

Flávio Augusto Naoum

**Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo
em pacientes submetidos a transplante
de células precursoras hematopoiéticas**

São José do Rio Preto

2006

Flávio Augusto Naoum

Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em
pacientes submetidos a transplante de células
precursoras hematopoiéticas

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Doutor no Curso de
Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

São José do Rio Preto

2006

Naoum, Flávio Augusto

Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em pacientes submetidos a transplante de células precursoras hematopoiéticas / Flávio Augusto Naoum.

São José do Rio Preto, 2006.
84 p.; 30 cm

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

1. Transplante de Medula Óssea; 2. Sobrecarga de Ferro; 3. Estresse Oxidativo.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS E QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Radicais livres e o estresse oxidativo	02
1.1.1. Geração e tipos de radicais livres	02
1.1.2. Participação do ferro na geração de radicais livres	06
1.1.3. A defesa anti-oxidante	08
1.1.4. Lesões celulares causadas por radicais livres	09
1.1.5. O estresse oxidativo e sua relação com as doenças	12
1.2. Sobrecarga de ferro	15
1.2.1. Causas e conseqüências do excesso de ferro no organismo	15
1.2.2. Determinação laboratorial da sobrecarga de ferro	21
1.3. Quimioterapia em altas doses com transplante de células precursoras hematopoiéticas (TCPH)	23
1.3.1. Conceitos e aplicações do TCPH	23
1.3.2. Complicações precoces e tardias relacionadas ao TCPH	27

1.3.3. Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo no TCPH	29
1.4. Objetivos	31
2. CASUÍSTICA E MÉTODO	32
2.1. Seleção dos pacientes e características clínicas ao TCPH	33
2.2. Protocolos de tratamento e medidas de suporte	35
2.3. Análise laboratorial do sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo	36
2.3.1. Análise laboratorial da sobrecarga de ferro	36
2.3.2. Análise laboratorial do estresse oxidativo	37
2.3.3. Tempos de coleta para a análise laboratorial	38
2.4. Parâmetros de enxertia e documentação das complicações clínicas	39
2.5. Análise estatística	40
3. RESULTADOS	41
4. DISCUSSÃO	52
5. CONCLUSÕES	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. APÊNDICES	82

Aos meus pais Paulo e Ália, pela orientação, compreensão e amor dispensados de forma irrestrita em todos as fases da minha vida.

Às minhas irmãs Lizely e Cláudia, pelo companherismo e apoio constantes que fortalecem os laços de sangue que nos unem.

À Paulinha, responsável pelo colorido vibrante e pelos tons apaixonantes do meu cotidiano.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Milton Artur Ruiz** por propiciar a evolução e a consolidação dos meus conhecimentos sobre o transplante de células precursoras hematopoiéticas e pela confiança em minha intuição acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Paulo Cesar Naoum** e a todos os funcionários da **Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto** pelo constante e irrestrito apoio à pesquisa, além da contribuição técnica, financeira e logística que viabilizou a realização do presente trabalho.

Aos **médicos, enfermeiras, auxiliares de enfermagem, secretárias** da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Base de São José do Rio Preto e especificamente ao **Dr. Mário Lago**, pela gentileza quanto ao agendamento dos pacientes e auxílio técnico nas coletas e armazenamento das amostras durante todo o período do presente estudo.

Aos profissionais do **Laboratório Central** do Hospital de Base de São José do Rio Preto pela competência na realização dos exames específicos necessários ao presente estudo.

Ao Departamento de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e ao coordenador do programa de Medicina Interna, Prof. Dr.

Reynaldo Azoubel, pela prestatividade habitual e pelo estímulo à atividade acadêmica.

Aos amigos da **XXVII Turma** da Faculdade de Medicina de Marília pelo prazer da amizade e apoio renovados constantemente.

Aos amigos, colegas e profissionais ligados ao **Serviço de Hematologia e Oncologia da Santa Casa de São Paulo** e à **Disciplina de Hematologia da Universidade de São Paulo**, uma justa homenagem ao profissionalismo praticado e transmitido que inspiraram naturalmente minha dedicação à vida acadêmica.

Aos pacientes participantes da pesquisa, que mesmo atravessando o principal obstáculo de suas vidas, demonstraram grande sensibilidade e altruísmo na decisão de participar do estudo.

"Triste não é mudar de idéia. Triste é não ter idéias para mudar".

Francis Bacon

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução do registro de pacientes submetidos a TCPH de acordo com os dados do CIBMTR de 1970 até junho de 2005..... 25
- Figura 2.** Pontos da análise laboratorial da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo (setas) durante o período de acompanhamento dos pacientes..... 38
- Figura 3.** Parâmetros de estresse oxidativo obtidos dos pacientes (●) nos quatro tempos de coleta (pré-TCPH, D0, D+14 e 6 meses) e do grupo controle (□) – os pontos indicam a média e o erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo controle..... 44
- Figura 4.** Mortalidade relacionada ao transplante em 21 pacientes em função dos valores de saturação da transferrina no dia 0. (IST = índice de saturação da transferrina)..... 51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1.	Situações patológicas associadas à produção de espécies reativas do oxigênio (ERO).....	13
Quadro 2.	Principais causas de sobrecarga de ferro.....	17
Quadro 3.	Doenças passíveis de tratamento com TCPH.....	24
Quadro 4.	Características clínicas dos 21 pacientes selecionados.....	34
Tabela 1.	Evolução dos parâmetros de sobrecarga de ferro nos diferentes tempos de avaliação dos pacientes submetidos ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	42
Tabela 2.	Evolução dos parâmetros plasmáticos e eritrocitários de estresse oxidativo nos diferentes tempos de avaliação dos pacientes submetidos ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	43
Tabela 3.	Correlações entre o histórico transfusional (transfusões prévias ao TCPH e total de transfusões) e dados de enxertia com os parâmetros de sobrecarga de ferro.....	46
Tabela 4.	Correlações entre o histórico transfusional (transfusões prévias ao TCPH e total de transfusões) e dados de enxertia com os parâmetros de estresse oxidativo	47
Tabela 5.	Parâmetros que apresentaram diferença em função do tipo de TCPH – os valores referem-se à média a ao erro padrão.....	48
Tabela 6.	Parâmetros que apresentaram diferença em função da	

	realização de quimioterapia (QT) anterior à internação para TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	49
Tabela 7.	Parâmetros que apresentaram diferença em função do <i>status</i> da doença ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	49
Tabela 8.	Parâmetros que apresentaram diferença em função do desenvolvimento de toxicidade grau III e/ou IV no grupo de pacientes transplantados com a doença em remissão completa – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	50
Tabela 9.	Parâmetros que apresentaram diferença em função da presença de doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH) aguda grau III/IV – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	50
Tabela 10.	Parâmetros que apresentaram diferença em função da ocorrência de óbito relacionado ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CPH	células precursoras hematopoiéticas
ERO	espécies reativas do oxigênio
DECH	doença enxerto-contra-hospedeiro
G-CSF	fator de crescimento de colônias de granulócitos
HLA	antígeno leucocitário humano
IST	índice de saturação da transferrina
SOD	superóxido dismutase
TCPH	transplante de células precursoras hematopoiéticas
TRAP	'ensaio-armadilha' de radicais livres
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
O ₂ ^{•-}	íon superóxido
OH [•]	radical hidroxil

RESUMO

Introdução: A quimioterapia de altas doses com transplante de células precursoras hematopoiéticas (TCPH) é uma modalidade terapêutica utilizada para um número cada vez maior de doenças. Entretanto o sucesso e a aplicabilidade desse tratamento são limitados pela toxicidade e mortalidade inerentes à quimioterapia de altas doses. Especula-se que a sobrecarga de ferro e o estresse oxidativo com geração de radicais livres possam estar relacionados às complicações observadas no TCPH.

Objetivo: Analisar a presença e a evolução da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo nas fases precoce e tardia do TCPH, e correlacioná-los aos dados clínicos pré e pós-transplante.

Casuística e método: Parâmetros laboratoriais de sobrecarga de ferro (ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina) e estresse oxidativo (ácido úrico, albumina, superóxido dismutase (SOD) e metaemoglobina) foram analisados em 21 pacientes submetidos a TCPH alogênicos e autogênicos. As determinações laboratoriais foram realizadas antes do TCPH, no D0, no D+14 e após 6 meses de transplante, e correlacionadas com as características clínicas dos pacientes, enxertia e complicações observadas após o TCPH.

Resultados: Após a quimioterapia de altas doses houve elevação acentuada de todos os parâmetros de sobrecarga de ferro e redução dos valores dos valores de ácido úrico e albumina, indicando presença de estresse oxidativo. Com exceção da ferritina, os parâmetros que se alteraram após o condicionamento retornaram aos valores basais após 6 meses de TCPH. O número de transfusões prévias de concentrados de hemácias se correlacionou principalmente com os valores de ferritina. A realização de quimioterapia prévia ao TCPH foi associada à valores

basais elevados do perfil de ferro e redução da concentração de ácido úrico no D+14. A supressão da atividade hematopoiética, analisada por meio dos parâmetros de enxertia, esteve associada à sobrecarga de ferro (elevação do ferro sérico e da saturação da transferrina) e à exacerbação do estresse oxidativo (redução dos valores de ácido úrico e de SOD). Dentre os pacientes transplantados em remissão completa, o perfil de ferro basal fora mais elevado naqueles que desenvolveram toxicidade graus III-IV. A mortalidade precoce relacionada ao transplante foi maior nos pacientes que apresentaram valores elevados de saturação da transferrina no D0.

Conclusão: A sobrecarga de ferro e o estresse oxidativo são eventos que ocorrem de forma aguda após a quimioterapia de altas doses para TCPH e estão, aparentemente, relacionados à recuperação hematológica mais demorada e ao aumento da morbi-mortalidade no pós-transplante. Sugere-se que os parâmetros estudados sejam adotados como marcadores de enxertia e de toxicidade pós-TCPH.

ABSTRACT

Introduction: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell transplantation (HCT) is a modality of treatment that has been used for an increasing number of diseases. However, the outcome and applicability of HCT are limited by the toxicity and mortality associated with this procedure. It is presumed that iron overload and oxidative stress with free radicals production may be associated with the complications observed after HCT.

Objective: Evaluate the onset and evolution of iron overload and oxidative stress at early and late phases of HCT, and correlate this events with clinical characteristics pre and post-transplant.

Patients and methods: Laboratorial markers of iron overload (serum iron, transferrin saturation and ferritin) and oxidative stress (uric acid, albumin, superoxide dismutase (SOD) and metaemoglobin) were analyzed in 21 patients undergoing allogeneic or autologous HCT. The parameters were determined before HCT, on day 0, day +14 and at 6 months post-transplant, and the results were correlated with clinical antecedents, engraftment and complications observed after HCT.

Results: After high-dose chemotherapy there was a marked increase in all iron overload parameters and a reduction of uric acid and albumin levels, indicating the presence of oxidative stress. Except for ferritin levels, all the parameters that were altered after conditioning regained baseline levels at 6 months post-HCT. Previous red blood cell transfusions correlated mainly with ferritin levels. Cytotoxic treatment before HCT was associated with increased basal levels of all iron parameters and reduced acid uric concentration on day +14. Suppression of hematopoiesis, assessed by engraftment markers, was associated with iron overload (increased

levels of serum iron and transferrin saturation) and oxidative stress exacerbation (reduced uric acid and SOD concentrations). Within the group transplanted in remission, patients who developed grades III-IV toxicity had higher baseline levels of iron parameters. Transplant-related mortality was increased in patients with high levels of transferrin saturation on day 0.

Conclusion: Iron overload and oxidative stress are acute complications observed after high-dose chemotherapy for HCT that are probably related to delayed hematological recovery and increased morbi-mortality post-transplant. It is suggested that these parameters may be used as markers of engraftment and toxicity after HCT.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Radicais livres e o estresse oxidativo

1.1.1. Geração e tipos de radicais livres

A abundância de oxigênio em nossa atmosfera viabilizou o surgimento e a evolução de organismos dotados de elevada capacidade metabólica que utilizam esse elemento como principal fonte para respiração celular ⁽¹⁾. Entretanto, a presença do oxigênio intracelular também possibilitou a ocorrência de reações de redução inadvertidas que resultam na produção de radicais livres com potencial de causar lesões ao DNA, processos mutagênicos e destruição celular precoce ⁽²⁾. Assim, a exposição das células aos radicais derivados da ativação do oxigênio é uma consequência inevitável do processo aeróbico.

Denomina-se de radical livre qualquer íon, átomo ou molécula, com capacidade de existência independente e que apresenta um ou mais elétrons não-pareados. Dessa forma, os radicais livres são elementos altamente instáveis e quimicamente muito reativos que tendem a procurar o seu equilíbrio tomando um elétron de uma molécula estabilizada, desestabilizando-a e causando reações em cadeia. Tais reações em cadeia podem ser interrompidas pela ação de enzimas anti-oxidantes ou pelo re-equilíbrio de elétrons resultante da combinação de dois radicais livres, formando uma molécula estabilizada. Essas características fazem com que a meia-vida de um radical livre seja muito curta, da ordem de 10^{-4} segundos. A presença de um ou mais elétrons não pareados dos radicais livres é tradicionalmente representada por meio um ponto sobrescrito (*) ⁽³⁾.

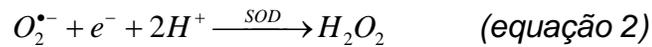
Entre as principais classes de radicais livres destacam-se aquelas que possuem o oxigênio (oxi-radicais) em sua estrutura, como o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Outros exemplos de radicais livres são o radical glutationa (GS^{\bullet}) com estrutura centrada no enxofre, o triclorometil (CCl_3^{\bullet}) que contém o carbono em sua estrutura e o óxido nítrico (ON^{\bullet}). Utiliza-se a expressão “espécies reativas do oxigênio” (ERO) como um termo coletivo que abrange tanto oxí-radicais como o $O_2^{\bullet-}$ e o OH^{\bullet} , quanto elementos potencialmente danosos que não são radicais livres, mas derivam do oxigênio, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (O_2^1) e o ozônio (O_3)^(2,3).

Em condições fisiológicas normais, 95 a 98% do processo de conversão de oxigênio em água nas mitocôndrias ocorre por meio da transferência de quatro elétrons de moléculas do citocromo c para a molécula de oxigênio promovendo uma redução tetravalente desse elemento, catalisada pela enzima citocromo oxidase. Os 2 a 5% restantes são convertidos por meio de redução univalente, resultando na formação das ERO, como demonstra a seqüência a seguir⁽⁴⁾:

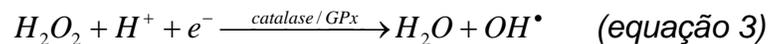
- 1) Adição de um elétron a uma molécula de oxigênio formando o íon superóxido.



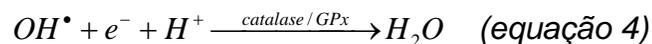
2) Formação do peróxido de hidrogênio pelo processo da dismutação, resultante da adição de um elétron e dois íons hidrogênio ao superóxido. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) ⁽⁵⁾.



