CARLA ROSA TEIXEIRA DE GODOY

**Genes hSecurina e VEGF e células endoteliais circulantes
como marcadores de angiogênese em portadores de
leucemia mielóide crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pereira

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Godoy, Carla Rosa Teixeira de

Genes hSecurina e VEGF e células endoteliais circulantes como marcadores de angiogênese em portadores de leucemia mielóide crônica / Carla Rosa Teixeira de Godoy. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientadora: Juliana Pereira.

Descritores: 1.Fator de crescimento do endotélio vascular 2.hSecurina 3.Células endoteliais 4.Leucemia mielóide crônica 5.Neovascularização fisiológica

USP/FM/DBD-273/11

***“Todo grande progresso da ciência
resultou de uma nova audácia da
imaginação”***

John Dewey

*Dedico este trabalho aos meus pais e amigos **Luiz Carlos** e **Lícia**; sem vocês nenhum sonho seria possível e não valeria a pena, a vocês minha eterna gratidão.*

AGRACEDIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Juliana Pereira**, exemplo de dedicação e fortaleza, que muito sabiamente me amparou nos momentos difíceis e comemorou cada sucesso de nossa pesquisa. À você minha imensa gratidão.

À **Dra. Ana Luisa Langanke**, a quem tanto admiro e me ajudou a escrever meu primeiro artigo científico.

À **Dra. Beatriz Beitler**, que me mostrou as virtudes e o encanto da verdadeira medicina.

À **Dra. Gracia Martinez**, que tanto adoro e admiro, agradeço pelo incentivo e compreensão nos momentos difíceis.

Ao amigo **Dr. Milton Ruiz**, por ter me incentivado a ingressar na Biomedicina quando eu tinha apenas 17 anos.

À amiga **Graciela Brocardo** pela sabedoria e incentivo nos momentos de desânimo da pesquisa, obrigada por tudo.

Às amigas **Lis Vilela** e **Fernanda Fava**, que trabalharam muito no laboratório para que a conclusão da pesquisa fosse possível, a vocês todo meu carinho e gratidão.

À amiga **Lucilla**, carinhosamente chamada de Dona Lú, pelo incentivo nos momentos de desânimo.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Bidlowyski** que abriu as portas do laboratório de pesquisa para meu aprendizado em biologia molecular, e me ensinou que simplicidade e competência caminham juntas.

À **Linah** e principalmente à **Débora Levy** que, com muita descontração, sabedoria e competência me ensinaram as técnicas de biologia molecular, muito obrigada. À **Cléide** que tanto me auxiliou na configuração da dissertação.

À amiga **Renata de Oliveira**, a quem chamo carinhosamente de Rê, que me incentivou a fazer o mestrado.

À toda a equipe da pesquisa clínica do Hospital Dia da Hematologia que, com muita competência, ajudou na seleção dos pacientes da pesquisa.

À **Rose, Luciana, Eduardo e Emerson**, em meio ao tumulto do Hospital Dia, gentilmente coletaram várias amostras de pacientes para que a pesquisa se concretizasse.

À **Lígia, Priscila e Elaine** da secretaria do Hospital Dia que me ajudaram com os prontuários dos pacientes.

Ao Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo apoio financeiro, imprescindível para realização deste projeto.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro, imprescindível para realização da pesquisa.

Ao **Dr. Luis Pracchia** e **Profa. Viviana** pelo apoio nas análises estatísticas do trabalho.

À **Therezinha dos Anjos** pela orientação em todos os processos iniciais da pós-graduação.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial **Angélica** e **Rose**, pela atenção dispensada em todos os momentos da pós-graduação.

À pós-graduanda e amiga **Mariclea** pelo auxílio no estudo em um segmento da pesquisa.

À **Katia**, carinhosamente chamada de Katita que se colocou à disposição para resolver detalhes importantes para realização da qualificação.

Aos meus pais **Luiz Carlos** e **Lícia**, a quem tanto amo, e que com seu amor incondicional me mostraram que, com simplicidade, educação e responsabilidade conseguimos o impossível.

À minha irmã e amiga **Andréia Rosa**, a quem chamo cariosamente de Dedé, mesmo não sendo da área da saúde me ouviu apresentar a aula para qualificação e defesa inúmeras vezes. Você é muito importante na minha vida irmã, te amo.

Ao meu marido, amigo e metade essencial **João Carlos**, a quem tanto amo e admiro, e que me deu força e incentivo nos momentos mais difíceis da pesquisa, a você toda minha gratidão.

Aos meus amigos irmãos **Regiane** e **Ivan**, a quem tanto amo, que trouxeram ao mundo o meu afilhado maravilhoso, e se importaram comigo em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido afilhado **Luan**, que compreendeu minha ausência nos momentos difíceis da pesquisa, te amo.

Aos meus avós maternos **Maria** e **Almerindo**, de quem lembro com saudade, e que estiveram presentes na minha infância querida.

Ao meu avô paterno **José Godoy** que me ensinou que idade não é o limite do aprendizado, saudade.

À minha avó paterna **Conceição**, com seu jeitinho doce, que sempre me mostrou que a religião nos dá sabedoria em todos os momentos.

Aos meus tios **José Carlos** e **Aloísio** pela presença marcante nos momentos de vitória, amo vocês.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografia. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Leucemia mielóide crônica (LMC): Histórico.....	8
2.1.1 Definição.....	12
2.1.2 Etiologia.....	12
2.1.3 Base genética da LMC.....	13
2.1.3.1 ABL.....	13
2.1.3.2 BCR.....	14
2.1.3.3 Proteína BCR-ABL.....	15
2.1.4 Epidemiologia.....	19
2.1.5 Características morfológicas.....	20
2.1.5.1 Fase crônica.....	20
2.1.5.2 Fase acelerada.....	22
2.1.5.3 Crise blástica.....	23
2.1.6 Evolução citogenética e prognóstico.....	24
2.1.7 Tratamento.....	25
2.2 História do sistema vascular.....	26
2.2.1 Vasculogênese e angiogênese.....	27

2.2.2 Células endoteliais circulantes.....	29
2.2.3 Caracterização fenotípica das CECs.....	30
2.2.4 Angiogênese e LMC.....	33
2.3 Ação da hSecurina na separação das cromátides irmãs.....	34
2.3.1 hSecurina e LMC.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
4. MÉTODOS.....	40
4.1 Casuística.....	41
4.1.1 Critérios de seleção para os grupos estudados.....	42
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Citometria de fluxo.....	43
4.2.1.1 Processamento da amostra.....	43
4.2.1.2 Validação dos anticorpos monoclonais.....	45
4.2.1.3 Aquisição das amostras em citômetro de fluxo.....	47
4.2.1.4 Estratégias de identificação das CECs.....	49
4.2.2 Biologia molecular.....	52
4.2.2.1 Separação celular.....	52
4.2.2.2 Congelamento celular.....	53
4.2.2.3 Extração de RNA.....	53
4.2.2.4 Tratamento do RNA com DNase.....	54
4.2.2.5 Cultura celular da linhagem KG1.....	55
4.2.2.6 PCR em tempo real.....	55
4.3 Análise estatística.....	57
5. RESULTADO.....	59

5.1 Células Endoteliais Circulantes.....	63
5.2 Análise da eficiência do PCR em tempo real.....	68
5.2.1 hSecurina, VEGF e GUSB.....	68
5.3 VEGF.....	69
5.4 hSecurina.....	71
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	77
8. ANEXOS.....	80
9. REFERÊNCIAS.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
APC	Aloficocianina
APC/C	Complexo promotor da anáfase/ciclossoma
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CB	Crise blástica
CD	Grupos de diferenciação
CE	Célula endotelial
CEC	Célula endotelial circulante
CEM	Célula endotelial madura
CEP	Célula endotelial precursora
CSF	Fator estimulante de colônias
DEPC	Dietilpirocarbonato
EBSS	Solução salina balanceada de Earle's
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI	Equipamento de proteção individual
FA	Fase acelerada
FC	Fase crônica
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos

FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersão frontal da luz
g	Gravitacional
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	Antígeno leucocitário humano
HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical humana
IFN	Interferon
IMF	Intensidade média de fluorescência
ITK	Inibidor de tirosina quinase
Kb	Kilobase
Kd	Quilodaltons
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar

Mm³	Milímetros cúbicos
MMPs	Metaloproteína da matriz
MO	Medula óssea
ng	Nanograma
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	Tampão salina tamponada com fosfato
PC5	Ficoeritrina conjugada com cy5
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
Ph	Cromossomo Filadélfia
PTTG	Gene transformador de tumor pituitário
q	Braço longo do cromossomo
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RNA_m	RNA mensageiro
RPMI	Instituto <i>Memorial Roswell Park</i>
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa por reação em cadeia da polimerase
Seg	Segundos
SF	Solução fisiológica

SG	Sobrevida global
SSC	Dispersão lateral da luz
t	Translocação
TA	Temperatura ambiente
TdT	Terminal transferase
TK	Tirosina quinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Monografia do Dr. Bennett sobre leucocitemia (1852), na qual descreveu casos estudados por ele.....	9
Figura 2 -	Nowell, Hungerford e o cromossomo Filadélfia, 1960.....	11
Figura 3 -	Esquema ilustrativo da translocação entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo Filadélfia.....	18
Figura 4 -	Resultado do exame cariótipo BCR-ABL demonstrando a t(9;22).....	18
Figura 5 -	Resultado do exame FISH demonstrando a fusão dos genes BCR-ABL representado pela junção das cores verde e vermelha (seta branca). As imagens nas cores separadas verde e vermelha representam os genes BCR e ABL, respectivamente (seta amarela).....	19
Figura 6 -	Observe o aumento no número de granulócitos segmentados em esfregaço de sangue periférico de paciente na FC da LMC.....	21
Figura 7 -	Observe o aumento no número de basófilos em esfregaço de sangue periférico de paciente na FA da LMC.....	23

Figura 8 -	Observe o aumento de células blásticas em esfregaço de sangue periférico de paciente na CB da LMC.....	24
Figura 9 -	Descrição esquemática da identificação fenotípica celular pelo uso de anticorpos monoclonais diretamente conjugados a fluorocromos que se ligam ao “ <i>Cluster Designation</i> ” (epítomos) específicos.....	31
Figura 10 -	Esquema demonstrando o processo de separação das cromátides irmãs que se inicia com ativação do APC pelo CDC20 que, por sua vez, degrada a securina clivando e dissociando o complexo de coesão.....	35
Figura 11 -	Representação esquemática da disposição dos AcMo em seus respectivos tubos.....	44
Figura 12 -	Lâmina preparada por citocentrifugação contendo células de linhagem endotelial humana (HUVEC) coradas com Leishman e observadas em microscópio óptico.....	46
Figura 13 -	Histograma de FL1 VS número de células evidenciando expressão positiva dos antígenos CD133 (A), CD146 (B) e CD62e (C) em células HUVEC.....	47

