukemia**, v. 22, n. 6, p. 1191–1199, 2008.

ZUO, X.L.; CHEN, J.M.; ZHOU, X X. Z. LI, X.Z.; MEI G.Y. Levels of Selenium, Zinc, Copper, and Antioxidant Enzyme Activity in Patients with Leukemia. **Biological Trace Element Research**, v. 114, 2006.

APÊNDICE 1- FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome _____ Prontuário _____

Data do Nascimento - _____ Procedência _____

Nº do Prontuário - _____ Data 1ª Consulta _____

Sexo- M() F() Cor _____ Ocupação _____

DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Escore de Sokal – Baixo() _____ Intermediário() _____ Alto() _____

Fase da doença ao diagnóstico – Crônica() _____ Acelerada() _____ C. Blástica() _____

Tamanho do Baço (cm) – ao diagnóstico _____ à época do estudo _____

1º Hemograma

Leuc _____ Blastos _____ Pm _____ Mc _____ Mm _____ Bt _____ Seg _____ Bas _____ Plaq _____

HEMOGRAMA À ÉPOCA DO ESTUDO

Leuc _____ Blastos _____ Pm _____ Mc _____ Mm _____ Bt _____ Seg _____ Bas _____ Plaq _____

MIELOGRAMA

Blastos _____ Bas _____ **Conclusão:** LMC() Crônica() _Acelerada() _C. Blástica()

CITOGENÉTICA**Cromossomo Ph e Anormalidades Cromossômicas Adicionais**

Data						
Resultado						
ACA						

BCR-ABL

Data						
Resultado						

Pesquisa de Mutação – Não() _____ Sim().

Resultado _____

MEDICAÇÃO

	Iniciou	Suspendeu	Justificativa
Bussulfan			
Hidrea			
Interferon α			
Transplante			
Imatinibe			
Nilotinibe			
Dastinib			
OBS. -			

PERFIL OXIDATIVO

	Resultado
Nitrito	
MDA	
GSH-Px	
CAT	
GSH Total	
GSH Reduzida	
GSSG	
GSH/GSSG	

**ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E
ENFERMAGEM (FFOE)**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO
EM PESQUISA**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada “ESTUDO DE BIOMARCADORES DE MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídeo”, que tem como objetivo principal Avaliar o estado oxidativo e a defesa antioxidante em pacientes com LMC acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC-UFC), nas várias fases da doença e submetidos a diferentes terapêuticas.

Convido o(a) Sr(a) a participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que reside na rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza, CE. Fone: (0xx85)-33668264. Para tanto, necessitamos que o(a) Senhor(a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa. A coleta de sangue será realizada no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFC, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo.

A participação do senhor (a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento. 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.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado (a) e a outra com o pesquisador (a).

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de quem obteve o termo