3) O peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, resultando na formação do radical hidroxil. As enzimas catalase e glutatíon peroxidase (GPx) catalisam essa reação.



4) Uma nova adição de elétron e íon hidrogênio ao radical hidroxil promove a formação de água. Essa reação também é catalisada pelas enzimas catalase e GPx.



O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio são produzidos de forma contínua *in vivo* por quase todas as células aeróbias e notadamente por fagócitos, nos quais auxiliam a destruição de microrganismos fagocitados. Sugere-se que algumas células, particularmente as endoteliais, podem utilizar xantina oxidase, NADH oxidase e NADPH oxidases como fontes de produção de radicais

superóxido e peróxido de hidrogênio para subsequente liberação para o meio extracelular. A reatividade e a capacidade oxidante decorrente da ação direta desses dois elementos são relativamente discretas; na verdade, a importância deles no processo oxidativo se dá pela sua participação na geração do radical hidroxil. O radical hidroxil é a mais reativa das ERO, caracterizando-se por apresentar meia-vida muito curta (10^{-9} segundos) e ação oxidante extremamente potente, podendo alterar ou danificar qualquer estrutura celular próxima ao local onde foi formado, incluindo proteínas e enzimas de membrana, além do DNA ^(6,7).

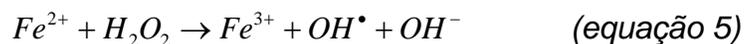
A geração das ERO *in vivo* é contra-balanceada pela ação dos mecanismos de defesa anti-oxidantes e sistemas de reparo, que previnem o acúmulo de moléculas oxidantes no organismo.

Os radicais livres podem ser gerados na membrana, no citoplasma e no núcleo das células de vários tecidos, e as suas ações dependem do local onde são produzidos. Os principais fatores responsáveis pela produção de radicais livres são a respiração celular, os processos inflamatórios, exposição a raios gama e ultra-violeta, dieta, tabagismo e medicações, entre outras ^(4,7).

1.1.2. Participação do ferro na geração de radicais livres

A respiração celular dos organismos aeróbios depende de um mecanismo altamente eficiente para transportar o oxigênio provindo do ambiente para os tecidos. Os metais de transição, especialmente o ferro, apresentam propriedades químicas que viabilizam esse processo. Assim, o ferro presente na hemoglobina, na mioglobina e nos citocromos é fundamental para o transporte e metabolismo do oxigênio ⁽⁸⁾.

Entretanto, a utilidade metabólica do ferro, manifestada pelo fato de apresentar número de oxidação variável (Fe^{2+} e Fe^{3+}), reflete também a facilidade com que esse elemento pode promover a transferência de elétrons com conseqüente formação de radicais livres ^(3,7). Essa é a situação da geração do radical hidroxil a partir da decomposição do peróxido de hidrogênio na presença do ferro (Fe^{2+}) pela reação de Fenton ⁽⁹⁾:



O ferro também pode participar da geração do radical hidroxil na qualidade de catalisador, mediando a reação entre o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido. Esta reação é denominada reação de Haber-Weiss ⁽⁹⁾:



A importância dos metais de transição, principalmente o ferro, na geração e mediação das lesões oxidantes causadas por radicais livres pode ser exemplificada pela lesão do DNA e conseqüente destruição celular em decorrência da ação de radicais hidroxil resultantes da reação do peróxido de hidrogênio com as moléculas de Fe^{2+} ligadas à cromatina da célula ⁽¹⁰⁾.

Essa e outras situações levantam a importante questão acerca de quais os mecanismos que viabilizam a disponibilidade do ferro para catalisar tais reações *in vivo*. Vale ressaltar que o ferro é um elemento manuseado com muito cuidado pelo organismo, que dispõe de proteínas de transporte (transferrina) e de armazenamento (ferritina) para reduzir a quantidade de ferro livre no interior das células e no meio extracelular. Assim, a transferrina e a ferritina são proteínas importantes que participam da defesa anti-oxidante.

Entretanto, uma conseqüência do excesso de produção das ERO é a sua capacidade de liberar o ferro na sua forma livre ou catalítica. O radical superóxido, por exemplo, tem a capacidade de mobilizar o ferro armazenado na forma de ferritina, tornando-o disponível para reações envolvendo radicais livres. Da mesma forma, o peróxido de hidrogênio pode degradar proteínas que contém grupos heme para liberar ferro livre ou ligado ao grupo heme, que são particularmente potentes na peroxidação lipídica e tóxicos ao endotélio ⁽²⁾.

Outra fonte importante para a liberação do ferro, além daquela mediada pelo excesso de ERO, é a lise celular. A destruição celular libera o ferro intracelular que expande e aumenta o estresse oxidativo nas células e tecidos adjacentes ⁽¹¹⁾.

1.1.3. A defesa anti-oxidante

Todas as células do organismo estão equipadas com sistemas anti-oxidantes para lidar com a formação das ERO que ocorre normalmente em pequena quantidade e de forma constante no organismo. A principal finalidade desse sistema é prevenir ou reduzir as lesões oxidativas causadas por radicais livres nas células. É importante destacar que a composição das defesas anti-oxidantes varia conforme o tipo de tecido e célula, podendo exacerbar-se frente a processos patológicos com estresse oxidativo ⁽⁴⁾.

A defesa oxidante é composta por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. O sistema enzimático abrange as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatíão peroxidase (GPx).

Como se pode observar pelas equações 2, 3 e 4 relatadas anteriormente, a presença da enzima SOD nas células é importante pois ela promove a dismutação do radical superóxido (equação 2), convertendo-o em peróxido de hidrogênio, que tem reatividade limitada. A detoxificação (ou redução) do peróxido de hidrogênio para água (equação 3), com conseqüente formação do radical hidroxil altamente reativo, e a conversão desse radical novamente em água (equação 4), são etapas mediadas pelas enzimas catalase e glutatíão peroxidase. Além disso, as enzimas anti-oxidantes também inibem a formação de radicais hidroxil promovidas ou catalisadas por metais de transição, principalmente o ferro. A catalase, por exemplo, interfere com a reação de Fenton (equação 5) uma vez que remove o peróxido de hidrogênio necessário para que aquela reação aconteça e a enzima SOD converte o radical superóxido requisitado pela reação de Haber-Weiss

(equação 6) ⁽²⁾. Desse modo, o perfeito equilíbrio entre as enzimas anti-oxidantes é importante para reduzir o acúmulo de radicais livres e manter a integridade celular.

O sistema anti-oxidante não-enzimático é representado por compostos produzidos pelo organismo como o ácido úrico, a albumina e a ceruloplasmina e por outros adquiridos pela dieta como o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o β -caroteno, os flavonóides, entre outros. Um dos meios de atuação desse sistema é a modificação de radicais livres com ação oxidativa potente em moléculas menos reativas, como se observa a partir da reação do ácido úrico com o radical hidroxil, da qual resultam radicais secundários com capacidade tóxica menos intensa ⁽²⁾. De fato, o ácido úrico e a albumina destacam-se pela sua importante contribuição para a defesa anti-oxidante do organismo, corroborada pela forte correlação entre a concentração desses elementos com a capacidade anti-oxidante total do plasma avaliada por testes laboratoriais e a pela atividade 'scavenger' de radicais livres gerados *in vitro* ("TRAP assays") ^(4,12,13,14).

1.1.4. Lesões celulares causadas por radicais livres

Os radicais livres podem ter ação benéfica ou deletéria em vários processos biológicos. São úteis e difundidas, por exemplo, as atividades das ERO quando produzidas em condições normais, relacionadas à produção de energia, destruição de microrganismos patogênicos na fagocitose, regulação do crescimento celular e da sinalização intercelular, além da síntese de compostos biológicos importantes. Entre os efeitos deletérios destaca-se o seu potencial de

provocar lesões em diversos componentes celulares como ácidos graxos poli-insaturados das camadas fosfolipídicas das membranas, vários aminoácidos (tirosina, histidina, metionina, cisteína, lisina e triptofano), cadeias carbônicas de unidades de carboidratos (ribose, ácidos nucleicos, proteoglicanos e ácido hialurônico), purina e pirimidina. Assim, a produção das ERO está envolvida com destruição de membranas, modificação da composição de proteínas e de enzimas e lesão do DNA ^(6,15). Considera-se que as lesões causadas por radicais livres atuem como fator causal no processo do envelhecimento e em várias doenças degenerativas como determinadas cardiopatias, cataratas, disfunções cognitivas e câncer ⁽²⁾.

Os eritrócitos representam um bom modelo para exemplificar a ação dos radicais livres, onde os principais focos da agressão são a membrana celular e a molécula de hemoglobina. Dependendo da intensidade das lesões produzidas, o ataque oxidativo pode reduzir o tempo de vida útil do eritrócito ou mesmo resultar em hemólise. Na membrana, a oxidação espontânea dos ácidos graxos insaturados decorrente da exposição ao fluxo constante de oxigênio pode estimular a produção de radicais livres nesse local, principalmente na presença de ferro, causando peroxidação lipídica e lesão estrutural ⁽¹⁶⁾. O α -tocoferol é um importante composto anti-oxidante localizado na membrana do eritrócito, sendo o principal responsável pela resistência à peroxidação lipídica ^(8,17). A molécula de hemoglobina tem a necessidade de manter o ferro integrante do grupo heme no estado ferroso, para que o mesmo possa exercer o transporte reversível de oxigênio; qualquer modificação na estrutura química do grupo heme pode promover o deslocamento de elétrons e formar radicais livres, notadamente o

radical superóxido, que inicia o processo oxidativo eritrocitário. A oxidação da oxihemoglobina produz metaemoglobina e radicais superóxido. Em condições normais, a metaemoglobina é reduzida à oxihemoglobina pela ação da metaemoglobina redutase e o radical superóxido sofre dismutação pela SOD, interrompendo a propagação e geração de novos radicais livres ^(18,19).

A detecção direta das ERO por meio de testes laboratoriais é difícil, uma vez que encontram-se em concentrações muito reduzidas e apresentam velocidade de reação extremamente rápida. Ainda assim, é possível aferir os subprodutos das ERO com o auxílio de ressonância paramagnética de elétrons; todavia, o custo e outras limitações dificultam o uso rotineiro dessa técnica. Desse modo, os métodos mais utilizados na avaliação laboratorial do estresse oxidativo são os espectrofotométricos e cromatométricos como os que determinam a atividade das enzimas integrantes da defesa anti-oxidante (SOD, catalase, glutatíon-peroxidase) e a concentração de malondialdeídos (úteis na avaliação da lipoperoxidação de membranas) ⁽²⁰⁾.

1.1.5. O estresse oxidativo e a sua relação com as doenças

Em condições normais a produção das ERO ocorre em equilíbrio com a capacidade anti-oxidante do organismo, embora haja um acúmulo lento e gradativo de lesões oxidativas que contribuem para o processo do envelhecimento e doenças relacionadas, como determinados tipos de câncer. Qualquer desequilíbrio nessa relação em que a formação de ERO sobrepuja a defesa anti-oxidante, resulta no que se denomina “estresse oxidativo” ⁽³⁾.

O estresse oxidativo pode decorrer tanto do depleção da defesa anti-oxidante (p.ex. desnutrição grave associada à baixa concentração de vitaminas, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol) quanto do aumento da produção de ERO, ou ambos. Sabe-se, por exemplo, que vários agentes químicos e drogas utilizadas com finalidades terapêuticas podem acelerar a produção de ERO. Os principais interferentes na intensidade do estresse oxidativo são a quantidade de ERO produzida, o alvo celular, a atividade do sistema anti-oxidante e a presença ou ausência de metais de transição (p.ex. ferro) ⁽³⁾.

A maioria das células tolera o estresse oxidativo de baixa intensidade, que geralmente se acompanha da elevação na atividade do sistema anti-oxidante. Entretanto, o estresse oxidativo acentuado resulta em alterações significativas no metabolismo celular, incluindo lesão do DNA, aumento do cálcio livre intracelular, alterações no transporte de íons e lesão de proteínas da membrana celular, consumo de NAD e ATP, além de peroxidação lipídica.

A presença das ERO já foi documentada em várias doenças e isso ocorre devido a sua produção aumentada em decorrência das lesões teciduais que

acompanham a maioria das doenças humanas. Desse modo, agressões teciduais por doenças, traumas, toxinas, lesões de isquemia-reperfusão, entre outras, podem elevar a produção das ERO, assim como o fazem com citocinas e outros mediadores inflamatórios. O quadro 1 lista as principais situações patológicas relacionadas à produção de ERO.

Quadro 1. Situações patológicas associadas à produção de espécies reativas do oxigênio (ERO)⁽²⁾.

-
- Envelhecimento
 - Mutações
 - Câncer
 - Doenças inflamatórias
 - Sobrecarga de ferro (por alteração hereditária ou adquirida)
 - Anemia secundária a malária, doença falciforme, talassemia ou uso de drogas pró-oxidantes (p.ex. primaquina, sulfas, etc.)
 - Alcoolismo
 - Radiação ionizante
 - Lesão pós-isquemia e reperfusão
 - Doença pulmonar decorrente da exposição a tabagismo, poluição, enxofre, asbesto e quimioterápicos (bleomicina)
 - Aterosclerose
 - Cardiotoxicidade secundária ao uso de quimioterápicos (adriamicina)
 - Doenças auto-imunes
 - Síndrome demencial, lesões neurológicas por trauma, isquemia ou hipertensão intracraniana
 - Catarata e retinopatia degenerativa
-

Em certas ocasiões, a formação das ERO está implicada na causa do processo patológico e não apenas na conseqüência deste. Isso ocorre na radiação ionizante, em que a quebra de moléculas de água decorrente do procedimento gera radicais hidroxil que são responsáveis pelas lesões celulares observadas nos pacientes. Em outras doenças, a geração de radicais livres, embora secundária, contribui significativamente para o processo de doença como na artrite reumatóide⁽²¹⁾, miocardiopatia⁽²²⁾, angina, aterosclerose⁽²³⁾, doença inflamatória intestinal⁽²⁴⁾ e seqüela cerebral decorrente de lesão isquêmica ou traumática^(25,26).

Nos pacientes portadores de câncer, são vários os mecanismos que podem provocar estresse oxidativo. A supressão da ingesta alimentar adequada, principalmente nos casos de anorexia prolongada e caquexia, altera o metabolismo energético e causa deficiência orgânica de compostos anti-oxidantes fornecidos pela dieta, que aliado à formação de ERO pelo processo inflamatório decorrente da atividade da própria doença provoca o estresse oxidativo. Adicionalmente, a utilização de quimioterápicos no tratamento dessas doenças, como agentes alquilantes, cisplatina e etoposide, também aumenta a produção de radicais livres, intensificando o estresse oxidativo^(27,28).