Figura 14 -	Citograma bidimensional em dot plot de FSC VS SSC ilustrando a região R1 (A) realizada para excluir plaquetas e células mortas e (B) CD45 vs SSC evidenciando a região R2 que delimita células CD45 fracas e/ou negativas em pacientes com LMC em FC (localização de CECs).....	50
Figura 15 -	Citogramas bidimensionais em escala logarítmica do tipo dot plot ilustrando à esquerda os controles isotípicos IgG sem marcador excluindo pelo menos 98% da população negativa e à direita, representação de população de CEPs (A1), CEC ativaas (B1) e CEM (C1).....	51
Figura 16 -	Gel de agarose a 0,8% dos RNAs extraídos de pacientes com LMC (1 a 8) para avaliação da integridade do RNA.....	54
Figura 17 -	Distribuição dos grupos avaliados para CEC.....	60
Figura 18 -	Distribuição dos grupos avaliados para os genes hSecurina e VEGF.....	61
Figura 19 -	Curva de eficiência para o gene hSecurina.....	68
Figura 20 -	Curva de eficiência para o gene VEGF.....	69
Figura 21 -	Curva de eficiência para o gene endógeno GUSB.....	69

Tabela 1 -	Variantes moleculares do BCR-ABL e associações clínico-patológicas.....	16
Tabela 2 -	Casuística.....	41
Tabela 3 -	Critérios de seleção para os grupos estudados.....	42
Tabela 4 -	Anticorpos monoclonais utilizados para identificação das CECs.....	45
Tabela 5 -	Caracterização das populações de CECs.....	50
Tabela 6 -	Medidas-resumo de idade (anos) dos indivíduos estudados para CECs, segundo grupo.....	62
Tabela 7 -	Medidas-resumo de idade (anos) dos indivíduos estudados para os genes hSecurina e VEGF, segundo grupo.....	63
Tabela 8 -	Análise das aquisições em duplicata das CEP e CEM dos grupos estudados.....	65
Tabela 9 -	Análise da quantificação das CECs e subtipos, em portadores de LMC e grupo saudável.....	66
Tabela 10 -	Valores de Normalidade de CECs e subtipos, segundo grupo saudável.....	67
Tabela 11 -	Valores de mediana e desvio-padrão dos grupos estudados para o gene VEGF.....	70

Tabela 12 -	Análise do gene VEGF nos portadores de LMC e grupo saudável.....	70
Tabela 13 -	Valores de mediana e desvio-padrão dos grupos estudados para o gene hSecurina.....	71
Tabela 14 -	Análise do gene hSecurina nos portadores de LMC e grupo saudável.....	72

Godoy CRT. Genes hSecurina e VEGF e células endoteliais circulantes como marcadores de angiogênese em portadores de leucemia mielóide crônica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 145p.

INTRODUÇÃO: O impacto do aumento de expressão do fator de crescimento endotelial no curso da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) ainda é desconhecido, porém há relatos de que estes pacientes apresentam maior densidade vascular em medula óssea do que em indivíduos saudáveis, principalmente em crise blástica. Outro fator recentemente associado ao aumento da angiogênese é a expressão anormal da proteína hsecurina, que, por sua vez, inibi uma protease denominada separase, responsável pela separação das cromátides irmãs durante a anáfase da mitose. Por esses motivos, quantificamos células endoteliais circulantes e VEGF em portadores de LMC como marcador de angiogênese e expressão do gene hsecurina.

MÉTODOS: Realizamos análise prospectiva e consecutiva de uma coorte de 31 pacientes com LMC em fase crônica ao diagnóstico, 23 em crise blástica, 30 em fase acelerada, atendidos no ambulatório de Hematologia da FMUSP e 50 indivíduos saudáveis, doadores de plaquetas por aférese, para quantificação da porcentagem de células endoteliais circulantes e subtipos pelo método de citometria de fluxo no laboratório de Imunopatologia HC/FMUSP. Desta coorte 25 pacientes em fase crônica, 14 em crise blástica, 26 em fase acelerada e 32 indivíduos saudáveis foram analisados para os genes hsecurina e VEGF por PCR quantitativo em tempo real.

RESULTADOS: A mediana da porcentagem das células endoteliais circulantes foi de 0,0146% em LMC em crise blástica e 0,0059% no grupo controle, $p < 0,01$ às custas das células endoteliais maduras ($p < 0,01$). A mediana de células endoteliais circulantes em crise blástica foi de 0,0146%, superior à da fase acelerada (0,0059%), $p < 0,01$ com predomínio de células endoteliais maduras ($p < 0,01$). Em relação à expressão do gene VEGF observamos aumento estatisticamente significativo nas fases crônica ($p < 0,01$), acelerada ($p < 0,01$) e crise blástica ($p = 0,04$). Encontramos aumento significativo da expressão do gene hsecurina na crise blástica da doença, com mediana de 0,390 em relação aos grupos controle com mediana de 0,125 ($p < 0,01$) e fase acelerada, com mediana de 0,230 ($p = 0,04$). Os pacientes na fase crônica da doença apresentaram mediana de 0,260 e $p = 0,03$ quando comparados com o grupo controle.

CONCLUSÃO: Observamos neste estudo que a quantificação de CEC é uma ferramenta útil para prever e identificar precocemente a progressão da LMC para fase blástica, diferentemente da variável VEGF que foi elevado em todas as fases da doença. A expressão do gene hSecurina na fase crônica da doença foi significativamente alta, demonstrando provável relação com a elevação da taxa de proliferação celular. Entretanto, estudos complementares do gene hSecurina deverão ser realizados na crise blástica da LMC, para entendermos com precisão o real significado nesta fase da doença.

Descritores: Fator de crescimento do endotélio vascular, hSecurina, Células endoteliais, Leucemia mielóide crônica, Neovascularização fisiológica

Godoy CRT. hSecurin and VEGF genes and circulating endothelial cells as markers of angiogenesis in patients with chronic myeloid leukemia [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 145p.

INTRODUCTION: The impact of the increased expression of vascular endothelial growth factor in the course of chronic myeloid leukemia (CML) is still unknown, but there are reports that those patients have higher vascular density in bone marrow than healthy individuals, particularly in blast crisis. Another factor recently associated with increased angiogenesis is the abnormal expression of protein hSecurin, which, in turn, inhibits a protease called separase, responsible for the separation of sister chromatids during the anaphase of mitosis. For these reasons, we quantified circulating endothelial cells and VEGF in patients with CML as a marker of angiogenesis and hSecurin gene expression. **METHODS:** We performed a prospective analysis of consecutive cases in a cohort of 31 patients with CML in chronic phase at diagnosis, 23 in blast crisis, 30 in accelerated phase who attended the outpatient Hematology FMUSP ward, and 50 healthy subjects, platelet apheresis donors, for quantification of the percentage of circulating endothelial cells and subtypes through the flow cytometry method, at HC/FMUSP Immunopathology laboratory. In this cohort, 25 patients in chronic phase, 14 in blast crisis, 26 in accelerated phase, and 32 healthy subjects were tested for the genes VEGF and hSecurin by quantitative real-time PCR. **RESULTS:** The median percentage of circulating endothelial cells was 0.0146% in CML in blast crisis and 0.0059% in the control group, $p < 0.01$ at the expense of mature endothelial cells ($p < 0.01$). The median circulating endothelial cells in blast crisis was 0.0146% higher than in accelerated phase (0.0059%), $p < 0.01$ with predominance of mature endothelial cells ($p < 0.01$). Regarding the expression of the VEGF gene, a statistically significant increase was observed in chronic phase ($p < 0.01$), accelerated ($p < 0.01$) and blast crisis ($p = 0.04$). We found a significant increase in hSecurin gene expression in blast crisis disease, with a median of 0.390 compared to control groups, with a median of 0.125 ($p < 0.01$) and accelerated phase, with a median of 0.230 ($p = 0.04$). Patients with chronic disease had a median of 0.260 and $p = 0.03$ compared with the control group. **CONCLUSION:** In this study, we observed that the quantification of CPB is a useful tool to predict and identify the early progression of CML to blast phase, unlike the VEGF variable, which was elevated in all stages of the disease. The expression of hSecurin gene in chronic phase was significantly higher, demonstrating a likely relationship with the increased cell proliferation rate. However, further studies of hSecurin gene should be made in the blastic crisis of CML to understand precisely the real meaning at this stage of the disease.

Descriptors: Vascular endothelial growth factor, hSecurin, Endothelial cells, Chronic myeloid leukemia, Neovascularization physiologic

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença clonal da célula tronco hematopoiética, que resulta em hiperplasia da série eritróide, granulocítica e megacariocítica na medula óssea (MO), e representa 15% das leucemias de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008). Embora seja diagnosticada com maior frequência em indivíduos em torno dos 53 anos de idade, todos os grupos de idade, inclusive crianças, podem manifestá-la (Sawyers, 1999).

A história natural da LMC segue padrão bifásico caracterizado por uma fase crônica (FC) inicial assintomática seguida de progressão para a fase acelerada (FA) e crise blástica (CB). Na FC, o compartimento mielóide é expandido, porém a diferenciação e a função celular estão preservadas e o tratamento é eficaz. Entretanto, na CB há perda da capacidade de diferenciação celular e refratariedade à terapia, com surgimento de novas anormalidades citogenéticas em 80% dos pacientes (Huntly et al., 2003).

O diagnóstico de LMC deve ser corroborado pela detecção do cromossomo Filadélfia (Ph) por citogenética, o qual é observado em 95% dos casos ou pela detecção do rearranjo dos genes BCR-ABL por biologia molecular (Nowell e Hungerford, 1960; Sawyers, 1999).

O cromossomo Ph foi descrito inicialmente em 1960 e a translocação (9;22) em 1973 por Janet D. Rowley (Nowell e Hungerford, 1960; Rowley, 1973). A translocação (9;22) (q34;q11) é balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, envolvendo o proto-oncogene Abelson (ABL) do cromossomo 9, o qual é translocado para o locus do gene BCR no

cromossomo 22 e parte do 22 é transferida para o cromossomo 9 (Rowley, 1973).