Mantovani et al.⁽¹⁵⁾ demonstraram que a produção de ERO não só encontrava-se substancialmente elevada em 28 pacientes portadores de vários tipos câncer quando comparadas aos valores obtidos de indivíduos normais, como também que esse aumento correlacionou-se com a atividade da doença e estado geral dos pacientes. Da mesma forma, observou-se diminuição da defesa anti-oxidante nesses doentes, representada pela atividade da enzima glutatião peroxidase, que também correlacionou-se com a atividade da doença. Assim,

caracterizou-se nesse estudo que pacientes portadores de neoplasia exibem o perfil típico de estresse oxidativo franco, caracterizado pelo aumento da produção de radicais livres de forma concomitante à redução da atividade anti-oxidante.

Os mesmos autores também mostraram nessa série de pacientes que o tratamento anti-oxidante, que incluiu a utilização de vitaminas A, C e E, glutathione reduzida, ácido alfa-lipóico, N-acetilcisteína, sais de carboxicisteína-lisina e amifostina, foi eficaz na redução da concentração das ERO e na elevação da atividade anti-oxidante.

1.2. Sobrecarga de ferro

1.2.1. Causas e conseqüências do excesso de ferro no organismo

Adultos normais concentram em média cerca de 35 a 45mg de ferro por quilo de peso, com exceção de mulheres em idade fértil que têm menor concentração de ferro devido à perda menstrual. A maior parte do ferro corporal encontra-se incorporada à hemoglobina dos eritrócitos maduros (cerca de 1800mg), seguido pelas células do parênquima hepático; o restante do ferro distribui-se nos macrófagos do sistema mononuclear-fagocitário, na mioglobina e nos precursores da medula óssea. No parênquima hepático e no sistema reticulo-endotelial do fígado, do baço e da medula óssea, a maior parte do ferro encontra-se armazenada nas proteínas de depósito ferritina e hemossiderina. O ferro é reaproveitado pelo organismo de forma extremamente eficaz, de modo que a quantidade diária de ferro absorvida da dieta (cerca de 1 a 2mg) é praticamente a

mesma que é perdida. A absorção desse elemento ocorre notadamente no duodeno e é regulada principalmente pela quantidade de ferro presente em forma de depósito no organismo. A absorção do ferro e o seu reaproveitamento a partir do sistema mononuclear-fagocitário podem ser inibidos pela ação hepcidina, uma enzima que apresenta importante ação reguladora no metabolismo do ferro. O ferro absorvido liga-se à transferrina plasmática que, embora contenha apenas 3mg de todo ferro corporal, é fundamental no seu transporte até os locais de utilização. Uma vez que não há uma via fisiológica para a excreção do ferro do organismo, o mecanismo de perda ocorre principalmente por descamação do epitélio intestinal e, nas mulheres, também pela menstruação ^(7,29). A ausência de uma via eficaz para a excreção de quantidades maiores de ferro é o principal fator responsável pela situação de sobrecarga que se configura diante de qualquer condição patológica que favoreça a entrada e o acúmulo de ferro no organismo.

A sobrecarga de ferro é uma complicação que se desenvolve em várias doenças e pode estar implicada em determinadas lesões orgânicas e no aumento da mortalidade. Dependendo do mecanismo envolvido na sua gênese, a sobrecarga de ferro pode ser classificada em primária, quando resulta de um defeito primário na regulação da absorção do ferro, ou secundária, quando decorre de outros mecanismos associados a determinadas doenças genéticas e adquiridas (Quadro 2).

Quadro 2. Principais causas de sobrecarga de ferro ^(30,31).

Sobrecarga de ferro primária

- Hemocromatose hereditária (subtipos):
 - Hemocromatose hereditária clássica
 - Hemocromatose juvenil
 - Deficiência do receptor-2 da transferrina
 - Deficiência de ferroportina (inclui casos de sobrecarga de ferro africana)
-

Sobrecarga de ferro secundária

- Anemias que cursam com eritropoiese ineficaz (p.ex. talassemia maior, talassemia intermédia, anemia sideroblástica, anemia diseritropoiética congênita)
 - Anemias que cursam com necessidade de múltiplas transfusões (p.ex. talassemia maior, doença falciforme, síndromes mielodisplásicas)
 - Hepatopatias crônicas
 - Excesso de administração de ferro parenteral
-

O principal exemplo da sobrecarga de ferro primária é a hemocromatose hereditária, caracterizada pela presença de mutações no gene *HFE* localizado no cromossomo 6 humano. Essa alteração pode ser herdada em heterozigose ou homozigose e o acúmulo de ferro resulta do excesso de absorção decorrente do aumento da transferência do ferro das células entéricas para o sangue. Apesar da descoberta da alteração genética associada a essa doença, o mecanismo fisiopatológico envolvido no aumento da absorção do ferro ainda é desconhecido. A via enteral também é a responsável pela sobrecarga de ferro observada na hemocromatose juvenil, na hipotransferrinemia congênita e na sobrecarga de ferro

em populações africanas, todas também causadas por defeitos genéticos relacionados ao descontrole da absorção do ferro ^(32,33).

As doenças que levam à sobrecarga de ferro secundária têm em comum o fato de cursarem com anemia. Nas situações que evoluem com eritropoiese ineficaz acentuada, como na talassemia maior e na anemia sideroblástica, parte do acúmulo de ferro se deve ao aumento da absorção desse elemento pelo trato gastro-intestinal para suprir a alta velocidade de proliferação dos precursores eritróides. A necessidade de múltiplas transfusões por tempo prolongado, como ocorre na talassemia maior, também provoca instalação rápida da sobrecarga de ferro uma vez que cada mililitro de uma unidade de concentrado de hemácias (com volume total variando de 200 a 250ml) contém aproximadamente 1mg de ferro. Assim, o tratamento com transfusões freqüentes e regulares nesses pacientes, embora eficaz na correção da anemia e na supressão da eritropoiese medular defeituosa, provoca outras complicações, principalmente o acúmulo de ferro por via parenteral, que intensifica a sobrecarga já existente em decorrência da eritropoiese ineficaz. Outras doenças também caracterizadas pela sobrecarga de ferro decorrente de transfusões múltiplas são a doença falciforme e as síndromes mielodisplásicas, além de doenças e situações que cursam com aplasia ou hipoplasia de medula óssea ^(31,32,34,35).

Com a progressão da sobrecarga de ferro, a capacidade da transferrina sérica de se ligar e detoxificar o ferro é excedida, causando o acúmulo de ferro não-ligado a transferrina no plasma. Essa forma livre do ferro tem forte tendência em mediar reações que levam à produção de ERO e, conseqüentemente, causam estresse oxidativo com lesão e destruição celular.

O ferro em excesso no organismo pode se distribuir predominantemente no parênquima dos órgãos ou no sistema retículo-endotelial, o que indica a presença de mecanismos fisiopatológicos distintos de sobrecarga de ferro com implicações relevantes quanto ao prognóstico e tipo de disfunção orgânica ocasionada. Assim, as lesões orgânicas por acúmulo de ferro são mais freqüentes e relevantes quando o depósito é intra-parenquimatoso, enquanto são menos expressivas quando o ferro encontra-se estocado no sistema retículo-endotelial dos órgãos. A sobrecarga de ferro no parênquima hepático é um evento que geralmente decorre do aumento da absorção intestinal de ferro, que é caracteristicamente observado na hemocromatose hereditária e nas anemias associadas à eritropoiese ineficaz. No contexto de múltiplas transfusões, o acúmulo de ferro na fase inicial do processo ocorre nos macrófagos do sistema retículo-endotelial, que degradam a hemoglobina dos eritrócitos fagocitados, agrupando o ferro liberado em moléculas de hemossiderina. Com a progressão para um estágio mais avançado da sobrecarga de etiologia transfusional, o ferro proveniente dos eritrócitos transfundidos, além de exceder a capacidade de saturação no plasma, é redistribuído do sistema retículo-endotelial para os hepatócitos e parênquima de outros órgãos, provocando lesão e disfunção orgânica ⁽³²⁾.

Nos pacientes que necessitam de transfusões regulares, nota-se depósito de ferro no parênquima de vários órgãos com potencial para gerar toxicidade e lesão após aproximadamente um ano do início do tratamento. As complicações mais freqüentes decorrentes do depósito de ferro nos indivíduos poli-transfundidos por tempo prolongado e não tratados com quelantes são as disfunções cardíacas, hepáticas e endócrinas. No coração, os cardiomiócitos aceleram o transporte do

ferro não-ligado a transferrina, intensificando o seu acúmulo; as principais complicações associadas são a hipertrofia e a dilatação do músculo cardíaco, além da degeneração das fibras do miocárdio. No fígado, o ferro é acumulado nas células de Kupffer em decorrência da fagocitose de hepatócitos necróticos carregados de ferro ou da incorporação de ferritina e hemossiderina provindas de hepatócitos danificados. O excesso de ferro no parênquima hepático causa a formação de colágeno e o desenvolvimento de fibrose portal, podendo induzir o quadro de cirrose nos casos graves. Nos indivíduos poli-transfundidos, a disfunção endócrina pela sobrecarga de ferro pode resultar no desenvolvimento de *diabetes mellitus*, além de manifestações decorrentes de depósitos na hipófise anterior, na tireóide, na paratireóide e nas glândulas adrenais ⁽³⁶⁾.

Até o momento, a melhor forma para prevenir ou tratar as complicações decorrentes da sobrecarga de ferro por múltiplas transfusões é a utilização de quelantes de ferro que se ligam a esse elemento e promovem a sua excreção.

1.2.2. Determinação laboratorial da sobrecarga de ferro

A quantidade de ferro presente no organismo pode ser determinada por meio de testes bioquímicos, biópsia hepática e exames de imagem.

Os principais testes bioquímicos utilizados na avaliação da sobrecarga de ferro consistem das determinações do ferro sérico, da saturação da transferrina e da ferritina sérica. O ferro sérico tem pouca importância nesse contexto, mas a sua determinação é obrigatória para o cálculo da saturação da transferrina. A saturação da transferrina está frequentemente elevada (acima de 50%) na vigência de sobrecarga de ferro, antes mesmo do aumento dos valores da ferritina sérica, e é um teste muito utilizado na triagem de casos suspeitos de hemocromatose hereditária. A ferritina sérica aferida laboratorialmente corresponde à menor fração dessas moléculas que após serem produzidas pelo retículo endoplasmático liso das células, são secretadas no plasma ao invés de permanecerem estocadas no meio intracelular. Assim, em condições normais, a ferritina plasmática reflete a quantidade de ferro armazenado dentro das células⁽³⁷⁾. De fato, em indivíduos poli-transfundidos, os valores de ferritina sérica se correlacionam com a quantidade de ferro armazenado no fígado desses pacientes; além disso, valores de ferritina persistentemente superiores a 2.500µg/L estão associados a maior incidência de lesão cardíaca e morte por cardiopatia^(38,39). Entretanto, a ferritina plasmática comporta-se também como proteína de fase aguda, sendo secretada em grande quantidade na vigência de quadros infecciosos, processos inflamatórios, neoplasias e lesão tecidual; nessas

situações, os resultados alterados são de difícil interpretação pois não refletem necessariamente a presença de ferro em excesso no organismo ^(40,41). A interpretação de valores seqüenciais de ferritina sérica associados aos da saturação da transferrina ajudam a diferenciar as situações reais de sobrecarga de ferro daquelas secundárias à resposta inflamatória em boa parte dos casos, sem a necessidade de utilizar testes invasivos ^(32,40).

Uma vez que o fígado é o principal órgão de depósito do ferro, a determinação da concentração do ferro hepático obtida por meio de biópsia hepática é tida como o “padrão ouro” para a avaliação do ferro corporal total e, conseqüentemente, para a quantificação da sobrecarga de ferro no organismo. No entanto, a natureza invasiva do procedimento aliada à necessidade de se obter uma quantidade substancial de material (cerca de 4mg) para uma análise acurada limitam a utilização desse método. Outro modo eficaz para avaliação da sobrecarga de ferro é a determinação não-invasiva do ferro hepático por meio de biossusceptometria magnética (SQUID). Apesar de manter excelente correlação com os resultados obtidos de biópsia hepática, esse método por imagem está limitado a apenas poucas instituições de pesquisa em todo o mundo. Recentemente, a realização de ressonância magnética utilizando uma técnica modificada denominada de T2* tem se mostrado de grande valia na avaliação da sobrecarga de ferro hepática e cardíaca ^(31,41).

Na prática clínica, os testes bioquímicos são os mais utilizados na avaliação da sobrecarga de ferro, pois embora sejam menos precisos que os outros métodos, são mais rápidos, mais baratos e prontamente disponíveis na maioria dos serviços.

1.3. Quimioterapia de altas doses com transplante de células precursoras hematopoiéticas (TCPH)

1.3.1. Conceitos e aplicações do TCPH

O transplante de medula óssea, melhor definido como quimioterapia de altas doses com infusão de células precursoras hematopoiéticas (TCPH), é uma modalidade terapêutica iniciada no final da década de 60⁽⁴²⁾ e aprimorada de forma constante até a atualidade.

O TCPH é um tratamento com eficácia comprovada em várias doenças (quadro 3). Em algumas situações o alvo desse tratamento é a correção de um defeito congênito ou adquirido da hematopoiese e/ou da função imune. Em outros casos, notadamente nas doenças neoplásicas, o principal objetivo é o de restaurar a função hematopoiética após terapia citotóxica em altas doses (mieloablativa) e, por vezes, proporcionar também imunoterapia anti-tumoral potente ⁽⁴³⁾.

Quadro 3. Doenças passíveis de tratamento com TCPH ⁽⁴³⁾.

Doenças neoplásicas

- Leucemia mielóide crônica
- Doenças mieloproliferativas crônicas
- Leucemia mielóide aguda
- Leucemia linfóide aguda
- Leucemia mielóide crônica juvenil
- Síndromes mielodisplásicas
- Leucemia linfóide crônica
- Linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin
- Mieloma múltiplo
- Tumores sólidos (câncer de mama, ovário, pulmão, testículo e neuroblastoma)

Doenças não-neoplásicas

- Anemia aplástica
 - Hemoglobinúria paroxística noturna
 - Talassemia maior e anemia falciforme
 - Doenças hematopoiéticas congênitas (anemia de Fanconi, síndrome de Blackfan-Diamond, disqueratose congênita, síndrome de Shwachman-Diamond)
 - Síndrome da imunodeficiência combinada grave
 - Síndrome Wiskott-Aldrich
 - Erros inatos do metabolismo
-

O TCPH é denominado de **alogênico** quando há necessidade de doador saudável como fonte de células precursoras hematopoiéticas e de **autogênico** quando as células são coletadas do próprio paciente. O TCPH alogênico pode ser realizado com doador aparentado (pertencente à família do paciente) ou não-aparentado; e a compatibilidade do HLA entre doador e paciente pode ser total ou

parcial. O doador ideal, e também o mais utilizado na atualidade, é o doador aparentado com HLA totalmente compatível ao do paciente ⁽⁴⁴⁾. A figura 1 mostra a evolução do número de transplantes realizados ao longo dos últimos 35 anos de acordo com o registro no CIBMTR ('center for international blood & marrow transplant research') ⁽⁴⁵⁾.

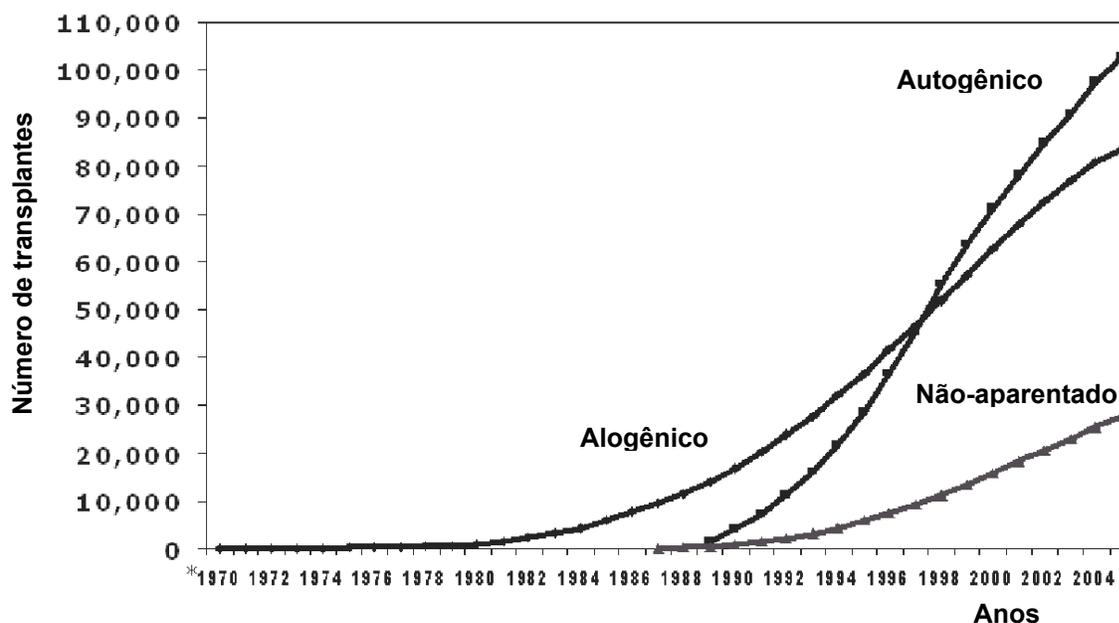


Figura 1. Evolução do registro de pacientes submetidos a TCPH de acordo com os dados do CIBMTR de 1970 até junho de 2005.

A coleta de células precursoras hematopoiéticas (CPH) de doador saudável ou paciente (no caso de TCPH autogênico) pode ocorrer de duas formas: diretamente da crista ilíaca posterior ou por meio de leucaférese, situação em que há necessidade de mobilização de CPH, que é o estímulo da medula óssea com fatores de crescimento como o G-CSF (fator de crescimento de colônias de granulócitos). A coleta CPH da crista ilíaca é realizada em centro cirúrgico sob

anestesia geral ou raqui-medular; esse procedimento envolve múltiplas punções para se obter a quantidade de volume em torno de 10mL para cada quilo do receptor, que confere cerca de 100 a 300 milhões de células mononucleares por quilo do receptor ^(43,44). Na coleta por meio de leucaférese, normalmente são processadas cerca de duas a quatro volemias do doador para se obter um mínimo de 2×10^6 células CD34+ por quilo do receptor e essas células são congeladas e criopreservadas para posterior infusão ⁽⁴³⁾.

Atualmente quase todos os TCPH autogênicos realizados utilizam como fonte as CPH do sangue periférico obtidas por meio de leucaférese. No TCPH alogênico, tanto a medula óssea quanto o sangue periférico são utilizados em grande escala como fontes de CPH. Estudos randomizados comparando essas duas fontes de CPH em pacientes submetidos a TCPH alogênicos, demonstraram enxertia mais rápida com CPH de sangue periférico, incidência de doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH) aguda semelhante com ambas as fontes de obtenção de CPH, maior tendência ao desenvolvimento de DECH crônica com CPH periféricas, menor mortalidade relacionada ao transplante e sobrevida aparentemente maior com CPH periféricas ^(46,47,48).

Tradicionalmente a programação do TCPH envolve a realização de terapia (quimioterapia e/ou radioterapia) com intensa ação citotóxica ou imunossupressora, que precede a infusão das CPH. Essa estratégia tem por finalidade eliminar as células neoplásicas e, no TCPH alogênico, evitar a rejeição do enxerto, bloqueando a ação da resposta imune do hospedeiro. Por convenção, o dia da infusão é considerado o dia 0 (D0) e os dias que a antecedem são representados por números negativos (D-1, D-2, D-3, em diante) e aqueles que a

sucedem são positivos (D+1, D+2, D+3, em diante). Em geral, após alguns dias da quimioterapia de altas doses, segue-se um período prolongado de mielossupressão caracterizado por diversas complicações, incluindo alta susceptibilidade a infecções; nessa fase, os pacientes recebem infusão de fatores de crescimento diariamente até que ocorra enxertia. A enxertia é caracterizada pela recuperação da contagem absoluta de neutrófilos ($>500/\mu\text{L}$) e de plaquetas ($>20.000/\mu\text{L}$), ocorrendo geralmente após 2 semanas da infusão de CPH nos pacientes que realizam TCPH autogênico e após 3 semanas naqueles submetidos ao TCPH alogênico ^(47,48).

1.3.2. Complicações precoces e tardias relacionadas ao TCPH

Além da mielossupressão prolongada e grave, o TCPH também está associado a várias outras complicações específicas, algumas delas praticamente restritas a pacientes transplantados.

Entre as complicações precoces, destacam-se as toxicidades provocadas pela quimioterapia de altas doses nas primeiras semanas após o TCPH. Assim, além da mieloablação, esse procedimento gera também toxicidade em outros locais, como na mucosa oral e do trato gastro-intestinal, fígado, rins, bexiga, sistema nervoso central, entre outros. O número e a intensidade dos vários tipos de toxicidade variam entre os pacientes, podendo inclusive estarem ausentes em alguns casos e causar óbito em outros ⁽⁴⁹⁾.

As infecções são complicações comuns e importantes nos pacientes submetidos ao TCPH. Na fase de aplasia que sucede a quimioterapia de altas doses são comuns as infecções bacterianas. Nesse período, a duração e a intensidade da neutropenia são fatores independentes para o risco de infecção, que é agravado também pelas lesões da mucosa oral e do gastro-intestinal, além da quebra da barreira cutânea pelo uso de cateter venoso central. Na fase intermediária, que vai do 2° ao 3° mês pós-TCPH, aumenta a incidência das infecções de etiologia fúngica e viral. Nesse período, os fatores que contribuem para o risco de infecção são as lesões de pele e de mucosa gastro-intestinal decorrentes de DECH aguda, o uso de imunossupressores, a utilização de cateter venoso central e a infecção pelo citomegalovírus. Na fase tardia (após o 3° mês de TCPH), a recuperação imunológica progressiva diminui o risco de infecções, entretanto, algumas complicações como a DECH crônica e a alteração da função retículo-endotelial com déficit de opsonização podem propiciar o aparecimento de infecções, notadamente aquelas causadas por bactérias encapsuladas ⁽⁵⁰⁾.

A DECH é uma complicação praticamente exclusiva do TCPH alogênico, que ocorre em cerca de 30 a 50% dos casos e impacta de modo relevante na evolução e na sobrevivência dos pacientes. Essa doença é mediada pela ação de linfócitos T competentes do doador contra antígenos de determinadas células do receptor e sua incidência é influenciada por fatores como disparidade de HLA e de sexo entre doador e paciente, idade do paciente, fonte e número de CPH infundidas. A DECH é denominada de aguda quando ocorre até 100 dias pós-TCPH e de crônica quando se desenvolve após esse período. A DECH aguda compreende uma síndrome clínica caracterizada principalmente pelo

acometimento da pele, fígado e trato gastro-intestinal, enquanto a DECH crônica consiste de manifestações mais abrangentes que, além de se desenvolver nos locais citados anteriormente, pode evoluir também com lesões oculares, orais, pulmonares, neuromusculares, entre outras. A profilaxia de DECH geralmente inclui o uso de ciclosporina com ou sem a associação de metotrexate. A presença de DECH desorganiza a reposta imune dos pacientes, aprofundando a imunossupressão e favorecendo a ocorrência de infecções, que são as principais responsáveis pela mortalidade associada à DECH ^(44,51,52).

1.3.3. Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo no TCPH

Já foi demonstrado que a sobrecarga de ferro ocorre como um evento precoce em pacientes que realizaram TCPH, caracterizado pela elevação nas concentrações de ferro sérico, saturação da transferrina, ferritina e ferro não-ligado à transferrina, embora os mecanismos responsáveis por essas alterações bem como suas conseqüências não estejam completamente esclarecidos ^(14,53). Da mesma forma, o excesso de ferro presente no acompanhamento à longo-termo desses pacientes pode contribuir para o aumento da morbidade tardia associada ao TCPH como, por exemplo, na etiologia da doença hepática crônica observada após um ano de transplante ⁽⁵⁴⁾.

A presença e a conseqüência do estresse oxidativo em pacientes submetidos ao TCPH também permanecem pouco estudadas e esclarecidas. Alguns autores demonstraram redução da capacidade anti-oxidante do plasma nas duas primeiras semanas pós-TCPH, concomitantemente ao aparecimento do

ferro não-ligado à transferrina, sugerindo a participação da sobrecarga de ferro no desenvolvimento do estresse oxidativo ^(14,53). No entanto, as implicações do estresse oxidativo nas intercorrências associadas ao transplante também não estão elucidadas até o momento atual.

Não há relatos na literatura acerca da evolução da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo tanto na fase precoce quanto tardia do acompanhamento de um mesmo grupo de pacientes submetidos ao TCPH. Da mesma forma, permanece desconhecida a relação da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo com as complicações observadas no período pós-transplante como, por exemplo, as toxicidades decorrentes da quimioterapia de altas doses, o aparecimento da DECH e a mortalidade relacionada ao transplante. Essas situações representam as justificativas para o estudo da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo nos pacientes submetidos ao TCPH, bem como da evolução desses parâmetros ao longo do acompanhamento e suas possíveis implicações na etiologia das complicações observadas no pós-transplante.

1.4. Objetivos

A presente tese teve os seguintes objetivos:

- Analisar a evolução dos parâmetros de sobrecarga de ferro e estresse oxidativo nas fases precoce e tardia do TCPH.

- Correlacionar os parâmetros de sobrecarga de ferro e estresse oxidativo com as características clínicas pré-TCPH, tipo de TCPH, enxertia e complicações observadas no período pós-transplante.

2. CASUÍSTICA E MÉTODO

A realização deste protocolo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (protocolo nº 3454/2005).

2.1. Seleção dos pacientes e características clínicas ao TCPH

Foram selecionados consecutivamente 21 pacientes adultos internados na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Base de São José do Rio Preto (SP) no período de abril a dezembro de 2005, para realização quimioterapia de altas doses com TCPH.

Os critérios de exclusão foram performance status > 2 ⁽⁵⁵⁾, doença renal ou hepática pré-existente (valores de creatinina e transaminases hepáticas acima de 1,5 vezes do limite superior da normalidade) e uso de alopurinol nas duas últimas semanas da internação para realização do TCPH.

Os dados referentes ao diagnóstico, tratamento quimioterápico prévio, antecedentes patológicos, antecedentes transfusionais e estado clínico atual, foram coletados por meio de questionário específico e objetivo aplicado no momento da internação dos pacientes.

O quadro 4 mostra as características clínicas dos pacientes, incluindo os diagnósticos e o tipo de TCPH realizado.

Quadro 4. Características clínicas dos 21 pacientes selecionados.

Mediana de idade (variação)	40 anos (17-58)
Sexo masculino / feminino	12 / 09
Doença de base	
<i>Leucemia linfóide aguda</i>	06
<i>Leucemia mielóide aguda</i>	03
<i>Leucemia mielóide crônica</i>	05
<i>Linfoma não-Hodgkin</i>	03
Linfoma de Hodgkin	01
<i>Mieloma múltiplo</i>	01
<i>Síndrome mielodisplásica</i>	01
<i>Mielofibrose primária</i>	01
Status da doença ao TCPH	
<i>Remissão</i>	12
<i>Recidiva</i>	09
Tipo de TCPH	
<i>Alogênico</i>	16
<i>Autogênico</i>	05
Quimioterapia prévia	
<i>Sim*</i>	15
<i>Não</i>	06
Transfusões prévias de CH	
Nenhuma	06
1 a 10 unidades	07
≥ 10 unidades	08

*Excluiu-se os casos de LMC tratados exclusivamente com hidroxiuréia

TCPH – transplante de células precursoras hematopoiéticas; CH - concentrado de hemácias

2.2. Protocolos de tratamento e medidas de suporte

Todos os TCPH alogênicos foram realizados com doador aparentado e HLA-compatível, e todas as coletas de CPH foram realizadas na crista ilíaca dos doadores. Para profilaxia da doença enxerto-contra-hospedeiro nos pacientes submetidos ao TCPH alogênico, foi utilizada a combinação de ciclosporina e metotrexate de acordo com o protocolo de Seattle ⁽⁵⁶⁾.

Os esquemas de condicionamento utilizados nos doentes submetidos ao TCPH alogênico foram bussulfan (16mg/Kg) em associação com ciclofosfamida (120mg/Kg) em 10 pacientes e bussulfan (16mg/Kg) em associação com fludarabina (200mg/m²) em 6 pacientes. Dentre os indivíduos que realizaram TCPH autogênico, os 4 portadores de linfomas (Hodgkin e não-Hodgkin) foram condicionados com o protocolo BEAM que consiste na associação de BCNU (300mg/m²), etoposide (400mg/m²), citarabina (400mg/m²) e melfalam (140mg/m²). O doente com mieloma múltiplo recebeu melfalam (200mg/m²) como quimioterapia de altas doses.

As medidas de suporte adotadas durante a internação para TCPH, como aporte calórico diário (25-35 Kcal/Kg/dia), suplementação protéica, anti-eméticos e profilaxia antibiótica para infecções bacterianas, fúngicas e virais foram semelhantes para todos pacientes.

Em relação ao suporte transfusional, a indicação de transfusões de concentrados de hemácias e de plaquetas obedeceu à norma recomendada pela unidade de TMO do Hospital de Base que visa manter, respectivamente, o valor da hemoglobina acima de 8 g/dL e número de plaquetas superior a 20.000/mm³

como profilaxia de sangramentos e acima de $50.000/\text{mm}^3$ nos doentes com sangramento evidente.