Em decorrência da recombinação entre os genes BCR e ABL há formação de uma proteína quimérica denominada BCR-ABL, com atividade de tirosina-quinase (TK) (Shtivelman et al., 1985). Dependendo do local de quebra no gene BCR, a proteína BCR-ABL pode variar de 185 Kd a 230 Kd. Independente deste ponto de quebra haverá codificação do mesmo sítio da TK do gene ABL com a sequência conservada no radical N-terminal do gene BCR, resultando na fusão do éxon 5' do BCR ao éxon 3' do ABL (Pane et al., 1996; Sawyers, 1999; Melo e Barnes, 2007). Este novo gene híbrido (BCR-ABL) interfere no ciclo celular, de modo que o processo de proliferação e apoptose das células leucêmicas torna-se descontrolado (Huntly, 2003).

Estudos recentes demonstram alto grau de angiogênese em consequência do aumento da densidade microvascular da MO nos pacientes com LMC. Os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) séricos também se encontram elevados nesses pacientes e a expressão desse fator é proeminente em megacariócitos que estão associados à fibrose medular, comum em LMC. Além disso, o clone BCR-ABL em LMC pode originar células endoteliais (CEs) em MO corroborando para hiperangiogênese (Korkolopoulou et al., 2003).

O aumento da angiogênese demonstrou ser fator prognóstico importante em alguns tumores sólidos e em algumas doenças onco-hematológicas como síndrome mielodisplásica, leucemias agudas, LMC e mieloma múltiplo (Cortelezzi et al., 2005; Quirici et al., 2001; Wierzbowska et al., 2005; Zhang et al., 2005).

A quantificação da angiogênese usualmente é realizada pelo estudo da densidade microvascular da MO. Entretanto, trata-se de um exame muito invasivo, demorado e pouco reprodutivo. Recentemente a quantificação das células endoteliais circulantes (CEC) por citometria de fluxo tem se tornado uma técnica mais vantajosa devido a rapidez, baixo custo e minimamente invasiva.

As CEC foram descritas em 1960 em suínos, coelhos e caninos. As células endoteliais progenitoras (CEPs) se originam na MO a partir de um precursor denominado hemangioblasto (ilhotas) (Ribatti, 2004; Khakoo e Finkel, 2005; Solovey et al., 1997; Papa et al., 2004; Mutunga et al., 2001). A fusão de múltiplas “ilhotas” gera vasos sanguíneos primitivos pelo seu remodelamento em estruturas tubulares que constroem o microambiente do plexo capilar primário. Ao final da formação vascular, ocorre a deposição de células endoteliais maduras (CEMs) sobre a superfície interna dos vasos, constituindo uma barreira entre o fluxo sanguíneo e a matriz subendotelial, imprescindível para a manutenção da homeostasia sanguínea (Zammaretti e Zisch, 2005).

Por outro lado, as causas da hiperangiogênese na LMC em suas diferentes fases ainda não estão totalmente esclarecidas. Recentemente alguns autores demonstraram associação entre hiperangiogênese e expressão anômala da proteína securina humana (hsecurina) que é codificada pelo gene idêntico ao transformador do tumor pituitário (PTTG) (Auner et al., 2004). Estes estudos não tiveram como objetivo verificar a associação entre expressão de hsecurina e angiogênese na LMC. Os autores sugerem que a hiperexpressão de hsecurina pode estar relacionada à elevação da taxa de proliferação celular desencadeada pelo gene quimérico BCR-ABL e que a hsecurina pode estimular a síntese de fator básico de crescimento de fibroblastos, potencializando a angiogênese na LMC (Auner et al., 2004). Além disso, o impacto do aumento de expressão do VEGF sérico no curso da LMC ainda é desconhecido (Verstovsek et al., 2002).

Para verificar o papel das CECs como marcadores de angiogênese em portadores de LMC, propusemos estudo de quantificação das CEC em sangue periférico por citometria de fluxo nas diferentes fases da LMC e a análise de VEGF por biologia molecular. Paralelamente, correlacionamos a expressão do gene hSecurina com a análise das CECs e VEGF com o intuito de avaliar sua influência na angiogênese na LMC.

Do ponto de vista prático, a quantificação das CEC em sangue periférico e a análise do VEGF poderão ser utilizadas como nova forma de mensurar a angiogênese na LMC, bem como para critério diferencial nas

diferentes fases da doença e também na avaliação da resposta à terapêutica. Por outro lado, a intervenção no gene hsecurina poderá ser alvo potencial de novas drogas para tratamento da LMC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemia mielóide crônica (LMC): Histórico

Em 1841 David Craigie da *Royal Infirmary*, em Edimburgo, observou uma consistência incomum no sangue de um paciente com história de fraqueza, aumento do volume abdominal (esplenomegalia) e febre. Posteriormente, um segundo paciente, do sexo masculino, 28 anos, com quadro clínico semelhante, foi avaliado por Robert Christison. Ambos, Craigie e Christison, concluíram que os dois casos se tratavam da mesma doença. Em 1845, Bennett obteve permissão para publicar o resultado da autópsia do segundo paciente (Geary, 2000). O artigo teve como título “*Case of Hypertrophy of the Splenn and Liver, in which death took place from suppuration of the Blood*” (Bennett, 1845).

Antes da publicação de Bennett, Robert Virchow avaliou uma paciente de 50 anos no *Charité Hospital* em Berlim com quadro de fadiga, epistaxe, edema de membros inferiores e abdômen. Sua autópsia revelou esplenomegalia e vasos sanguíneos com aspecto purulento. Entretanto, este relato foi publicado após o artigo de Bennett. Desta maneira, Bennett foi responsável pela descrição do primeiro caso de LMC, incluindo a microscopia do SP. Virchow usou o termo “*Weisses Blut*” (Sangue Branco) para descrever a aparência incomum do sangue dos seus pacientes e a inversão da proporção de células vermelhas e brancas (Geary, 2000).

Em 1847, Virchow sugeriu o nome “*Leukämie*” para esta desordem, porém o termo não foi reconhecido universalmente e Bennett propôs o termo “Leucocitemia”, o qual foi amplamente aceito (figura 1) (Geary, 2000).

Figura 1. Monografia do Dr. Bennett sobre leucocitemia (1852) na qual descreveu casos estudados por ele (Geary, 2000)

Nos 10 anos seguintes, Virchow publicou inúmeros estudos a respeito da patogênese da doença em artigo de 1856. Suas observações

caracterizavam a leucocitose secundária ao aumento de glóbulos brancos, mas também a diminuição de glóbulos vermelhos e alterações em baço e fígado. As causas da doença, segundo ele, estariam relacionadas ao tecido produtor de glóbulos brancos. No ano de 1870, a MO foi reconhecida como importante local para produção de células sanguíneas. Em 1879, Paul Erlich introduziu métodos de coloração que revolucionaram a classificação das leucemias. Inúmeros estudos foram publicados entre os anos de 1900 e 1930 e, nesse período, já se sabia que a doença cursava com basofilia e trombocitose. Em 1930, a presença de mieloblastos foi relacionada à fase terminal da doença, ainda não sendo caracterizada como CB e, até 1959 essa fase dramática foi chamada de “metamorfose”, um ano antes da descrição do cromossomo Ph (Geary, 2000).

Com o avanço das pesquisas e o surgimento de novas tecnologias, em 1960, Nowell e Hungerford (figura 2), na Filadélfia, descreveram cromossomos acrocêntricos em células de cultura de amostra obtida de pacientes com LMC (Nowell e Hungerford, 1960). Esta anormalidade tornou-se conhecida como “Cromossomo Philadelphia”. A princípio foi caracterizada como Ph¹ porque achavam que esta seria a primeira de uma série de anormalidades encontradas em outras leucemias (Geary, 2000).

Figura 2. Nowell, Hungerford e o cromossomo Filadélfia, 1960. Disponível em: <http://pubweb.fcc.edu/philadelphiachromosome/history.html> – 25 de novembro de 2010.

Em 1973, Janet Rowley demonstrou que o cromossomo Ph era decorrente de uma translocação balanceada entre os cromossomos 9 e 22 (Rowley, 1973). Neste mesmo ano, a base genética da LMC tornou-se mais clara, quando importantes relatos demonstraram que os genes envolvidos

nesta translocação eram os genes ABL1 (9q34) o qual era translocado para o locus do gene BCR no cromossomo 22 (Geary, 2000). Posteriormente verificou-se que a t(9;22) causadora da fusão BCR-ABL codificava a proteína quimérica BCR-ABL com função de TK (Sawyer, 1999).

2.1.1 Definição

Leucemia mielóide crônica é uma neoplasia mieloproliferativa originada da célula tronco hematopoética anormal associada à fusão dos genes BCR-ABL localizada no cromossoma Ph (OMS, 2008) Este cromossomo é encontrado na linhagem eritróide, megacariocítica, granulocítica e linfóide, demonstrando, portanto, tratar-se de uma desordem da célula tronco hematopoética (Geary, 2000).

A LMC evolui em padrão bifásico com FC inicial assintomática, seguida por progressão para FA e CB. Na FC o compartimento mielóide é expandido, porém a diferenciação e a função celular estão preservadas, com tratamento usualmente eficaz. Entretanto, na CB há perda da capacidade de diferenciação celular e refratariedade à terapia e novas anormalidades citogenéticas podem surgir em 80% dos pacientes (Huntly et al., 2003).

2.1.2 Etiologia

A causa da LMC ainda é desconhecida. Como em outros tumores malignos, a oncogênese ocorre em múltiplas etapas divididas em iniciação,

promoção e progressão. Na fase inicial há aquisição de defeitos genéticos que conferem vantagem de sobrevivência à célula comprometida. Este evento inicial é desconhecido na LMC. Em alguns experimentos, células de linhagem expostas à irradiação gama podem adquirir anormalidades genéticas e transformarem-se em diferentes tipos de leucemia (Garcia-Manero et al., 2003). Não existem evidências que confirmem a existência de fatores genéticos ou hereditários envolvidos na patogênese da LMC. Houve incidência aumentada de LMC em sobreviventes expostos à irradiação secundária à bomba atômica e após exposição à radiação ionizante (Garcia-Manero et al., 2003).

2.1.3 Base genética da LMC

2.1.3.1 ABL

O gene ABL é o homólogo do oncogene viral encontrado em leucemias murinas (*Abelson Murine Leukemia Virus, v-abl*). Codifica uma proteína quinase não receptora de 145 kd, regulada por diferentes mecanismos e expressa em diversas células. Há duas isoformas, 1a e 1b, que diferem na sua função amino-terminal, dependendo da inclusão dos éxons 1a e 1b (Deininger et al., 2000).