Também seguindo normas do serviço, antibioticoterapia sistêmica com associação de vancomicina e cefalosporina de 3^a geração foi instituída na vigência de qualquer quadro febril durante a internação, com ou sem hemoculturas positivas.

2.3. Análise laboratorial da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo

2.3.1. Análise laboratorial da sobrecarga de ferro

A sobrecarga de ferro foi analisada laboratorialmente por meio do perfil de ferro. O perfil de ferro consistiu nas determinações do ferro sérico, do índice de saturação da transferrina (IST) e da ferritina sérica. O ferro sérico foi quantificado por método espectrofotométrico (Dimension® DADE BEHRING, Newark, EUA; valores de referência = 35 – 150 $\mu\text{g}/\text{dL}$) e o IST (valores de referência = 20 – 50%) foi calculado após a determinação da capacidade total de ligação do ferro. A ferritina sérica foi quantificada por meio de imunoensaio de eletroquimioluminescência (ELECSYS® ROCHE, Mannheim, EUA) com valores de referência pré-estabelecidos (homens = 22 - 320 ng/mL ; mulheres = 10 - 291 ng/mL).

2.3.2. Análise laboratorial do estresse oxidativo

A análise laboratorial do estresse oxidativo nos pacientes foi realizada a partir da determinação de parâmetros plasmáticos e eritrocitários.

Os marcadores plasmáticos utilizados foram o ácido úrico e a albumina sérica, determinados por meio de métodos colorimétricos usuais. Os valores normais para os parâmetros plasmáticos do estresse oxidativo foram estabelecidos a partir de um grupo controle composto por 16 doadores de medula óssea adultos, saudáveis e com exames bioquímicos e hematológicos dentro dos padrões da normalidade.

Os parâmetros eritrocitários do estresse oxidativo consistiram das determinações de metaemoglobina e da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Para determinação quantitativa da metaemoglobina, foi utilizado método descrito recentemente que utiliza espectrofotometria sem interferentes químicos ou enzimáticos ⁽⁵⁷⁾.

A atividade da SOD foi determinada por meio do reagente Ransod (RANDOX®, Antrim, Inglaterra) que se baseia no método elaborado por McCord e Fridovich ⁽⁵⁾, pelo qual a adição de xantina e xantina oxidase na amostra estudada promove a geração de radicais superóxido que reagem com outro substrato adicionado, o clorido de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio, para formar um composto avermelhado. A atividade da SOD presente na amostra corresponde à intensidade de inibição da reação descrita acima, detectada por espectrofotometria a partir da alteração da absorvância antes e ao final da reação.

Os resultados de SOD foram então corrigidos para o valor da hemoglobina e expressos em unidades por grama de hemoglobina (U/gHb).

Por serem métodos pouco utilizados na rotina clínica e laboratorial, os valores de referência utilizados para SOD e metaemoglobina nesse estudo foram estabelecidos a partir de determinações em 10 amostras de sangue de indivíduos adultos, aparentemente saudáveis e com resultados de hemograma dentro dos padrões da normalidade.

2.3.3. Tempos de coleta para a análise laboratorial

As análises laboratoriais específicas para sobrecarga de ferro e estresse oxidativo foram prospectivas e realizadas no momento da internação dos pacientes (antes do início da quimioterapia de altas doses) e repetidas no D0 (após o término da quimioterapia, mas antes da infusão das células precursoras hematopoiéticas), no D+14 (duas semanas após o TCPH) e após o D+100. A figura 2 ilustra os momentos de coleta ao longo do tempo de acompanhamento dos pacientes.

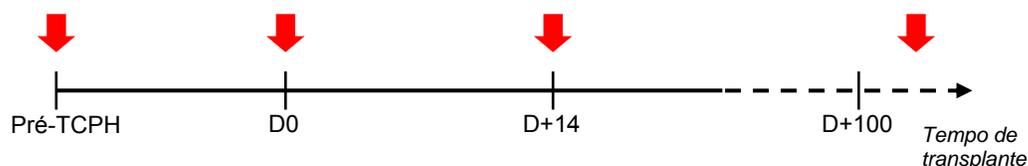


Figura 2. Pontos da análise laboratorial da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo (setas) durante o período de acompanhamento dos pacientes.

Todas as amostras foram coletas no período da manhã, por meio de punção venosa periférica e respeitando jejum de 10 a 12 horas.

2.4. Parâmetros de enxertia e documentação das complicações clínicas

Os parâmetros relacionados à enxertia analisados nesse estudo foram o número de células mononucleares infundidas, as contagens absolutas de reticulócitos e de leucócitos totais no D+14, além do 'tempo de enxertia', definido como o número de dias decorrentes desde o TCPH até o registro de uma contagem de leucócitos totais superior a $1000/\text{mm}^3$ por dois dias consecutivos.

Os pacientes selecionados foram acompanhados clínica e laboratorialmente durante todo o período de internação e em consultas periódicas após a alta hospitalar até a última avaliação no intuito de documentar as seguintes complicações associadas ao TCPH:

- Toxicidades decorrentes da quimioterapia de altas doses a partir da internação até o D+14. As toxicidades observadas foram classificadas de acordo com a escala de toxicidade NCI-CTC versão 2.0 ⁽⁵⁸⁾.

- Número de concentrados de hemácias transfundidos desde o início do protocolo até a última avaliação.

- Incidência de doença enxerto-contra-hospedeiro aguda durante o período de observação até o D+100 ⁽⁵⁹⁾.

- Mortalidade relacionada ao transplante (definida como morte sem evidências de recidiva da doença).

2.5. Análise estatística

Nesse estudo longitudinal e prospectivo foi utilizado o teste “t” pareado para analisar as diferenças entre as médias dos valores basais (pré-TCPH) dos parâmetros estudados com as médias obtidas dos mesmos pacientes nos outros tempos de coleta (D0, D+14 e após o D+100).

A comparação entre os parâmetros de estresse oxidativo analisados nos pacientes e os obtidos do grupo controle foi realizada com o auxílio do teste “t” para amostras independentes. Esse teste também foi utilizado para analisar os parâmetros laboratoriais quando a população de pacientes foi subdividida em função das suas características clínicas (tipo de TCPH, realização de quimioterapia prévia e *status* da doença ao TCPH) e das complicações pós-TCPH (ocorrência de toxicidade, DECH aguda e óbito).

O teste de correlação de Pearson foi empregado para o estudo de correlações entre os parâmetros laboratoriais analisados e outras variáveis como número de transfusões recebidas e parâmetros de enxertia.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método Kaplan-Meier e comparadas por meio do teste *log-rank*.

Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa SPSS versão 11.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e as diferenças foram consideradas significantes quando se obteve valor $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os pacientes selecionados foram acompanhados clínica e laboratorialmente durante todo o período de internação e em consultas periódicas após a alta hospitalar. A última avaliação ocorreu, em média, 6 meses após o TCPH (média: D+179; variação: D+100 a D+282) e foi realizada em 13 dos 21 pacientes que iniciaram a pesquisa, uma vez que ocorreram seis óbitos no período de estudo e dois pacientes não retornaram no tempo estipulado para a última avaliação.

A análise dos parâmetros de sobrecarga de ferro revelou elevação das médias dos valores de ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina no D0 e no D+14 em relação aos valores basais (pré-TCPH). Após seis meses, houve redução dos valores do ferro sérico e da saturação da transferrina para próximo dos observados no período pré-TCPH, porém a concentração de ferritina permaneceu elevada em relação aos valores basais (tabela 1).

Tabela 1. Evolução dos parâmetros de sobrecarga de ferro nos diferentes tempos de avaliação dos pacientes submetidos ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Pré-TCPH (n=21)	D0 (n=21)	D+14 (n=20)	6 meses (n=13)
Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	102,6 \pm 12,1	205,8 \pm 13,5 [†]	150,1 \pm 11,7 [*]	106,1 \pm 12,7
IST (%)	41,4 \pm 5,9	77,9 \pm 3,8 [†]	68,7 \pm 5,2 [†]	47,4 \pm 6,7
Ferritina (ng/mL)	636 \pm 131	1692 \pm 834	1660 \pm 276 [†]	829 \pm 147 [*]

IST = índice de saturação da transferrina

*p<0,05 em relação a pré-TCPH

†p<0,01 em relação a pré-TCPH

As concentrações dos parâmetros de estresse oxidativo do plasma - ácido úrico e albumina - foram progressivamente menores no D0 e no D+14 quando comparadas aos valores pré-TCPH. Após 6 meses observou-se normalização de ambos os parâmetros (tabela 2).

Não houve alteração dos valores de metaemoglobina e SOD nas três primeiras avaliações (pré-TCPH, D0 e D+14). No entanto, após 6 meses observou-se elevação na concentração de metaemoglobina e redução dos valores de SOD nos pacientes (tabela 2).

Tabela 2. Evolução dos parâmetros plasmáticos e eritrocitários de estresse oxidativo nos diferentes tempos de avaliação dos pacientes submetidos ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Pré-TCPH (n=21)	D0 (n=21)	D+14 (n=20)	6 meses (n=13)
Ácido úrico (mg/dL)	4,7±0,3	3,5±0,4 [†]	2,2±0,2 [†]	6,1±0,4
Albumina (g/dL)	3,7±0,1	3,5±0,1*	3,0±0,1 [†]	3,9±0,1
Metaemoglobina (%)	3,0±0,2	2,8±0,1	2,9±0,1	3,5±0,1 [†]
SOD (U/gHb)	951±155	836±129	967±102	557±50

*p<0,05 em relação a pré-TCPH

[†]p<0,01 em relação a pré-TCPH

A figura 3 ilustra os valores dos parâmetros de estresse oxidativo obtidos dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle, bem como a análise comparativa entre os dados dessas duas populações. Os valores de ácido úrico no D+14 e após 6 meses de transplante foram, respectivamente, menores e

maiores que os observados no grupo controle. A concentração de albumina foi inferior à do grupo controle em todos os tempos de coleta. Quanto aos parâmetros eritrocitários de estresse oxidativo, os valores de metaemoglobina no D+14 e após 6 meses foram superiores aos do grupo controle e as concentrações de SOD determinadas no pré-TCPH e no D+14 foram maiores que as obtidas dos indivíduos normais.

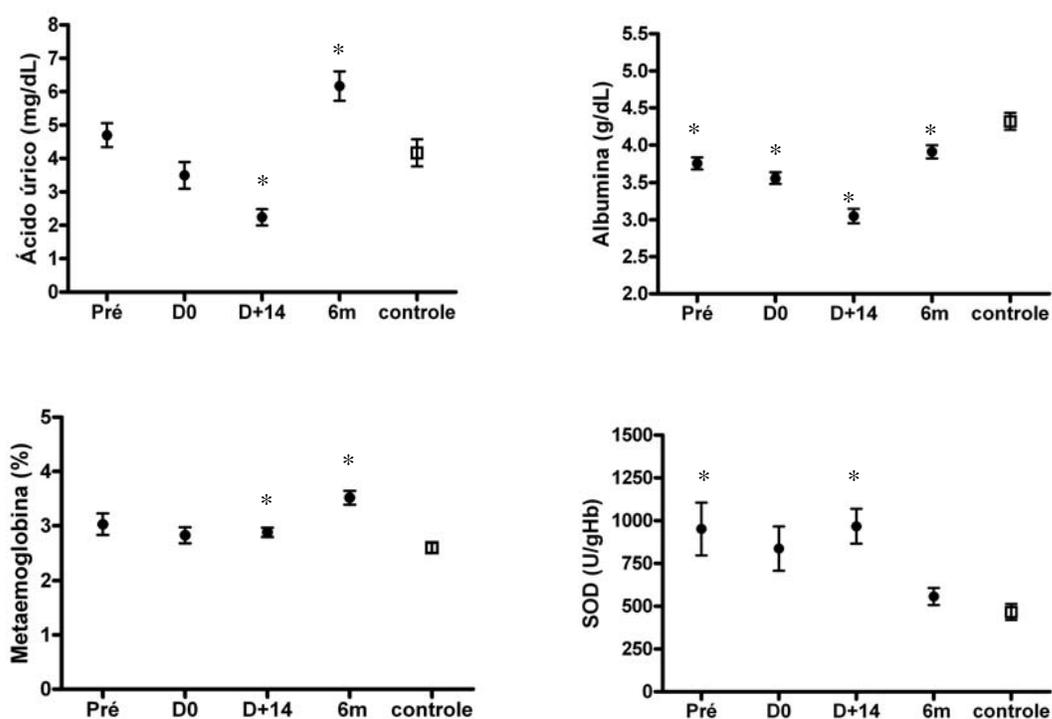


Figura 3. Parâmetros de estresse oxidativo obtidos dos pacientes (●) nos quatro tempos de coleta (pré-TCPH, D0, D+14 e 6 meses) e do grupo controle (□) – os pontos indicam a média e o erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Dentre os pacientes que participaram do estudo, 15 deles haviam sido transfundidos previamente ao TCPH e receberam, em média, 13 unidades de concentrados de hemácias (variando de uma a 50 unidades por paciente). Durante a internação os pacientes receberam, em média, três unidades de concentrados de hemácias (variando de zero a sete unidades). Foram infundidas, em média, cerca de $2,5 \times 10^8$ células mononucleares por quilograma nos pacientes (variando de 0,36 a 14,1 células mononucleares/Kg). Os tempos médios de enxertia foram de 10 dias (variando de 9 a 12 dias) nos pacientes submetidos a TCPH autogênico e de 18 dias (variando de 12 a 41 dias) naqueles que receberam TCPH alogênico.

As correlações entre o número de transfusões recebidas e os parâmetros de enxertia com os perfis de ferro e de estresse oxidativo são exibidas nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

A tabela 3 mostra que os valores de ferritina apresentaram maior número de correlações com o histórico transfusional dos pacientes, enquanto que a concentração do ferro sérico e a saturação da transferrina mostraram mais correlações com os parâmetros de enxertia. A análise das transfusões realizadas durante o período de internação demonstra que, com exceção do ferro no D0 ($p < 0,05; r = 0,46$), não foi evidenciada nenhuma outra correlação entre o número de unidades transfundidas nesse período e os demais parâmetros de sobrecarga de ferro obtidos no D0 e no D+14.

Tabela 3. Correlações entre o histórico transfusional (transfusões prévias ao TCPH e total de transfusões) e dados de enxertia com os parâmetros de sobrecarga de ferro.

	Transfusões prévias	Transfusões no total*	Leucócitos D+14	Reticulócitos D+14	Tempo de enxertia	Células mono.
Ferro pré	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ferro D0	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ferro D14	Ns	Ns	p<0,01 (r=-0,59)	Ns	Ns	Ns
Ferro 6m	Ns	Ns	Ns	Ns	p<0,05 (r=0,65)	Ns
IST pré	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
IST D0	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	p<0,01 (r=-0,61)
IST D+14	Ns	Ns	p<0,0001 (r=-0,80)	P<0,05 (r=-0,52)	Ns	p<0,05 (r=-0,48)
IST 6m	Ns	p<0,001 (r=0,87)	Ns	Ns	p<0,01 (r=0,71)	Ns
Ferritina pré	p<0,001 (r=0,68)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ferritina D0	p<0,001 (r=0,67)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ferritina D+14	p<0,01 (r=0,57)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ferritina 6m	Ns	p<0,0001 (r=0,91)	Ns	Ns	Ns	Ns

Cel.mono=células mononucleares; IST=índice de saturação da transferrina; 6m=6 meses; Ns=não-significante. Os valores positivos e negativos do coeficiente “r” indicam, respectivamente, correlações direta e inversamente proporcionais.