A proteína ABL humana é expressa na maioria dos tecidos e localizada tanto no núcleo como no citoplasma. Participa da transdução de sinais de fatores de crescimento da superfície celular e receptores de

adesão para a regulação da estrutura do citoesqueleto. (Deininger et al., 2000). Esta proteína quando localizada no núcleo, participa da regulação de morte celular pós-dano do DNA. A ABL nuclear ativada interage com proteínas envolvidas na apoptose, através do domínio SH3. Também atua como regulador negativo do crescimento celular por induzir parada do ciclo celular na fase G1. A ABL citoplasmática está relacionada com a transdução de sinais das integrinas (Deininger et al., 2000; Bain, 2002; Bartram et al., 1983).

2.1.3.2 BCR

O gene BCR compreende 130 kb e 23 éxons. Codifica duas proteínas principais de 130 kd e 160 kd. Em algumas linhagens celulares há predomínio nuclear do produto 130 kd ou de sua forma citoplasmática, de 160 kd (Deininger et al., 2000, Laurent et al., 2001).

A estrutura da proteína p160 envolve alguns domínios funcionais. Os primeiros 426 aminoácidos (aa) da região amino-terminal têm significado importante porque são codificados pelo primeiro éxon do gene BCR e, portanto, é a única sequência péptica que é conservada em todas isoformas da proteína da fusão BCR-ABL (p190, p210 e p230). Nesta região foi identificado um domínio serina-treonina quinase. Além da auto-fosforilação dos resíduos de serina-treonina, o único substrato conhecido para essa quinase é Bap-1, proteína 1 associada ao BCR (Laurent et al., 2001; Carrella et al., 2001).

A proteína BCR possui duas regiões de 192-242 aa e 298-413 aa, ricas em serina e treonina, também codificadas pelo éxon 1. A fosforilação desses resíduos gera domínios ativos (SH2), com alta afinidade de ligação à proteína ABL. Esta afinidade entre as proteínas BCR-ABL é essencial para a ativação oncogênica BCR-ABL. Estruturas de mutações e deleções têm mostrado que o domínio SH2 proximal, entre os aa 192 e 242 é fundamental para a transformação de fibroblastos de cobaias pelo oncogene BCR-ABL. Na região N-terminal, contendo os primeiros 63 aa forma um terceiro domínio funcional de oligomerização. Este domínio promove a oligomerização da proteína BCR-ABL e consequente ativação do sítio TK da proteína ABL (Laurent et al., 2001).

2.1.3.3 Proteína BCR-ABL

A t(9;22) (q34;q11) é balanceada entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Nessa translocação o proto-oncogene ABL do cromossomo 9 é translocado para o locus do gene BCR do cromossomo 22 (figuras 3 e 4) (Rowley, 1973).

As regiões clássicas de fusão entre os genes BCR-ABL são as regiões b2a2 ou b3a3. Na primeira, o éxon 2 (b2) do gene ABL se funde ao éxon 2 (a2) do gene BCR. A fusão b3a3 decorre da fusão entre o éxon 3 do gene ABL e o éxon 3 do gene BCR. Ambos produzem uma oncoproteína quimérica de 210 kd (p210). Na leucemia linfóide aguda (LLA) Ph positiva, a

fusão produz uma oncoproteína de menor peso molecular, de 190 kd (Bain, 2002; Sattler e Griffin, 2003) (tabela 1).

O potencial leucêmico da p210 reside no fato de que a atividade de TK da proteína ABL é ativada pela justaposição de sequências BCR. A atividade não controlada altera a função fisiológica da enzima ABL, através da interação com uma variedade de proteínas efetoras, resultando em desregulação da proliferação celular, diminuição da aderência das células leucêmicas ao estroma da MO e reduzida resposta apoptótica ao estímulo mutagênico (Melo et al., 2003).

Tabela 1 - Variantes moleculares do BCR-ABL e associações clínico-patológicas

Proteína	Ponto de Quebra	Associação Clínica
p210 BCR-ABL	M-bcr	a grande maioria é de casos típicos de LMC; aproximadamente um terço dos casos são LLA Ph positivo.
p190	m-bcr	a minoria dos casos é LMC, com monocitose ou displasia; cerca de dois terços dos casos de LLA Ph positivas.
p230	μ-bcr	raros casos de LMA; LMC variante neutrofílica ou com marcada trombocitose.

M-bcr: *Major breakpoint cluster region*; m-bcr: *minor breakpoint cluster region*; μ-bcr: *micro breakpoint cluster region*

A ativação constante da TK decorrente da oligomerização da proteína BCR-ABL, causa ativação constante de várias etapas das vias de sinalização intracelular. Apesar da identificação de muitas destas vias, tem sido difícil correlacionar um específico evento sinalizador a um específico evento biológico. Entre as vias de sinalização, as mais importantes ativadas cronicamente pela BCR-ABL são as vias RAS, P13K (*phosphatidylinositol-3 kinase*), ROS (*reactive oxygen species*) e STAT (*signal transducer and activator of transcription*). O BCR-ABL também induz expressão de proteínas anti-apoptóticas mitocondriais, a exemplo da BCLx (Sattler e Griffin, 2003; Goldman e Melo, 2003).

Cerca de 90 – 95% dos casos de LMC apresentam hiperexpressão de uma proteína TK (OMS, 2008). Os demais casos apresentam translocações que envolvem terceiro ou quarto cromossomo adicional aos cromossomos 9 e 22 ou a presença da translocação 9q34 e 22q11.2, não identificada por citogenética convencional. Nestes casos, a fusão do gene BCR-ABL pode ser detectada pelas técnicas de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) (figura 5), RT-PCR ou *Southern Blot* (OMS, 2008).

Figura 3. Esquema ilustrativo da translocação entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo Filadélfia. Modificado de: <http://pubweb.fcc.edu/philadelphiachromosome/history.html> - 01 de dezembro de 2010.

Figura 4. Resultado do exame cariótipo BCR-ABL demonstrando a t(9;22) (ver seta) (Imagem cedida pelo Laboratório de citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo – com permissão).

Figura 5. Resultado de exame FISH demonstrando a fusão dos genes BCR-ABL representado pela junção das cores verde e vermelho (seta branca). As imagens nas cores separadas verde e vermelha representam os genes BCR e ABL respectivamente (seta amarela) (Imagem cedida pelo Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – com permissão)

2.1.4 Epidemiologia

A LMC tem incidência mundial de 1 a 2 casos/ano por 100.000 indivíduos, segundo a OMS e representa 7-20% das leucemias em adultos (OMS, 2008). Ocorre mais frequentemente no sexo masculino e acima dos 50-60 anos, mas pode ocorrer em qualquer faixa etária (Garcia-Manero et al., 2003; Sawyers, 1999; OMS, 2008).

2.1.5 Características morfológicas

A identificação da progressão da FC para as FA e/ou CB é importante para o prognóstico e tratamento, porém os limites clínicos e morfológicos entre esses estágios podem se sobrepor e os parâmetros usados para identificá-las variam entre os pesquisadores. Mudanças na MO a curto e longo prazos nos tratamentos com inibidor de tirosina quinase (ITK) demonstram redução de granulócitos, normalização de megacariócitos, regressão de fibrose e aumento da apoptose associado à diminuição de atividade proliferativa (OMS, 2008).

2.1.5.1 Fase Crônica

A FC da LMC caracterizada por curso indolente apresenta leucocitose com neutrofilia com escalonamento maturativo preservado, presença de promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados sem displasia significativa. Os blastos representam menos de 2% dos leucócitos, basofilia absoluta é invariavelmente presente e a eosinofilia é comum. Monocitose absoluta pode estar presente, porém a fração de monócitos é inferior a 3%, exceto em raros casos associados à p190 BCR-ABL1, na qual a monocitose é persistente e, podendo assim, ser confundida com leucemia mielomonocítica crônica. A contagem de plaquetas varia do normal até maior que $1.000.000/\text{mm}^3$ e trombocitopenia é incomum. No mielograma há intensa proliferação das células da linhagem granulocítica (OMS, 2008) (figura 6).

Na biópsia há aumento de neutrófilos imaturos, com ou sem eosinofilia. Os blastos representam menos de 5% das células da MO e mais de 10% indicam progressão da doença. Os megacariócitos podem ser pequenos com ou sem núcleo hipolobulado. Cerca de 40-50% dos pacientes apresentam proliferação acentuada ou moderada de megacariócitos. A biópsia de MO demonstra fibrose reticulínica moderada em 30% dos casos e está relacionada ao excesso de megacariócitos e esplenomegalia, representando mau prognóstico. Células pseudo-Gaucher e histiócitos azuis são comumente observados. Oitenta por cento dos pacientes apresentam redução de ferro em macrófagos (OMS, 2008).

Figura 6. Observe o aumento no número de granulócitos segmentados em esfregaço de sangue periférico de paciente na FC da LMC. Lâmina corada com Leishman em aumento de 100X

2.1.5.2 Fase Acelerada

Esta é uma fase intermediária na qual os pacientes apresentam sinais de progressão da doença sem critérios de CB (O'Dwyer et al., 2002).

Alguns parâmetros foram adotados para classificação da FA: (1) persistência ou aumento de leucócitos superior a $>10.000/\text{mm}^3$ e/ou persistência ou aumento da esplenomegalia, (2) trombocitose persistente ($>1.000.000/\text{mm}^3$), independentes da terapia (3) trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$) não relacionada à terapia, (4) aparecimento de novas anormalidades cromossômicas (5) 20% ou mais de basófilos no SP (figura 7) e (6) 10-19% de mieloblastos na MO ou SP. Os critérios de 1 a 4 estão associados com transição de FC para FA e os demais estão frequentemente relacionados a transição de FA para CB (OMS, 2008).

Figura 7. Observe o aumento do número de basófilos em esfregaço de sangue periférico de paciente na FA da LMC. Lâmina corada com Leishman em aumento de 100X

2.1.5.3 Crise Blástica

Após período variável de meses e anos a LMC pode evoluir para CB (Pasternak et al., 1998). Os critérios de CB são: 1) presença de 20% de blastos ou mais em SP ou MO (figura 8) ou 2) sarcoma granulocítico. Em cerca de 70% dos casos a LMC evolui para CB mielóide e em 20-30% para CB linfóide. A proliferação de blastos extramedulares, embora seja mais comum na pele, linfonodo, baço, osso e sistema nervoso central, pode ocorrer em qualquer tecido ou órgão (OMS, 2008).