*total de transfusões recebidas desde o diagnóstico até a última avaliação.

Tabela 4. Correlações entre o histórico transfusional (transfusões prévias ao TCPH e total de transfusões) e dados de enxertia com os parâmetros de estresse oxidativo.

	Transfusões prévias	Transfusões no total*	Leucócitos D+14	Reticulócitos D+14	Tempo de enxertia	Células mono.
Ác. Úrico pré	Ns	Ns	p<0,05 (r=0,46)	p<0,05 (r=0,47)	p<0,05 (r=-0,48)	Ns
Ác. Úrico D0	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Ác. Úrico D+14	Ns	Ns	p<0,001 (r=0,75)	p<0,01 (r=0,67)	p<0,01 (r=-0,58)	Ns
Ác. Úrico 6m	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Albumina pré	Ns	Ns	Ns	Ns	p<0,05 (r=-0,50)	Ns
Albumina D0	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Albumina D+14	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
Albumina 6m	Ns	p<0,05 (r=-0,71)	Ns	p<0,05 (r=0,63)	Ns	Ns
MetaHb pré	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
MetaHb D0	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
MetaHb D+14	p<0,05 (r=-0,48)	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
MetaHb 6m	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
SOD pré	Ns	p<0,01 (r=0,68)	Ns	Ns	Ns	Ns
SOD D0	Ns	Ns	p<0,05 (r=0,51)	p<0,05 (r=0,53)	Ns	Ns
SOD D+14	p<0,05 (r=-0,49)	Ns	Ns	Ns	Ns	p<0,05 (r=0,53)
SOD 6m	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

Cel.mono=células mononucleares; Ác.úrico=ácido úrico; MetaHb=metaemoglobina; SOD=superóxido dismutase; Ns=não-significante. Os valores positivos e negativos do coeficiente “r” indicam, respectivamente, correlações direta e inversamente proporcionais.

*total de transfusões recebidas desde o diagnóstico até a última avaliação.

Com exceção da determinação da albumina após 6 meses de TCPH, não houve correlação entre o número de concentrados de hemácias transfundidos e os parâmetros plasmáticos de estresse oxidativo. Os valores de albumina e principalmente os de ácido úrico estiveram mais correlacionados com os dados de enxertia. Quanto aos parâmetros eritrocitários, a metaemoglobina (no D+14) se correlacionou apenas com o número de transfusões prévias, porém não houve associação entre esse parâmetro e os dados de enxertia. Já os valores de SOD se correlacionaram com o histórico transfusional e, principalmente, com os parâmetros de enxertia.

As alterações do perfil de ferro e do estresse oxidativo foram analisadas em função das características clínicas pré-TCPH e das complicações observadas após o procedimento. As tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mostram os parâmetros que foram diferentes em cada uma dessas situações.

Tabela 5. Parâmetros que apresentaram diferença em função do tipo de TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	TCPH alogênico	TCPH autogênico	valor “p”
IST D+14 (%)	75,3±5,4 (n=16)	49±9,1 (n=5)	p<0,05
Ácido úrico D+14 (mg/dL)	1,9±0,2 (n=15)	3,1±0,4 (n=5)	p<0,05
Albumina 6 meses (g/dL)	3,7±0,1 (n=9)	4,2±0,1 (n=4)	p<0,05

Tabela 6. Parâmetros que apresentaram diferença em função da realização de quimioterapia (QT) anterior à internação para TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Sem QT prévia	Com QT prévia	Valor “p”
Ferro pré (µg/dL)	61,6±11,4 (n=6)	118,9±14,4 (n=15)	p<0,05
IST pré (%)	21±4,7 (n=6)	49,6±7,1 (n=15)	p<0,01
Ferritina pré (ng/dL)	172±97 (n=6)	823±157 (n=15)	p<0,05
Ácido úrico D+14 (mg/dL)	2,5±0,3 (n=5)	1,5±0,5 (n=15)	p<0,01

Tabela 7. Parâmetros que apresentaram diferença em função do *status* da doença ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Remissão completa	Sem remissão completa	valor “p”
Ácido úrico 6m (mg/dL)	6,8±0,6 (n=8)	5,1±0,2 (n=5)	p<0,05
Albumina D+14 (g/dL)	2,8±0,1 (n=12)	3,3±0,1 (n=8)	p<0,05

Não foram observadas diferenças nos perfis de ferro e de estresse oxidativo em função do desenvolvimento de toxicidade grau III e/ou IV na análise conjunta de todos os pacientes. No entanto, restringindo essa análise ao grupo de pacientes transplantados com a doença em remissão, livres da interferência da atividade neoplásica e, portanto, sujeitos apenas aos efeitos tóxicos do condicionamento, foi detectado que os doentes que desenvolveram toxicidade grau III e/ou IV apresentavam valores basais de ferro sérico e de saturação da transferrina mais elevados que aqueles com toxicidade menos intensa (tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros que apresentaram diferença em função do desenvolvimento de toxicidade grau III e/ou IV no grupo de pacientes transplantados com a doença em remissão completa – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Sem toxicidade III/IV	Com toxicidade III/IV	valor “p”
Ferro sérico pré (µg/dL)	54,7±5,5 (n=4)	99,8±17,3 (n=8)	p<0,05
IST pré (%)	18,5±2,1 (n=4)	41,5±8,7 (n=8)	p<0,05

Tabela 9. Parâmetros que apresentaram diferença em função da presença de doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH) aguda grau III/IV – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Sem DECH III/IV	Com DECH III/IV	valor “p”
Albumina D0 (g/dL)	3,6±0,4 (n=12)	3,2±0,05 (n=2)	p<0,05

Dos seis óbitos observados no período de estudo, um ocorreu por recidiva de doença e os outros cinco por causas relacionadas ao transplante. Observou-se que nos pacientes que morreram por causas relacionadas ao transplante os valores de saturação da transferrina no dia 0 foram mais altos (tabela 10). A figura 4 mostra a mortalidade precoce relacionada ao transplante em função da presença de valores elevados da saturação da transferrina no dia 0.

Tabela 10. Parâmetros que apresentaram diferença em função da ocorrência de óbito relacionado ao TCPH – os valores referem-se à média e ao erro padrão.

	Vivos	Óbitos	valor “p”
IST D0 (%)	74,9±4,7 (n=16)	87,6±3,0 (n=5)	p<0,05

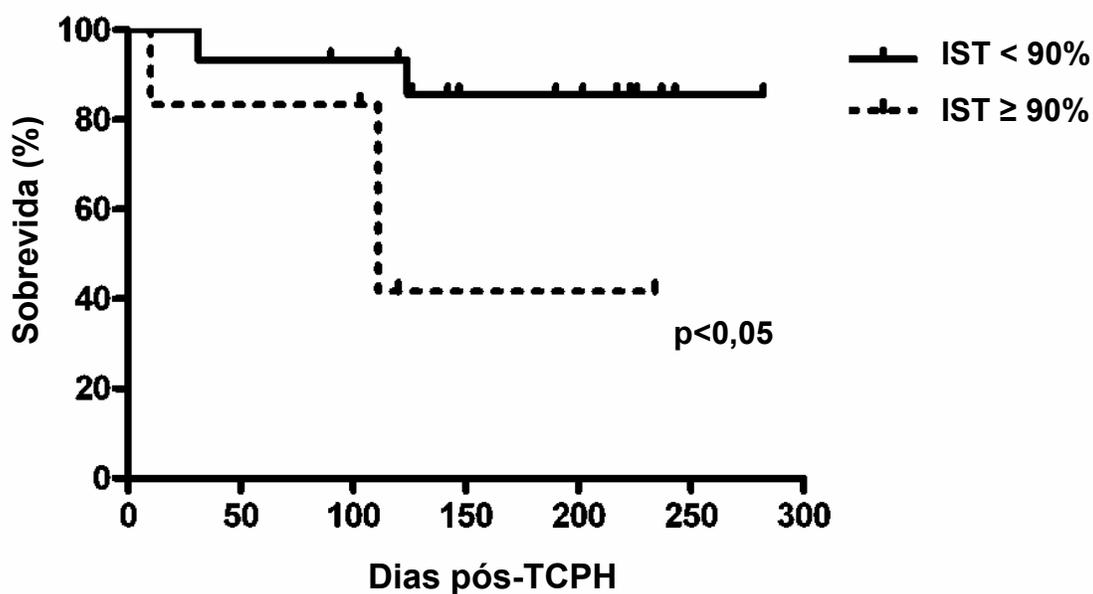


Figura 4. Mortalidade relacionada ao transplante em 21 pacientes em função dos valores de saturação da transferrina no dia 0. (IST = índice de saturação da transferrina).

4. DISCUSSÃO

São poucos os relatos na literatura que avaliaram conjuntamente a ocorrência de sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em pacientes submetidos a quimioterapia de altas doses com transplante de células precursoras hematopoiéticas; e destes, nenhum documentou a evolução de tais complicações na fase tardia do acompanhamento pós-TCPH. Nosso estudo permitiu a avaliação dos parâmetros de sobrecarga de ferro e estresse oxidativo tanto na fase precoce como após cerca de seis meses do TCPH, possibilitando não só a análise da evolução dos parâmetros ao longo desse tempo como também sua variação em função da interferência de características clínicas pré-TCPH e sua relação com as complicações observadas durante o período de acompanhamento dos pacientes. A inclusão de pacientes submetidos tanto a transplantes alogênicos como autogênicos proporcionou uma análise mais abrangente das alterações relacionadas ao TCPH.

Na população de pacientes estudada, a elevação dos valores de ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina sérica principalmente no dia da infusão de CPH (D0) e também após duas semanas desta (D+14) indicam que a sobrecarga de ferro é um evento agudo que ocorre após a quimioterapia de altas doses em pacientes que realizam TCPH. Esses resultados corroboram os obtidos por Gordon et al. ⁽⁶⁰⁾, que analisaram a evolução dos mesmos parâmetros (ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina) em 32 pacientes submetidos a TCPH autogênico condicionados com quimioterapia de altas doses em associação com radioterapia e observaram que os valores máximos também ocorreram ao final do condicionamento. Esses autores sugerem que as alterações encontradas podem

estar associadas à lesão endotelial e à toxicidade orgânica observada no TCPH autogênico.

Em estratégia semelhante à uma das etapas do nosso estudo, Dürken et al.⁽⁶¹⁾ acompanharam o perfil de ferro de 40 pacientes na fase precoce de TCPH alogênicos e autogênicos para estudar, em três momentos (pré-condicionamento, D0 e D+14), a evolução dos parâmetros de sobrecarga de ferro, incluindo a determinação da concentração do ferro livre ou ferro não-ligado à transferrina, que é altamente reativo na geração de radicais livres. Os resultados obtidos nesse estudo também foram semelhantes aos nossos e demonstraram que todos os parâmetros que compuseram o perfil de ferro (ferro livre, ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina) se elevaram no D0 quando comparados aos valores basais e, com exceção do ferro sérico, todos os outros permaneceram elevados no D+14.

A detecção do ferro livre no TCPH também foi observada por outros autores^(62,63). Em estudo envolvendo 10 pacientes condicionados com quimio e radioterapia e submetidos a TCPH alogênico, a saturação da transferrina elevou-se substancialmente após dois dias do início do condicionamento e o ferro livre foi detectado no plasma de todos os pacientes no D-4, permanecendo detectável em metade deles no D+11⁽⁶²⁾. Um dado interessante desse estudo foi que o aparecimento do ferro livre no plasma esteve correlacionado à elevação da saturação da transferrina, sendo detectado em 88% das amostras com saturação de transferrina superior a 80%.

Nossos resultados referentes à influência das características clínicas dos pacientes no perfil de ferro revelaram que tanto o número de transfusões de concentrados de hemácias anteriores ao TCPH como a realização de

quimioterapia prévia estiveram relacionadas às alterações dos valores basais dos parâmetros analisados. Entretanto, o número de transfusões realizadas durante o período de internação não justificou as alterações pronunciadas no perfil de ferro que ocorreram após a quimioterapia de condicionamento, indicando que outros fatores contribuíram para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro precocemente no TCPH.

Os fatores responsáveis pelo excesso de ferro observado após o condicionamento para TCPH não estão completamente esclarecidos. As principais hipóteses geradas nos estudos que abordaram esse assunto foram de que o excesso de ferro seria decorrente da redução da sua captação por precursores eritróides devido à supressão da eritropoiese após a quimioterapia mieloablativa ^(60, 61, 63), lise de células normais e neoplásicas com liberação do ferro armazenado no meio intracelular, e toxicidade hepática, que resultaria na liberação do ferro estocado no parênquima hepático e na diminuição da produção de proteínas ligantes do ferro como, por exemplo, a transferrina ^(61,64).

A relação inversa entre a intensidade da saturação da transferrina (principalmente no D+14) e os parâmetros de recuperação hematológica dos nossos pacientes, reforça a hipótese de que a supressão da atividade hematopoiética é fundamental para o aparecimento e a duração da sobrecarga de ferro no TCPH, uma vez que quanto maior a evidência de enxertia, e conseqüente recuperação eritropoiética, menor a saturação da transferrina e vice-e-versa. Esse mecanismo também foi sustentado por Bradley et. al. ⁽⁶³⁾, que demonstraram relação inversa entre a concentração do ferro livre e os marcadores de atividade eritropoiética, representados pela contagem de reticulócitos e concentração dos

receptores da transferrina em nove pacientes submetidos a TCPH. Nesse estudo, o aumento da concentração do ferro livre foi associado à elevação da saturação da transferrina, mas não se correlacionou com os valores de ferro sérico e ferritina. Assim, a análise do perfil de ferro no nosso e em outros estudos apontam a saturação da transferrina como um parâmetro confiável e fidedigno de sobrecarga de ferro, bem como um marcador notável da atividade eritropoiética e de enxertia após o TCPH. Essa suposição justifica os valores menores de saturação da transferrina no D+14 dos nossos pacientes submetidos a TCPH autogênico, nos quais o tempo médio de enxertia foi mais curto quando comparado ao dos que realizaram TCPH alogênico, em que a recuperação da atividade hematopoiética foi mais lenta. Entre os outros parâmetros analisados na fase precoce do TCPH, a ferritina é a que demanda maior cautela quando da investigação de sobrecarga de ferro, uma vez que o seu resultado pode se alterar na vigência de processos inflamatórios, infecciosos, neoplásicos e de lesão tecidual ^(40,65), todos eles muito comuns em pacientes que realizam o procedimento.

Desse modo, após a quimioterapia de altas doses para TCPH, é possível que o desenvolvimento da sobrecarga de ferro aguda exceda a capacidade de transporte e armazenamento desse elemento e conduza ao aumento da concentração de ferro na sua forma livre, que atua como potente catalisador das reações geradoras de radicais livres (reação de Fenton e Harber-Weiss), cujas lesões biológicas participariam da toxicidade e de outras complicações decorrentes da quimioterapia de altas doses no TCPH. A participação do excesso de ferro no estresse oxidativo e na intensidade da toxicidade observados após

tratamento citotóxico foi demonstrada por Carmine et. al.⁽⁶⁴⁾ em estudo realizado com 21 crianças portadoras de leucemia linfóide aguda que receberam quimioterapia com metotrexate em altas doses. Os resultados obtidos por esses autores revelaram não só a presença de ferro livre no plasma de 76% dos pacientes após o tratamento, como também a associação desta com o desenvolvimento de peroxidação lipídica “in vitro” e oxidação protéica “in vivo”, além de sua correlação com a intensidade das toxicidades clínicas observadas após a quimioterapia.

Nosso estudo procurou abordar a relação entre sobrecarga de ferro e toxicidade nos pacientes submetidos ao TCPH, uma vez que não há relatos acerca desse problema até o momento. Assim, inicialmente, não se observou alteração do perfil de ferro em função da incidência de toxicidade grau III ou IV na análise conjunta de todos os pacientes. Entretanto, no subgrupo de pacientes transplantados com a doença em remissão e, portanto, livres da interferência da atividade neoplásica e sujeitos apenas aos efeitos tóxicos da quimioterapia em altas doses, observamos que aqueles que desenvolveram toxicidade grau III ou IV apresentaram valores basais mais elevados de ferro sérico e saturação da transferrina. Um achado interessante no estudo de Carmine et al. citado anteriormente ⁽⁶⁴⁾, foi que a correlação entre a sobrecarga de ferro e a toxicidade pós-quimioterapia também se mostrou mais evidente nos pacientes tratados com a doença em remissão quando comparados àqueles com a doença em atividade, mesmo que nestes a gravidade da toxicidade tenha sido maior. Nossos resultados apoiam a sugestão desses autores de que o perfil de ferro obtido de pacientes com a doença em atividade pode subestimar a quantidade real de ferro liberado

pelo tratamento citotóxico, provavelmente em virtude da ligação do ferro aos produtos de lise das células neoplásicas.

Em nossa série de pacientes observamos ainda que a mortalidade precoce relacionada ao transplante foi maior naqueles que apresentaram elevação considerável da saturação da transferrina no D0. O impacto da sobrecarga de ferro aguda na mortalidade pós-transplante também foi documentado por Altès et al.⁽⁶⁶⁾, que acompanharam 25 pacientes submetidos a TCPH alo e autogênicos e demonstraram que valores muito elevados de ferritina no pré-TCPH e de saturação da transferrina no D-4 estiveram, ambos, associados à menor sobrevida global e maior mortalidade relacionada ao transplante.

Além da toxicidade aguda e mortalidade precoce, o excesso de ferro também parece estar associado à complicações crônicas pós-TCPH. Uma análise de 76 pacientes submetidos a transplantes alo e autogênicos revelou que 88% deles apresentavam valores de ferritina elevados após um ano de transplante e que nessa fase, a sobrecarga transfusional foi o principal fator responsável pela alteração observada⁽⁶⁷⁾. Tanto nesse quanto noutro estudo envolvendo 106 pacientes avaliados após dois anos de TCPH⁽⁵⁴⁾, a disfunção hepática crônica foi uma complicação comum e a sobrecarga de ferro representou a etiologia da metade desses casos. Em ambos esses estudos, demonstrou-se que o tratamento com flebotomias foi eficaz na redução dos valores das transaminases hepáticas e da ferritina em alguns dos pacientes portadores de hepatopatia crônica decorrente de sobrecarga de ferro.

Embora não tenhamos abordado a incidência de complicações crônicas, nosso estudo possibilitou a análise da evolução do perfil de ferro ao longo do

tempo no mesmo grupo de pacientes. Assim, observamos que os parâmetros alterados que configuraram sobrecarga de ferro durante a internação tenderam à normalização após seis meses de transplante, com exceção da ferritina que permaneceu elevada e foi fortemente associada ao total de transfusões realizadas pré e pós-transplante, num momento em que é improvável a interferência de outros fatores como, por exemplo, a toxicidade do condicionamento. Esses dados sustentam a importância destacada por outros estudos, da investigação de sobrecarga de ferro também em fases tardias do TCPH, especialmente nos casos de alta necessidade transfusional pós-transplante.

Nossos resultados em relação à sobrecarga de ferro reforçam a suposição de vários autores quanto à influência desse evento no aumento da morbidade e da mortalidade associada ao TCPH e também corrobora a sugestão do tratamento com flebotomias ou quelantes de ferro na tentativa de reduzir a intensidade das complicações observadas. Quanto a possíveis abordagens terapêuticas, evidências “in vitro” já demonstraram que a utilização de quelantes de ferro diminuiu a produção do radical hidroxila⁽⁴⁾ e inibiu a lesão do DNA celular causada por radicais livres e mediada pelo ferro⁽¹⁰⁾.

A análise específica do estresse oxidativo associado ao TCPH conta com a contribuição de poucos estudos que utilizaram como marcadores desse evento, determinados parâmetros que compõem a defesa antioxidante do organismo. Dois destes estudos adotaram como parâmetro o ‘ensaio-armadilha’ de radicais livres designado de *TRAP*, que mensura a capacidade antioxidante total do plasma, cujo principal componente e contribuinte é o ácido úrico. No primeiro deles, observou-se que tanto os valores de *TRAP* quanto os de ácido úrico diminuiriam no D0 em

relação aos valores pré-condicionamento de sete pacientes submetidos a TCPH; além disso, constatou-se que essa alteração foi associada à diminuição da concentração de ácido linoléico, indicando peroxidação lipídica, e à elevação do ferro sérico ⁽⁶⁸⁾. No outro estudo, que envolveu 16 pacientes submetidos a transplantes alogênicos e autogênicos, os valores de TRAP e de ácido úrico estiveram fortemente correlacionados e decaíram progressivamente após a quimioterapia de altas doses no D0 e no D+14 em relação às determinações basais ⁽¹⁴⁾. Esse trabalho também mostra correlação inversa entre os valores de TRAP e os do ferro livre, além da associação deste à formação de produtos de oxidação lipídica, sugerindo a participação da sobrecarga de ferro no estresse oxidativo que ocorre no TCPH.

Nosso estudo utilizou o ácido úrico e a albumina como parâmetros antioxidantes do plasma. Observamos que a evolução dos valores de ácido úrico nos primeiros dias após o TCPH foi semelhante à reportada por outros autores ^(14,68) e, adicionalmente, documentamos que após seis meses os valores desse parâmetro retornam para próximo dos obtidos anteriormente ao procedimento. Já foi demonstrado que os produtos de oxidação do ácido úrico aumentam após a quimioterapia de altas doses no TCPH ⁽¹⁴⁾, indicando que o estresse oxidativo é um dos principais fatores responsáveis pela redução da concentração desse elemento após o condicionamento. Também observamos redução da concentração de albumina no D0 e no D+14, com retorno dos valores aos níveis basais após seis meses de transplante. Embora estatisticamente significativa, a oscilação da albumina ao longo do tempo não foi muito expressiva, talvez pelo

incremento da suplementação alimentar quando da evidência de hipoalbuminemia, o que pode ter atenuado o impacto do estresse oxidativo nesse parâmetro.

A associação entre o perfil antioxidante do plasma e os parâmetros de enxertia foi analisada no presente estudo. Assim, observamos que os valores de ácido úrico pré-TCPH e no D+14 se correlacionaram diretamente com a recuperação hematológica; houve também correlação entre a concentração de albumina pré-TCPH e o tempo de enxertia. Não há relatos na literatura acerca dessas associações, de forma que os nossos resultados indicam, pela primeira vez, uma possível correlação inversa entre intensidade do estresse oxidativo e recuperação hematológica. Essa suposição é respaldada pelos achados de Ito et al. ⁽⁶⁹⁾ em modelos animais, em que concentrações elevadas das espécies reativas do oxigênio reduziram a sobrevivência de células precursoras hematopoiéticas *in vivo*.

Desse modo, sugerimos que além da determinação do perfil de ferro, sejam avaliados também os parâmetros antioxidantes do plasma – preferencialmente o ácido úrico – nos pacientes submetidos a TCPH, uma vez que essas determinações parecem atuar como marcadores de toxicidade e enxertia após o transplante.

Em relação à associação com as características clínicas dos pacientes, a redução da atividade antioxidante do plasma após duas semanas de transplante, representada pelos baixos valores de ácido úrico no D+14, foi mais expressiva nos pacientes que receberam quimioterapia prévia e naqueles submetidos a TCPH alogênico, ou seja, nos pacientes expostos a situações que sabidamente geram estresse oxidativo. No caso do TCPH alogênico, um dos fatores que poderiam impactar no processo oxidativo é a profilaxia para doença enxerto-contra-

hospedeiro utilizada nos nossos pacientes, que incluiu a administração de ciclosporina em associação com metotrexate.

Os parâmetros eritrocitários do estresse oxidativo não oscilaram nos pacientes durante o período de internação até o D+14. Entretanto, quando comparados aos do grupo controle, os valores de metaemoglobina no D+14 e os de SOD no pré-TCPH e no D+14 foram superiores, o que denota a existência de processo oxidativo eritrocitário. Cetin et. al.⁽⁷⁰⁾ estudaram parâmetros de estresse oxidativo, incluindo a determinação de SOD, em 36 pacientes submetidos a TCPH autogênico e constataram que as evidências diretas do incremento no estresse oxidativo são acompanhadas por um mecanismo compensatório caracterizado pelo aumento da concentração de enzimas antioxidantes, notadamente da SOD. Isso poderia explicar a concentração elevada de SOD dos nossos pacientes no período de internação e a sua normalização após 6 meses de transplante.

Foi observado também uma correlação interessante entre os valores de SOD no D0 e os parâmetros de recuperação hematológica, o que sugere um possível efeito protetor da SOD sobre a capacidade de proliferação das células precursoras hematopoiéticas. Infelizmente são poucos os estudos que avaliaram a atividade da SOD no TCPH e nenhum deles abordou a associação com a enxertia. No entanto, a suposta proteção dos precursores hematopoiéticos pela ação da SOD já foi confirmada em um estudo experimental realizado por Petkau⁽⁷¹⁾, em que a infusão intravenosa de compostos contendo SOD acelerou a recuperação hematológica em camundongos submetidos a radiação ionizante. A participação da enzima no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo celular já foi comprovada por meio de análises “in vitro”, onde foi demonstrado que a SOD inibe

a lesão do DNA celular provocada pelo radical hidroxil e mediada pelo ferro, o que sugere também a participação do radical superóxido no processo de agressão celular ⁽⁷²⁾.

A determinação da metaemoglobina foi selecionada no presente estudo como parâmetro de avaliação do processo oxidativo celular eritrocitário. Não existem relatos de determinações de metaemoglobina em pacientes submetidos a TCPH; no entanto, concentrações elevadas desse parâmetro já foram documentadas em outras situações que cursam estresse oxidativo eritrocitário, como na doença falciforme ⁽⁷³⁾. Nossos resultados sugerem que a concentração de metaemoglobina pode ter sido influenciada pela atividade da SOD, pois quando os valores da enzima estiveram elevados, como no período peri-transplante, a concentração de metaemoglobina pouco se alterou. A remoção do radical superóxido, que é um elemento importante na oxidação e conversão da oxihemoglobina em metaemoglobina, pode justificar o efeito protetor da SOD contra a oxidação do eritrócito ⁽¹⁸⁾. Porém, após seis meses de transplante, observou-se normalização dos valores de SOD concomitantemente à elevação mais pronunciada da concentração de metaemoglobina. Nessa fase, é possível que a elevação da concentração da metaemoglobina tenha refletido a vulnerabilidade do eritrócito à oxidação decorrente da menor atividade da SOD e da exposição ao ferro provindo das transfusões. De fato, estudos “in vitro” já demonstraram que eritrócitos humanos submetidos a estresse oxidativo extracelular mediado pelo ferro cursam com oxidação da hemoglobina e elevação da concentração de metaemoglobina ⁽⁷⁴⁾.

Nossos resultados confirmam, em parte, a suposição de outros autores quanto aos efeitos deletérios do estresse oxidativo na evolução clínica do TCPH e apoiam a implementação de medidas terapêuticas antioxidantes. Em modelos animais, foi demonstrado que a administração de α -tocoferol (vitamina E) preveniu e inibiu a peroxidação lipídica no plasma induzida por sobrecarga de ferro ⁽¹⁷⁾. Da mesma forma, a aplicação tópica de vitamina E nas lesões orais decorrentes de mucosite em pacientes submetidos à quimioterapia por diversos tipos de neoplasias foi eficaz em promover rápida resolução do processo ⁽⁷⁵⁾. Benefícios também foram relatados com a utilização de glutamina em pacientes submetidos a TCPH, provavelmente devido às propriedades antioxidantes desse aminoácido. Assim, constatou-se redução do número de infecções e menor tempo de internação nos doentes transplantados que receberam a formulação parenteral de glutamina ⁽⁷⁶⁾, e maior alívio da dor relacionada a mucosite com menor necessidade de analgésicos opióides nos receptores de autotransplante que receberam a suplementação oral com glutamina ⁽⁷⁷⁾.

O TCPH é uma modalidade terapêutica cada vez mais utilizada e indicada para diversas doenças. No entanto, mesmo com os avanços científicos na área, o sucesso do transplante é em grande parte limitado pela toxicidade e mortalidade inerentes ao procedimento. O presente estudo procurou explorar dois aspectos pouco considerados, porém muito relacionados ao desenvolvimento dessas complicações: a sobrecarga de ferro e o estresse oxidativo. Nossos resultados mostram que ambos os eventos ocorrem de forma aguda após a quimioterapia de altas doses e tendem a se normalizar após seis meses de transplante. Revelamos também o impacto dessas alterações na recuperação hematológica, na toxicidade

e na mortalidade após o transplante, além da influência exercida pelo histórico transfusional e terapêutico dos pacientes nos parâmetros estudados. A corroboração de fatos já observados na literatura e a apresentação de resultados novos e relevantes fazem com que nosso estudo integre o quadro de evidências que sustentam a importância da avaliação rotineira dos parâmetros relacionados à sobrecarga de ferro e ao estresse oxidativo no TCPH. Acreditamos que os resultados aqui obtidos, associados aos de outros trabalhos que abordaram o mesmo tema, representam justificativas suficientes para a elaboração de estudos que determinem o benefício de medidas profiláticas ou terapêuticas para a sobrecarga de ferro e o estresse oxidativo no TCPH.