Figura 8. Observe o aumento de células blásticas em esfregaço de sangue periférico de paciente na CB da LMC. Lâmina corada com Leishman em aumento de 100X

2.1.6 Evolução citogenética e prognóstico

A evolução citogenética clonal é tradicionalmente considerada como a impressão digital da progressão da LMC. Anteriormente descrito em pacientes em CB, ocorre em 50% a 80% dos casos e envolve anormalidades cromossômicas que incluem duplo Ph, trissomia 8, isocromossomo 17, trissomias dos cromossomos 19 e 20 e anormalidades em 20q. Essa evolução clonal foi posteriormente descrita em 5% a 10% dos pacientes com CB da LMC e em 30% dos pacientes em FA, e tem sido associada a mau prognóstico (Cortes et al., 2003).

Cerca da metade dos pacientes com evolução clonal citogenética demonstraram supressão de clones anormais após tratamento com interferon (IFN). Na FA da LMC, a evolução clonal citogenética foi associada a bom prognóstico com transplante de células hematopoiéticas alogênico, com sobrevida a longo tempo de 60% (Cortes et al., 2003).

2.1.7 Tratamento

Historicamente, a mediana de sobrevida da LMC era de dois à três anos antes da introdução de terapias efetivas. Após a introdução de terapias convencionais como busulfan e hidroxycarbamida, a sobrevida aumentou para quatro anos. Entretanto, a progressão para FA e CB foi retardada em 10 anos, mas a sobrevida global (SG) permaneceu inferior a 10% (Cortes et al., 2003).

Quase uma década se passou desde a introdução da prática clínica do primeiro ITK (mesilato de imatinibe). Antes do imatinibe, a terapia da LMC baseava-se no uso de hidroxiuréia, IFN alfa e transplante de células hematopoiéticas alogênico. O uso do imatinibe agindo especificamente na oncoproteína TK modificou rapidamente o tratamento desses pacientes. A inclusão de grupos de pacientes tratados com essa terapia tornou mais claro o entendimento das causas e mecanismos de resistência na LMC. Posteriormente, outras drogas alvo, a maioria delas classificadas como ITK, foram desenvolvidas. Algumas têm sido testadas em estudos clínicos e

ambas, dasatinibe e nilotinibe, são indicadas para o tratamento de pacientes intolerantes e resistentes ao imatinibe (Baccarani et al., 2009).

O transplante de células tronco hematopoiéticas é recomendado para pacientes em CB ou FA, portadores de mutação T315I ou resistentes a ITK de segunda linha. O transplante também é uma opção para os pacientes com resposta subótima ao dasatinibe ou nilotinibe (Baccarani et al., 2009)

2.2 História do sistema vascular

Durante 1500 anos, uma teoria baseada em dados de Hipócrates e Galeno sobre o sistema vascular sinalizava a existência de dois sistemas distintos entre si: o venoso e o arterial. Galeno, porém, dizia que as artérias continham “ar e espíritos vitais”, e as veias conduziam o sangue formado pelo fígado. Em 1628, William Harvey derrubou esta hipótese. Com experimentos realizados em caninos, Harvey demonstrou que artérias e veias possuem íntima ligação por estarem conectadas entre si (Aird, 2007a).

Marcelo Malpighi, em 1661, foi o primeiro a visualizar os capilares sanguíneos. O termo “endotélio” surgiu em 1865 pelo anatomista Wilhelm His ao diferenciar a camada que revestia internamente as cavidades do organismo, do epitélio; e sua unidade anátomo-funcional: a célula endotelial. Nas décadas de 1950 e 1960, foram identificadas características distintas que denotam a heterogeneidade estrutural e molecular das CEs, surgindo uma nova era da biologia celular humana (Aird, 2007a;2007b).

2.2.1 Vasculogênese e angiogênese

As CEPs originam-se na MO em um precursor denominado hemangioblasto (Wierzbowska et al., 2005; Fang et al., 2005). O hemangioblasto é capaz de proliferar, migrar e diferenciar-se em células da linhagem endotelial, mas não adquirem características de CEMs (Wierzbowska et al., 2005). Nesta fase, o suporte nutricional é feito por um sistema vascular intacto, liberando elementos essenciais ao tecido neoformado (Fidler e Ellis, 2004; Khakoo e Finkel, 2005). A diferenciação *in situ* de CEPs embrionárias conhecidas como angioblastos em CEM é denominada de *vasculogênese* (Khakoo e Finkel, 2005; Ingram et al., 2005).

Evidências demonstraram que as CEPs participam da vasculogênese pós-natal após isquemia miocárdica, infarto agudo do miocárdio, aterosclerose e na vascularização de tumores (Ribatti, 2004; Khakoo e Finkel, 2005). Vários estudos evidenciaram que as CEPs atuam na neovascularização de órgãos isquêmicos; contudo o mecanismo estimulante ou inibitório das CEPs na MO é desconhecido (Hristov et al., 2003).

A formação de grupos isolados (ilhotas) de hemangioblastos e a subsequente diferenciação em angioblastos e células progenitoras hematopoiéticas iniciam a vasculogênese propriamente dita (Lamping, 2007). Ao final da formação vascular, ocorre a deposição de CEMs sobre a superfície interna dos vasos, constituindo uma barreira entre o fluxo

sanguíneo e a matriz subendotelial imprescindível para a manutenção da homeostasia sanguínea (Zammaretti e Zisch, 2005).

Após estabelecimento do sistema vascular, o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos ocorre secundariamente à expansão das CEs pós-capilar ou à maturação e posterior neoformação de condutos colaterais derivados de artérias de maior calibre pré existentes (Lamallice et al., 2007). Este processo de neoformação vascular é denominado de angiogênese (Ingram et al., 2005) e envolve a ativação de metaloproteínas da matriz (MMPs) responsáveis pela degradação da membrana basal subendotelial, que é pré-requisito para a migração direta e a proliferação de CEs (Bazarbachi et al., 2004).

A migração de CE durante a angiogênese envolve mecanismos de quimiotaxia, haptotaxia (migração direcional através de gradiente de ligantes imóveis) e mecanotaxia (migração direcional por forças mecânicas) (Lamallice et al., 2007). Porém, não se conhece como estes mecanismos interagem entre si, e como o organismo orchestra estes eventos no intuito de promover a migração celular (Hristov e Weber, 2004; Lamallice et al., 2007).

CECs são detectadas em situações de lesão endotelial, podendo apresentar-se também na forma ativada (Moroni et al., 2005).

2.2.2 Células endoteliais circulantes

A CE tem forma de polígono e é alongada, disposta em monocamadas envolvendo o sistema vascular, formando complexos juncionais com células vizinhas (Cotran et al., 2000). De estrutura maleável, no interior da árvore vascular, pode adquirir largura inferior a 0,1 μm em capilares e veias e de 1 μm na aorta (Aird, 2007a). Possui funções de síntese e metabólica, destacando-se a regulação da inflamação, imunidade e crescimento celular por meio da produção de fatores estimuladores de crescimento como fator de crescimento de origem plaquetário (PDGF), fator estimulador de colônias (CSF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). A integridade estrutural e funcional das CEs é fundamental à manutenção da homeostasia da parede vascular. Mantêm interface sangue-tecido não-trombogênica, modulam o fluxo sanguíneo, o metabolismo hormonal, modifica lipoproteínas durante o transporte na parede arterial, regula a permeabilidade vascular, a transmigração leucocitária, são termorreguladoras e umidificadoras, mantêm o tônus vascular, regulam a proliferação celular, a angiogênese e o crescimento de outros tipos de células (Aird, 2007a; Cotran et al., 2000)

As CEs foram descritas em 1960 em suínos, coelhos e caninos. Estão presentes em maior quantidade em portadores de anemia falciforme, injúria vascular, IAM, síndrome coronariana aguda, púrpura trombocitopênica trombótica, infecção por *Rickettsia conorii*, citomegalovírus, choque séptico e

lúpus eritematoso sistêmico (Ribatti, 2004; Khakoo e Finkel, 2005; Solovey et al., 1997; Papa et al., 2004; Mutunga et al., 2001).

As CEPs circulantes diferem das CEMs por sua localização na parede dos vasos sanguíneos (Ribatti, 2004; Shaffer et al., 2006), e também pela expressão de marcadores imunofenotípicos (Hristov et al., 2003; Khan et al., 2005).

Schneider e cols, relataram que os valores normais de CECs e de CEPs na circulação variam entre os animais. Em humanos adultos, ambas são raras na circulação representando 0,01% a 0,0001% das células mononucleares periféricas circulantes (Ingram et al., 2005; Khan et al., 2005).

O aumento da angiogênese demonstrou ser fator prognóstico importante em alguns tumores sólidos. Em onco-hematologia, foi associada à síndrome mielodisplásica, leucemias agudas, LMC e mieloma múltiplo. Recentemente, o aumento de CECs foi associado a câncer de mama e linfoma não-Hodgkin (Cortelezzi et al., 2005; Wierzbowska et al., 2005; Zhang et al., 2005; Kay, 2009).

2.2.3 Caracterização fenotípica das CECs

A metodologia de quantificação de CECs por cultura celular é dispendiosa, demorada, e inviável na rotina laboratorial. Porém, as mesmas podem ser identificadas e quantificadas pela análise de expressão de

marcadores de membrana, denominados de grupos de diferenciação ou *cluster designation* (CD), tendo a citometria de fluxo como padrão ouro (Fadini et al., 2007). Neste método, as células são identificadas com o auxílio de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a fluorocromos, determinando-se precisamente o fenótipo celular (Khan et al., 2005) (figura 9).

Figura 9. Descrição esquemática da identificação fenotípica celular pelo uso de anticorpos monoclonais diretamente conjugados a fluorocromos que se ligam ao “*Cluster Designation*” (epítomos) específicos.

CECs podem ser diferenciadas da linhagem hematopoética por possuírem expressão do antígeno leucocitário comum CD45 de intensidade fraca a negativa (Wierzbowska et al., 2005).

CEPs foram identificadas pela expressão de uma glicoproteína transmembrana de 120 Kd e função desconhecida, denominada CD133. Quando CEPs são incubadas com VEGF e cultivadas em placas com colágeno e fator de crescimento insulina-símile, perdem CD133, iniciam processo de diferenciação e se transformam em CEMs (Hristov et al., 2003; Zammaretti e Zisch, 2005). Desta forma, a expressão de CD133 pode diferenciar CEPs de CEMs (Yin et al., 1997; Zammaretti e Zisch, 2005; Khan et al., 2005).