5. CONCLUSÕES

1. Com base nos resultados obtidos pela análise laboratorial da sobrecarga de ferro e do estresse oxidativo, conclui-se que ambos os eventos ocorrem precocemente e de forma aguda após a quimioterapia de altas doses utilizada para TCPH alogênicos e autogênicos.
2. A quimioterapia de altas doses é a maior responsável pelas alterações observadas, uma vez que a maioria dos parâmetros analisados retorna aos valores basais após 6 meses de transplante.
3. O número elevado de transfusões prévias e a realização de quimioterapia anterior ao TCPH são antecedentes clínicos que estão associados à elevação dos parâmetros basais de sobrecarga de ferro e à maior intensidade do estresse oxidativo no pós-transplante.
4. A sobrecarga de ferro e o estresse oxidativo estão inversamente relacionados à recuperação hematológica pós-TCPH, o que possibilita a utilização desses parâmetros como marcadores de enxertia.
5. A presença de sobrecarga de ferro na fase precoce do TCPH está associada à maior incidência de toxicidade grau III ou IV em pacientes transplantados em remissão completa e à maior mortalidade relacionada ao transplante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988;240:1302-9.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzimol* 1990;186:1-85.
3. Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis* 1993;23 Supl 1:118-26.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:501-14.
5. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
6. Darley-Usmar V, Halliwell B. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 1996;13:649-62.
7. Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 2001;55:333-9.

8. Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 1986;107:401-4.
9. Dunford HB. Free radicals in iron-containing systems. *Free Radic Biol Med* 1987;3:405-21.
10. Mello Filho AC, Hoffmann E, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J* 1984;218:273-5.
11. Breimer LH. Repair of DNA damage induced by reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun* 1991;14:159-71.
12. Ames BN, Cathcart R, Schwires E. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical- caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6858-62.
13. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998;44:1309-15.

14. Dürken M, Herrnring C, Finckh B, Nagel S, Nielsen P, Fischer R, et al. Impaired plasma antioxidative defense and increased nontransferrin-bound iron during high-dose chemotherapy and radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:887-94.
15. Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Gramignamo G, et al. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. *J Cell Mol Med* 2002;6:570-82.
16. Hershko C. Mechanisms of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Sem Hematol* 1989;26:277-85.
17. Galleano M, Puntarulo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:321-6.
18. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Method Enzimol* 1990;186:265-72.
19. Naoum PC. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Bol Soc Bras Hematol Hemot* 1996;18:75-81.

20. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997;43:61-8.
21. Halliwell B, Chirico S, Kaur H, Aruoma OI, Grootveld M, Blake DR. Application of new assays for measuring free radical production to human rheumatoid patients. In: Davies KJA, editor. *Oxidative damage and repair*. Oxford: Pergamon Press; 1992. p. 846-55.
22. Bolli R, Hartley CJ, Rabinovitz RS. Clinical relevance of myocardial stunning. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:877-90.
23. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Choo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 1989;320:915-24.
24. Parks DA. Oxygen radicals; mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989;30:293-8.
25. Hall ED, Braugher JM. Central nervous system trauma and stroke: physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1989;6:303-38.

26. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992;59:1609-23.
27. Kalyanaraman B, Nemec J, Sinha BK. Characterization of free radicals produced during oxidation of etoposide (VP-16) and its catechol and quinone derivatives. An ESR study. *Biochemistry* 1989;28:4839-46.
28. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radical and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Ver* 1997;23:209-40.
29. Pippard MJ, Hoffbrand AV. Iron. In: Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD, editores. *Postgraduate hematology*. 4^a ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999. p. 23-46.
30. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology* 2003: 40-61.
31. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Eng J Med* 1999;341:1986-95.
32. Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 1998;83:447-55.

33. Brittenham GM, Weiss G, Brissot P, Lainé F, Guillygomarc'h A, Guyader D, et al. Clinical consequences of new insights in the pathophysiology of disorders of iron and heme metabolism. *Hematology* 2000: 39-50.
34. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Eng J Med* 1999;341:99-109.
35. Naoum PC, Naoum FA. Doença das células falciformes. 1^a ed. São Paulo: Sarvier; 2004.
36. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology* 2001:47-61.
37. Brittenham GM, Sheth S, Allen CJ, Farrell DE. Noninvasive methods for quantitative assessment of transfusional iron overload in sickle cell disease. *Semin Hematol* 2001;38 Supl 1:37-56.
38. Brittenham GM, Cohen AR, McLauren CE, Martin MB, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major. *Am J Hematol* 1993;42:81-5.

39. Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A, et al. Survival in medically treated patients with homozygous β -thalassemia. *N Eng J Med* 1994;331:574-8.
40. Finch CA, Bellotti V, Stray S, Lipschitz DA, Cook JD, Pippard MJ, et al. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J Med* 1986;145:657-63.
41. Porter JB. Monitoring and treatment of iron overload: state of the art and new approaches. *Semin Hematol* 2005;42 Supl 1:14-8.
42. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;ii:1366-9.
43. Horowitz MM. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 3^a ed. Oxford: Blackwell publishing 2004. p. 9-15.
44. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Eng J Med* 1994;330:827-38.
45. CIBMTR. Annual report: january – december 2005. 2005; www.cibmtr.org/ABOUT/annual_report.pdf

46. Schmitz N. Peripheral blood hematopoietic cells for allogeneic transplantation. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editores. Thomas' hematopoietic cell transplantation. 3^a ed. Oxford: Blackwell publishing 2004. p. 588-98.
47. Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, et al. Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet* 2000;355:1231-7.
48. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematological cancers. *N Eng J Med* 2001;344:175-81.
49. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fisher LD, Clift RA, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1988;6:1562-8.
50. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Eng J Med* 1998;338:1741-51.

51. Sullivan KM. Graft-vs-host disease. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editores. Thomas' hematopoietic cell transplantation. 3^a ed. Oxford: Blackwell publishing 2004. p. 635-64.
52. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991;28:250-9.
53. Evens AM, Mehta J, Gordon LI. Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:561-71.
54. Tomás JF, Pinilla I, García-Buey ML, García A, Figuera A, Gómez-García de Soria V. Long-term liver dysfunction after allogeneic bone marrow transplantation: clinical features and course in 61 patients. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:649-55.
55. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 1982;5:649-55.
56. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for

prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Eng J Med* 1986;314:729-35.

57. Naoum PC, Radispiel J, Moraes MS. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2004;26:19-22.

58. Sakiyama M, Kami M, Hori A, Imataki O, Hamaki T, Murashige N, et al. Regimen-related toxicity following reduced-intensity stem-cell transplantation (RIST): comparison between Seattle criteria and national cancer center common toxicity criteria (NCI-CTC) version 2.0. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:787-94.

59. Przepiorka D, Weisdork D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-8.

60. Gordon LI, Brown SG, Tallman S, Rademaker AW, Weitzman SA, Lazarus HM, et al. Sequential changes in serum iron and ferritin in patients undergoing high-dose chemotherapy and radiation with autologous bone marrow transplantation: possible implications for treatment related toxicity. *Free Radic Biol Med* 1995;18:383-9.

61. Dürken M, Nielsen P, Knobel S, Finckh B, Herrnring C, Dresow B, et al. Nontransferrin-bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1159-63.
62. Sahlstedt L, Ebeling F, von Bonsdorf L, Parkkinen J, Ruutu T. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;113:836-8.
63. Bradley SJ, Gosriwitana I, Srichairatanakool S, Hider RC, Porter JB. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Hematol* 1997;99:337-43.
64. Carmine TC, Evans P, Bruchelt G, Evans R, Handgretinger R, Niethammer D, et al. Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. *Cancer Lett* 1995;94:219-226.
65. Lee MH, Means RT. Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. *Am J Med* 1995;98:566-71.

66. Altès A, Remacha AF, Sureda A, Martino R, Briones J, Canals C, et al. Iron overload might increase transplant-related mortality in haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:987-9.
67. McKay PJ, Murphy JA, Cameron S, Burnett AK, Campbell M, Tansey P, et al. Iron overload and liver dysfunction after allogeneic or autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:63-6.
68. Dürken M, Agbenu J, Finckh B, Hübner C, Pichlmeier U, Zeller W, et al. Deteriorating free radical-trapping capacity and antioxidant status in plasma during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:757-62.
69. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006;12:446-51.
70. Cetin T, Arpacı F, Yılmaz MI, Sağlam K, Öztürk B, Komurcu S. Oxidative stress in patients undergoing high-dose chemotherapy plus peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Trace Elem Res* 2004;97:237-47.
71. Petkau A. Protection of bone marrow cells by superoxide dismutase. *Mol Cell Biochem* 1988;84:133-40.

72. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* 1989;264:20509-12.
73. Naoum PC, Souza PC. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da HbS nos genótipos SS,SF (S/ β^0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. *J Bras Patol Med Lab* 2004;40:249-59.
74. Rice-Evans C, Baysal E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. *Biochem J* 1987;244:191-6.
75. Wadleigh RG, Redman RS, Graham ML, Krasnow SH, Anderson A, Cohen MH. Vitamin E in the treatment of chemotherapy-induced mucositis. *Am J Med* 1992;92:481-4.
76. Ziegler TR. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. *J Nutr* 2001;131:2578S-84S.
77. Anderson PM, Ramsay NKC, Shu XO, Rydholm N, Rogosheske J, Nicklow R. Effect of low-dose oral glutamine on painful stomatitis during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:339-44.

7. APÊNDICES

APÊNDICE I

Características clínicas e parâmetros de sobrecarga de ferro nos 21 pacientes submetidos a TCPH.

Paciente	Sexo	Idade	Tipo TCPH	Doença	Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)				Saturação da transferrina (%)				Ferritina sérica (ng/mL)			
					pré-TCPH	D0	D+14	6 meses	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses
1	M	47	ALO	LMC	42	214	180	137	15	90	91	65	83	412	608	725
2	M	48	AUTO	LH	90	229	112	99	35	88	38	35	1067	1081	1522	770
3	F	19	ALO	SMD	63	430	232	216	12	86	88	90	7	292	1141	1114
4	M	50	AUTO	LNH	58	243	196	98	21	83	84	38	188	259	978	324
5	F	46	ALO	LLA	164	146	148	152	83	82	83	98	713	1608	2163	2247
6	F	32	ALO	LMC	149	211	171	95	56	47	66	42	483	906	3337	605
7	F	57	ALO	LMC	76	203	171	127	25	57	89	52,3	36	113	301	919
8	M	47	AUTO	LNH	225	210	114		92	42	50		1242	1159	1638	
9	F	40	ALO	LLA	149	238	252		57	87	88		2274	18094	4892	
10	F	38	ALO	LLA	135	159	127		61	95	91		531	1316	4233	
11	M	38	ALO	LLA	141	156	177	40	74	84	90	30	1791	3029	1779	1326
12	F	41	AUTO	LNH	68	229	86	82	23	87	35	30	354	388	882	276
13	M	34	ALO	LLA	46	185	162		19	90	83		521	657	579	
14	M	17	ALO	LMA	91	171	146	118	30	74	95	55	500	495	1160	810
15	F	51	ALO	LMC	27	121	78	85	8	38	42	33	25	88	769	540
16	M	55	AUTO	MM	112	223	82	49	42	95	38	20	127	206	1736	252
17	M	35	ALO	MF	55	136			27	92			619	599		
18	M	25	ALO	LMC	107	185	190		39	82	77		263	1036	1009	
19	F	24	ALO	LLA	215	223	127		99	92	65		544	1363	783	
20	M	58	ALO	LMA	51	215	57	81	15	66	22	28	663	536	1096	871
21	M	25	ALO	LMA	90	196	195		37	79	60		1343	1887	2586	

APÊNDICE II

Parâmetros de estresse oxidativo nos 21 pacientes submetidos a TCPH.

Paciente	<u>Ácido úrico (mg/dL)</u>				<u>Albumina (g/dL)</u>				<u>Metaemoglobina (%)</u>				<u>SOD (U/gHb)</u>			
	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses	pré-TCPH	D0	D+14	6 meses
1	5,4	3,6	1,7	7,5	3,7	3,3	2,7	3,9	2,4	2,3	2,8	2,63	59,2	222,4	770	793,9
2	5,4	4,4	4	5,7	4,3	3,8	3,3	4,6	3,4	3,1	3,3	3,5	840	2951	1787	381,8
3	2,9	1,1	2,1	5,3	3,8	3,9	3,4	3,4	2,6	3,3	2,93	4,39	1264	312,4	1039	636,8
4	4,9	3,1	2,2	6,7	3,9	3,3	2,3	3,9	2,7	3,3	3,35	4,18	1610,8	1259	1471	526,8
5	2,7	1,9	1,6	7,6	3,3	3	3,3	3,4	2,9	2,8	3	3,7	3463,8	744,2	1283	381,1
6	5,8	3,1	4,3	4,7	3,8	3,1	3,5	3,8	2,7	2,4	3,4	3,18	278,1	253,2	1291	425
7	3,8	1,9	0,9	9,6	3,8	3,9	2,8	4,1	2,5	2,4	3	3,38	687,1	807,5	647	415,5
8	3,5	2,5	2,2		3,2	3,5	3		3,25	2,2	3		647,5	566,3	456	
9	3,3	1,5	1,5		3,8	3,5	3,9		2,32	2,2	2,23		585,7	564,2	821	
10	2,1	1,3	1		3,4	3,2	2,5		2,36	1,3	2,46		934,4	1036	996	
11	5,6	3,3	2,7	4,3	3,8	3,5	3,4	3,7	2,6	2,8	2,43	3,4	1062,8	800,9	729	363
12	3	2,8	3	4,1	3,7	3,5	3,3	4,2	3,04	3,5	2,86	3,5	1196	1559	1917	745,4
13	4,8	1,8	1,3		3,8	3,2	2,7		2,55	2,9	3,22		1626	737,7	885	
14	5,4	4,3	2,2	5,4	4,5	4,1	3,3	4,1	3,6	2,9	3,58	3,4	369,2	636,9	823	546,5
15	4,1	3,3	1,4	5,2	3,8	3,9	2,8	3,8	2,82	2,9	2,41	3,65	1295,6	1208	1502	864,4
16	7,8	6,9	4,1	6,6	3,5	3,3	2,9	4,1	3,08	2,8	2,46	3,8	751,8	732	833	600,9
17	7,5	6,1			4	3,6			5,96	4,9			668,5	624,1		
18	5,2	2,5	1,2		3,8	3,3	3,5		5,03	3,1	2,99		659,5	985,7	976	
19	2,7	7,3	1,1		2,8	3,7	3		2,28	2,9	3,02		380,7	778,7	516	
20	7,1	5,7	3,4	7,5	3,9	4,2	3,2	3,8	3,18	2,7	2,62	3,02	1009,1	492,5	288	
21	5,7	5	2,9		4,2	3,9	2,2		2,34	2,6	2,55		590,2	297,1	310	