Além do marcador CD133, a CEP funcional expressa o marcador de célula imatura CD34 e o receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2/KDR) (Peichev et al., 2000).

Um marcador de adesão de CE que foi descrito e vem sendo empregado para identificar CECs, CEPs ou CEMs, em vários estudos é o CD146 (Delorme et al., 2005). Alguns estudos ressaltam que sua detecção pelo método da citometria de fluxo mostra positividade em alguns leucócitos como linfócitos T ativados. Seu uso deve ser avaliado em conjunto com outros marcadores (Elshal et al., 2005; Shaffer et al., 2006).

As CECs ativadas produzem óxido nítrico, prostaciclina, radicais livres de oxigênio, têm atividade pró-coagulante e elevada capacidade de adesão leucocitária e de fagocitose. Expressam a molécula de adesão CD54

(molécula de adesão intracelular-1), CD62e (E-selectina), CD106 (molécula de adesão celular-vascular1) e marcadores de atividade pró-coagulante como CD142 (fator tissular) (Khan et al., 2005; Clancy et al., 2001).

O impacto do aumento de expressão de VEGF no curso da LMC ainda é desconhecido (Verstovsek et al., 2002); porém alguns relatos mostram que estes pacientes apresentam maior densidade vascular na MO do que indivíduos do grupo controle, principalmente em CB (Korkolopoulou et al., 2003). Não há, até o presente momento, nenhum relato na literatura, que correlacione a quantificação de CECs e LMC.

2.2.4 Angiogênese e LMC

O papel da angiogênese em progressão clínica de doenças hematopoiéticas tem sido intensamente investigado, e fatores angiogênicos produzidos por células neoplásicas e não malignas do estroma no microambiente medular, estão intimamente envolvidos. O aumento na densidade microvascular em MO e níveis circulantes elevados de fatores proangiogênicos tais como VEGF, FGF, entre outros, têm sido detectados em neoplasias hematopoiéticas em linhagens mielóide e linfóide. Esses fatores podem favorecer tanto o crescimento como proliferação de células leucêmicas (Musolino et al., 2004; Aguayo et al., 2000).

Estudos demonstraram alto grau angiogênico e aumento de densidade microvascular nos pacientes com LMC. Os níveis de VEGF

séricos também se encontram elevados nesses pacientes, e a expressão desse fator é proeminente em megacariócitos que estão associados à fibrose medular, comum em LMC. Entretanto, blastos mielóides são conhecidos por gerar VEGF por mecanismos autócrinos e parácrinos. Sendo assim, acredita-se que precursores mielóides e megacariócitos são os principais provedores de VEGF no microambiente medular (Korkolopoulou et al., 2003).

Outros estudos descreveram que clone BCR-ABL em LMC derivam CEs em MO envolvendo mecanismos angiogênicos. Esta observação mostra que CEs em LMC são clonais, se proliferam rapidamente e têm viabilidade prolongada devido à supressão apoptótica (Korkolopoulou et al., 2003).

2.3 Ação da hSecurina na separação das cromátides irmãs

A exata separação das cromátides irmãs durante a anáfase é essencial à segregação dos cromossomos e manutenção da herança genética (figura 10), e depende da protease denominada separase de peso molecular de 150 a 230 kd, de acordo com a espécie. A ação dessa protease depende exclusivamente de uma proteína essencial à separação das cromátides irmãs, denominada securina. Se intacta, a securina suporta o acúmulo nuclear da separase, inibindo sua atividade proteolítica. (Auner et al., 2004; Gil-Barnabé et al., 2006).

CDC20: cell-division cycle 20 APC/C: anaphase promoting complex/ciclosome

Figura 10. Esquema demonstrando o processo de separação das cromátides irmãs que se inicia com ativação do APC pelo CDC20 que, por sua vez, degrada a securina, clivando e dissociando o complexo de coesão. (Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26856/> - 5 de novembro de 2010).

O gene transformador de tumor pituitário (PTTG) ou gene codificador da hsecurina é um novo oncogene expresso em tumor pituitário, mas não em célula pituitária normal. Quando este gene ganha ubiquitina e assume a forma ubiquitinada torna-se sensível à degradação pelo proteossoma complexo promotor de anáfase ou ciclossomo (APC/C) que por sua vez é ativado pelo ciclo de divisão celular 20 (CDC20). Ao ser ativado o

PTTG/hsecurina libera a separase que por sua vez cliva subunidades das proteínas Scc1, Mcd1, Rad21, promovendo perda da coesão dos cromossomos, liberando a célula para fase de anáfase e conseqüente separação das cromátides irmãs para eixos opostos (Auner et al., 2004; Tfelt-Hansen, 2006). Entretanto, em condições patológicas, as cromátides irmãs podem migrar para o mesmo pólo, gerando células filhas aneuplóides (Auner et al., 2004; Tfelt-Hansen, 2006; Jallepalli et al., 2001). A hsecurina, proteína de 202 aa, é codificada pelo PTTG situado no cromossomo 5q33 (Auner et al., 2004; Tfelt-Hansen et al., 2006). O PTTG regula a divisão celular, impedindo a instabilidade genética, induz a expressão do fator básico de crescimento de fibroblasto, do VEGF e de fatores pró-angiogênicos (Tfelt-Hansen et al., 2006).

A hiperexpressão de hsecurina em fibroblastos de ratos NIH 3T3 causa transformação tumoral (Tfelt-Hansen et al., 2006; Horning et al., 2002). A expressão de hsecurina mutante ou degradada em células NIH 3T3 causa separação incompleta das cromátides irmãs, e aneuploidia em células de osteosarcoma humano (MG-63). Células humanas desprovidas de hsecurina apresentam defeitos de clivagem do centrômero e de segregação cromossômica (Auner et al., 2004; Gil-Barnabé et al., 2006).

2.3.1 hSecurina e LMC

Na maioria dos tumores sólidos, a instabilidade cromossômica está associada a ganho ou perda parcial ou completa de cromossomos, levando à aneuploidia. Evidências recentes sugerem que esta forma de instabilidade cromossômica está associada à alteração em pontos de checagem do ciclo celular responsáveis pela integridade do eixo instrumental ou da estrutura crítica de segregação bipolar, e da duplicação das cromátides irmãs durante a mitose. A hsecurina pode se ligar ao gene p53, causando bloqueio da apoptose, levando ao acúmulo de DNA danificado. O mecanismo pelo qual ocorre hiperexpressão de hsecurina não está claro (Chen et al., 1999).

Na LMC a única anormalidade cromossômica observada na FC é a t(9;22); entretanto, na FA e CB é comum haver associação de outras anormalidades. Recentemente, um estudo não evidenciou anormalidade de expressão de hsecurina na CB de LMC. Porém, este estudo encontrou hiperexpressão de hsecurina em LMC em FC. Os autores sugerem que a hiperexpressão de hsecurina pode estar relacionada à elevação da taxa de proliferação celular, desencadeada pelo gene quimérico BCR-ABL. A hsecurina pode estimular a síntese de fator básico de fibroblastos potencializando a angiogênese na LMC (Auner et al., 2004).

Não há, até o presente momento, nenhum relato na literatura, que correlacione a quantificação de CECs e hsecurina na LMC para análise do comportamento angiogênico.

3. OBJETIVOS

- Quantificar CEP, CEM e CEC ativadas, por citometria de fluxo, e a expressão de VEGF por reação em cadeia da polimerase em tempo real nas diferentes fases da LMC e grupo saudável.
- Análise quantitativa da expressão do gene hsecurina e sua correlação com os níveis de CEC e VEGF nas diferentes fases da LMC e grupo saudável.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

De janeiro de 2008 a outubro de 2009, foram analisadas 31 amostras de sangue periférico de pacientes com LMC em FC (pré-imatinibe), 23 em CB e 30 em FA (pré-imatinibe), para quantificação de CEC. Vinte e cinco pacientes em FC (pré-imatinibe), 14 em CB e 26 em FA (pré-imatinibe) foram estudados para o gene da Securina e VEGF, todos atendidos no Serviço de Hematologia do HC/FMUSP. Paralelamente, foram avaliados 50 e 32 indivíduos saudáveis, que compareceram ao mesmo serviço para doação de plaquetas por aférese e com perfil sorológico negativo (tabela 2). O “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, aprovado pela Comissão de Ética (CAPPesq), de número 527/06, foi aplicado a todos os participantes.

Tabela 2 – Casuística

Grupos	CEC (n)	Securina (n) e VEGF
Fase Crônica	31	25
Fase Acelerada	30	26
Crise Blástica	23	14
Controles	50	32

4.1.1 Critérios de seleção dos grupos estudados

Alguns critérios foram adotados para escolha dos grupos em estudo, os quais são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Critérios de seleção para os grupos estudados

Saudáveis
Seguir as normas exigidas pela RDC153 para doação de sangue (Anvisa)
Não apresentar doença do sistema cardiovascular e/ou diabetes mellitus (Blann et al., 2005, Hartge et al., 2006)
Doadoras fora do período menstrual (Agrawal et al., 1999)
Doadores sem alterações prostáticas (Bono et al., 2002)
Portadores de LMC
Diagnóstico confirmado por exame clínico e laboratorial (BCR-ABL, mielograma, hemograma e Cariótipo).
Imunofenotipagem dos portadores de LMC em CB.

4.2 Métodos

4.2.1 Citometria de fluxo

4.2.1.1 Processamento da amostra

O sangue periférico foi colhido em dois tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), no total de 8 mL de amostra. Em seguida procedeu-se a contagem automática para avaliação da leucometria. As amostras foram processadas em, no máximo, duas horas à temperatura ambiente (TA).

Foram transferidos 2 mL da amostra de sangue total para um tubo Falcon, adicionando-se solução fisiológica para lavagem, com subsequente centrifugação a 1000g por 5 minutos (min) à TA. Aspirou-se o sobrenadante e diluiu-se a amostra para uma concentração final de $1,5 \times 10^6$ células, as quais foram distribuídas em tubos previamente identificados. A seguir, as células foram marcadas com AcMo diretamente conjugados e específicos para identificar CEs (CD133-APC, CD34-PE, CD45-PC5, CD146-FITC e CD62e-PE) (tabela 4), distribuídos em dois tubos (figura 11) e incubadas por 20 min no escuro e à TA. Todos os AcMo foram validados com células de linhagem HUVEC. Posteriormente, adicionou-se aos tubos 2 mL de solução de lise de hemácias (*FACS Lysing Solution* – BD), diluídos na proporção de 1:10 com água destilada. Os mesmos foram homogeneizados e incubados novamente no escuro por 13 min à TA, e em seguida centrifugados por 3 min a 1000g, desprezando-se o sobrenadante para retirar as hemácias lisadas. Finalmente, as células dos tubos foram lavadas com PBS-Azida a

0,1% duas vezes e ressuspensas em 400µL de paraformaldeído a 1%, para leitura no Citômetro de Fluxo FACSCalibur (BD – *Becton Dickinson*, San Jose, CA) do Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Figura 11. Representação esquemática da disposição dos AcMo em seus respectivos tubos.

Tabela 4 - Anticorpos Monoclonais utilizados para identificação das CECs

AcMo	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Marca	Quantidade
CD146	FITC	P1h12	IgG1	Serotec	10µL
CD34	PE	Birma-K3	IgG1	Dako	5µL
CD45	PC5	J33	IgG1	Immunotec	1:10 usar 10µL
CD133	APC	293C3	IgG2b	Mytenyi Biotec	10µL
CD62E	PE	685H11	IgG1	BD Biosciences	20µL

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PC5: R. ficoeritrina conjugada com cy5; APC: alofocianina

4.2.1.2 Validação dos anticorpos monoclonais

Células HUVEC (figura 12) (ATCC nº CRL-1730) foram cultivadas em meio 199/EBSS com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂, 95% de umidade à 37°C. Utilizando *Cell Scrape* para desaderá-las, as células foram posteriormente marcadas com os AcMo conjugados a fluorocromos CD146-FITC, CD62e-PE, CD45-PC5, CD133-APC e CD34-PE, e adquiridas em Citômetro de Fluxo FCS-Calibur (BD - Becton Dickinson, San Jose, CA). A análise foi realizada em software CellQuest Pro (BD Immunocytometry Systems) por histograma e *dot plot*. A

figura 13 mostra, em histogramas a validação dos AcMo responsáveis pela identificação das CECs.

Figura 12. Lâmina preparada por citocentrifugação contendo células de linhagem endotelial humana (HUVEC) coradas com Leishman e observadas em microscópio óptico (aumento de 100X).

Figura 13. Histogramas de FL1 vs número de células evidenciando expressão positiva dos antígenos CD133 (A), CD146 (B) e CD62e (C) em células HUVEC.

4.2.1.3 Aquisição das amostras em citômetro de fluxo

Antes de iniciar a aquisição das amostras foi realizado procedimento de limpeza do citômetro de fluxo com hipoclorito de sódio a 1% e água MILIQ, para eliminar partículas interferentes. Para monitorar o desempenho do equipamento foi utilizado o reagente CaliBRITE Beads (BD, Becton Dickinson, San Jose, CA), adquirido no programa FACSCComp (BD, Becton Dickinson, San Jose, CA), composto por pérolas não marcadas para ajustar a

voltagem dos tubos fotomultiplicadores e de pérolas marcadas para compensar as fluorescências e avaliar a sensibilidade do citômetro de fluxo. Para aquisição das amostras, um ajuste manual cuidadoso da compensação das fluorescências foi realizado. Este procedimento foi feito para minimizar a interferência da emissão de luz captada pelos diferentes fotomultiplicadores. Para assegurar a detecção de baixos valores de CECs, foram adquiridos 100.000 eventos de cada tubo. Os dados foram processados utilizando o programa *CellQuestPro*.

Durante a aquisição, as células foram visualizadas em citograma bidimensional de dispersão frontal da luz (FSC) e dispersão lateral da luz (SSC) em escala linear, com FSC na abscissa e SSC na ordenada, para identificar as populações celulares pelos parâmetros de tamanho e complexidade interna. O procedimento de processamento e aquisição das CEMs e CEPs foi realizado em duplicata para controle de reprodutibilidade.

A análise final dos dados da amostra foi feita no mesmo equipamento utilizando o software *CellQuest (BD Immunocytometry Systems)*.

Por se tratar de pesquisa de eventos raros, realizou-se uma regra de três simples, com o número de eventos obtidos na região de células CD45 fraco/negativo (R1) (figura 14) e o valor encontrado nos quadrantes de interesse. Ao final realizou-se projeção destes valores de duas para quatro casas decimais. Os valores obtidos em porcentagem foram então convertidos em valores absolutos de células por mm^3 , calculados com base na leucometria total. O resultado da leucometria total dos pacientes foi

variável (Grupo Controle – mediana 6200/mm³; FC – mediana 21200/mm³; CB – mediana 87500/mm³; FA – mediana 6150/mm³). Por esse motivo achamos que esse fator poderia influenciar no resultado final de CECs em mm³, aumentando a chance de resultados indevidos. A análise estatística então foi realizada com os números fornecidos pelo citômetro de fluxo, em porcentagem, sem a consideração da leucometria para tal análise.

4.2.1.4 Estratégias de Identificação das CECs

Foram consideradas CEPs, células CD133+/CD146+/CD34+/CD62e-/+, como CECs ativadas, as duplo positivas para CD146+/CD62e+ e CEM, as células CD146+/CD133-/CD62e- (tabela 5). As populações de CEs foram identificadas a partir de uma delimitação de células de fraca intensidade média de fluorescência (IMF) e/ou negativas para CD45 (figuras 14 e 15) (Mancuso et al., 2001; Mancuso et al., 2006; Wierzbowska et al., 2005; Cortelezzi et al., 2005; Papa et al., 2004).

Tabela 5 - Caracterização das populações de CECs

Expressão dos Antígenos	
CEP	CD133 ⁺ , CD34 ⁺ , CD146 ⁺ , CD45 ^{dim/-} , CD62e ^{-/+}
CE ativada	CD133 ⁻ , CD34 ⁻ , CD146 ⁺ , CD45 ^{dim/-} , CD62e ⁺
CEM	CD133 ⁻ , CD34 ⁻ , CD146 ⁺ , CD45 ^{dim/-} , CD62e ⁻
CEC	CD133 ^{+/-} , CD34 ^{+/-} , CD146 ⁺ , CD45 ^{dim/-} , CD62e ^{+/-}

+: positivo dim/-: positivo-fraco/negativo -: negativo

Figura 14. Citograma bidimensional em dot plot de FSC vs SSC ilustrando a região R1 (A) realizada para excluir plaquetas e células mortas e (B) CD45 vs SSC evidenciando a região R2 que delimita células CD45 fracas e/ou negativas em paciente com LMC em fase crônica (localização das CECs).

Figura 15. Citogramas bidimensionais em escala logarítmica do tipo *dot plot*, ilustrando à esquerda os controles Isotípicos IgG sem marcador excluindo pelo menos 98% de população negativa e à direita, representação de populações de CEPs (A1), CEC ativadas (B1) e CEM (C1).

4.2.2 Biologia molecular

4.2.2.1 Separação celular

As amostras sobressalentes ao procedimento pré-citometria foram diluídas em PBS na proporção 1:1, em tubo de centrífuga de 15 mL. Em outro tubo, adicionou-se três partes de Ficoll-Paque Plus (*GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, United Kingdom*) para cada quatro partes de sangue total diluído. O sangue total diluído foi cuidadosamente adicionado pelas paredes do tubo sobre o Ficoll-Paque Plus, criando uma interface Ficoll-Paque Plus e a amostra de sangue previamente diluída, sem homogeneização. Em seguida o mesmo foi centrifugado a 400g à TA por 30 min, sem utilização do freio ao final da centrifugação. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi removida da interface e transferida para outro tubo de centrífuga, devidamente identificado. Em seguida, adicionou-se PBS à camada de PBMC, com posterior homogeneização e subsequente centrifugação por 10 min à TA a 100g. O sobrenadante foi removido e as células novamente lavadas em PBS para repetição do processo de centrifugação. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em tampão de separação contendo 0,5g de albumina em 100 mL de PBS.

4.2.2.2 Congelamento Celular

As células do procedimento acima foram contadas em câmara de Neubauer e congeladas a -20°C em tubo de 1,5 mL na proporção de 1×10^6 células para cada 1 mL de Trizol (Invitrogen, cat. 15596-026).

4.2.2.3 Extração de RNA

Para a extração de RNA, inicialmente as células foram descongeladas à TA, com posterior adição de 200 μL de clorofórmio seguida de homogeneização brusca, deixando em repouso por 3 min a TA. A seguir, as células foram centrifugadas a 11800g por 15 min a 4°C . O sobrenadante contendo RNA foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL previamente identificado. Em seguida adicionou-se 500 μL de isopropanol, homogeneizando delicadamente, seguida de incubação por 10 min à TA para promover precipitação do RNA. Procedeu-se uma segunda centrifugação a 11800g por 10 min a 4°C . Desprezou-se o sobrenadante, lavando-se o RNA em 1 mL de etanol a 75%, diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) por 5 min a 7400g e 4°C . Finalmente, o sobrenadante foi novamente desprezado e o RNA ressuspenso em 50 μL de água DEPC (Chomczynski e Sacchi, 2006).

Para detectar possível degradação de RNA realizou-se corrida em gel de agarose 0,8% de todas as amostras (figura 16). As amostras

sobressalentes a este procedimento foram congeladas a -80°C , até o momento de sua utilização.

Figura 16. Gel de agarose a 0,8% dos RNAs extraídos de pacientes com LMC (1 a 8) para avaliação da integridade do RNA. PM (peso molecular – controle). Observe as duas bandas íntegras de RNA ribossômicos indicadas com as setas (28S e 18S)

4.2.2.4 Tratamento do RNA com DNase

Para descartar a contaminação com DNA e a consequente interferência nos resultados de PCR em tempo real, tratamos todas as amostras com DNase (Promega Corporation – cod. M610A).

Em tubo de 1,5 mL previamente identificado foi adicionado 2000 ng de RNA diluído em água DEPC para um volume final de 16 μL . Ao RNA

diluído foi acrescentado 2 µL de tampão de DNase 10X concentrado e 2 µL de DNase, seguido de incubação por 30 min a 37°C. Para finalizar a reação, foi adicionado 2 µL de “solução de parada” do kit com incubação a 65°C por 10 min. O tubo contendo RNA tratado foi estocado a -20°C até o momento da utilização.

4.2.2.5 Cultura celular da linhagem KG1

Células de leucemia mielóide aguda (LMA) humana KG1 (ATCC CCL-246), foram cultivadas em meio RPMI-1640, contendo SFB 10%, 100U/mL penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 26,4mM de bicarbonato de sódio. Estas células cresceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, conforme previamente descrito (Koeffler e Golde, 1978).

Cerca de 1×10^6 células foram retiradas da cultura, e realizou-se extração de RNA, conforme descrito anteriormente. Essas células foram utilizadas como calibrador e controle positivo para a técnica de PCR em tempo real.

4.2.2.6 PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão dos genes hSecurina e VEGF, utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real -

TaqMan (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação à expressão do gene glucuronidase beta (GUSB), responsável por codificar uma hidrolase que degrada os glicosaminoglicanos, e a célula de linhagem KG1 foi utilizada como calibrador e controle positivo. Inicialmente testamos os genes endógenos gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Beta2 microglobulina (B2M), os quais não foram satisfatórios devido a alteração de expressão entre as amostras de pacientes com LMC.

De acordo com instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000” (*Cobertt Research*), os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de ciclo limiar (CT) entre as duplicatas para assegurar mínima variação de valor de CT. Todos os ensaios utilizaram controle positivo e um controle de amplificação contendo apenas água DEPC.

Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando-se 50ng de RNA e *kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen), em volume final de 12,5 uL. O padrão de ciclos programados no “Rotor-Gene RG 3000” foi 50°C por 15 min, 95° por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg.

Os primers e sondas para o gene hSecurina foram sintetizados conforme Auner e colaboradores (2004), utilizando as sondas descritas abaixo:

Senso: 5'-GAAGACTGTTAAAGCAAAAAGCTCTGTA-3'

Antisenso: 5'-GGCAGGTCAAACTCTCAAAGTCTA-3'

Sonda: 5'-MGB-CCTGCCTCAGATGATGCCTATCCAGAAA-JOE -3'

Para pesquisa do gene endógeno GUSB e do gene VEGF foram usados os ensaios Taqman 4333767-F e Hs00173626_m1, respectivamente (Applied Biosystems).

Para calcular a quantificação relativa foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, que utiliza a seguinte fórmula:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gene alvo} - C_T \text{ gene endógeno}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ do gene alvo} - \Delta C_T \text{ do gene calibrador}$$

O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Todos os reagentes, insumos e equipamentos utilizados na parte prática da pesquisa foram manipulados com equipamentos de proteção individual (EPI's) específicos. Os materiais descartáveis foram desprezados em coletores apropriados para reduzir os riscos biológicos e ambientais.

4.3 Análise estatística

A análise estatística de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva. Para as variáveis de

natureza quantitativa foram calculadas medidas-resumo, como média e desvio-padrão.

Para verificar se as variáveis seguiam a distribuição normal, empregou-se a prova estatística de Shapiro-Wilk. Após constatação da não normalidade dos dados, a mediana foi considerada estimadora de medida de centralidade. As análises estatísticas foram realizadas com o programa BioEstat 4.0.

Foi utilizado o teste estatístico, não paramétrico, de Kruskal-Wallis global, para comparar os valores médios de CEPs, CEMs, CECs Ativadas e CECs em porcentagem, com nível de significância α igual a 5%. Quando encontrada diferença estatisticamente significativa foi realizado teste de comparações múltiplas utilizando o teste de Kruskal-Wallis '*a posteriori*'. O mesmo método foi utilizado para análise de VEGF e hsecurina.

Para procedimentos de duplicata das CEMs e CEPs foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para testagem da reprodutibilidade dos resultados.

Utilizamos o teste Mann-Whitney para análise de comparação de CB linfóide com CB mielóide.

Para definição dos valores de normalidade do grupo controle para CEC e subtipos foi utilizada a técnica de bootstrap (Efron e Tibshirasi, 1993).

5. RESULTADOS

Foram avaliadas CEC de 136 indivíduos, sendo 50 (36,8%) do grupo controle, 32 (23,5%) com LMC em FC, 23 (16,9%) com LMC em CB e 31 (22,8%) com LMC em FA (figura 17). Os genes da Secarina e VEGF foram analisados em 97 indivíduos, 32 (32,9%) controles, 25 (25,8%) LMC em FC, 14 (14,4%) LMC em CB e 26 (26,9%) LMC em FA (figura 18).

Figura 17. Distribuição dos grupos avaliados para CEC

Figura 18. Distribuição dos grupos avaliados para os genes hSecurina e VEGF

Na análise das CEC, o grupo de FC da LMC apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 51,2 anos $\pm$ 16,3 e mediana de 52 anos (19 a 82 anos), sendo 18 (56%) do sexo masculino e 14 (44%) do sexo feminino. A CB da LMC apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 48,4 anos $\pm$ 14,8 e mediana de 52 anos (20 a 74 anos), sendo 13 (56%) do sexo masculino e 10 (44%) do sexo feminino. O grupo composto por portadores de FA da LMC apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 55,3 anos $\pm$ 13,5 e mediana de 57,5 anos (26 a 81 anos), sendo 17 (55%) do sexo masculino e 14 (45%) do sexo feminino. O grupo saudável apresentou média $\pm$ desvio padrão de

idade de 44,3 anos $\pm$ 14,1 e mediana de 46 anos (19 a 79 anos), sendo 25 (50%) do sexo masculino e 25 (50%) do sexo feminino (tabela 6).

Tabela 6 - Medidas-resumo de idade (anos) dos indivíduos estudados para CECs, segundo grupo

Grupo	Medidas-Resumo					
	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
Controle	50	44,3	46,0	19	79	14,1
Fase Crônica	32	51,2	52,0	19	82	16,3
Crise Blástica	23	48,4	52,0	20	74	14,8
Fase Acelerada	31	55,3	57,5	26	81	13,5

Na análise dos genes hSecurina e VEGF, o grupo da FC da LMC apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 52,9 anos $\pm$ 16,6 e mediana de 52 anos (19 a 82 anos), sendo 14 (56%) do sexo masculino e 11 (44%) do sexo feminino. A CB da LMC apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 47,3 anos $\pm$ 13,4 e mediana de 53 anos (24 a 67 anos), sendo 11 (78,6%) do sexo masculino e 3 (21,4%) do sexo feminino. O grupo de portadores de FA da doença apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 56,6 anos $\pm$

13,2 e mediana de 58,5 anos (26 a 81 anos), sendo 12 (46,1%) do sexo masculino e 14 (53,8%) do sexo feminino. O grupo saudável apresentou média $\pm$ desvio padrão de idade de 49,5 anos $\pm$ 13,4 e mediana de 51 anos (21 a 77 anos), sendo 15 (50%) do sexo masculino e 15 (50%) do sexo feminino (tabela 7).

Tabela 7 - Medidas-resumo de idade (anos) dos indivíduos estudados para os genes hSecurina e VEGF, segundo grupo

Medidas-Resumo						
Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
Controle	30	49,5	51,0	21	77	13,4
Fase Crônica	25	52,9	52,0	19	82	16,6
Crise Blástica	14	47,3	53,0	24	67	13,4
Fase Acelerada	26	56,6	58,5	26	81	13,2

5.1 Células Endoteliais Circulantes

Observou-se que a primeira e a segunda aquisição das reações realizadas em duplicata de CEPs e CEMs do grupo saudável não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p = 0,6970$ e $p = 0,2301$, respectivamente), assim como não houve diferença estatística entre

as aquisições das CEPs e CEMs das populações em FC ($p = 0,7570$ e $p = 0,1403$), CB ($p = 0,1024$ e $p = 0,1088$) e FA ($p = 0,1403$ e $p = 0,4631$), corroborando a reprodutibilidade do método.

Nas duplicatas (tabela 8), as medianas de CEPs encontradas nas aquisições 1 e 2 adquiridas da população saudável foram de 0,0023% e 0,0030% de células (0,0000% a 0,0265% e 0,0000% a 0,0200%, respectivamente). No grupo de portadores de FC, as medianas de CEPs encontradas nas aquisições 1 e 2 foram de 0,0012% e 0,0015% de células (0,0000% a 0,0344% e 0,0000% a 0,0356%, respectivamente). Já na CB, as medianas de CEPs encontradas nas aquisições 1 e 2 foram 0,0033% e 0,0028% de células (0,0000% a 3,7587% e 0,0000% a 3,7600% respectivamente). Na FA da doença, as medianas de CEPs encontradas nas aquisições 1 e 2 foram de 0,0023% e 0,0018% de células (0,0000% a 0,0586% e 0,0000% a 0,0540%, respectivamente). As medianas de CEMs encontradas nas aquisições 1 e 2 da população saudável foram de 0,0022% e 0,0041% (0,0000% a 0,0330% e 0,0000% a 0,0290%, respectivamente). Nos portadores de FC da doença, a mediana de CEMs das aquisições 1 e 2 foram de 0,0033% e 0,0021% de células (0,0000% a 0,1213% e 0,0000% a 0,0607%, respectivamente). As medianas de CEMs encontradas na CB da doença, nas aquisições 1 e 2 foram de 0,0056% e 0,0050% de células (0,0000% a 0,0430% e 0,0000% a 0,0264%, respectivamente) e finalmente as medianas encontradas nas aquisições 1 e 2 na FA da doença foram de

0,0023% e 0,0020% de células (0,0000% a 0,0430% e 0,0000% a 0,0264%, respectivamente).

Tabela 8 - Análise das aquisições em duplicata das CEP e CEM nos grupos estudados.

Células Endoteliais Progenitoras			
Medianas (%)			
Populações	1ª Aquisição	2ª Aquisição	*p
Controle	0,0023	0,0030	p = 0,7011
Fase Crônica	0,0012	0,0015	p = 0,7672
Crise Blástica	0,0033	0,0028	p = 0,1024
Fase Acelerada	0,0023	0,0018	p = 0,1453
Células Endoteliais Maduras			
Medianas (%)			
Populações	1ª Aquisição	2ª Aquisição	*p
Controle	0,0022	0,0041	p = 0,2342
Fase Crônica	0,0033	0,0021	p = 0,1453
Crise Blástica	0,0056	0,0050	p = 0,1088
Fase Acelerada	0,0023	0,0020	p = 0,4774

* Teste não paramétrico pareado de Wilcoxon

Em pacientes com LMC em CB, a mediana das CECs foi de 0,0146% e no grupo controle foi de 0,0059% (p = 0,0120), devido ao aumento de

CEMs ($p < 0,01$). Da mesma forma, a quantificação de CECs de LMC em CB (mediana 0,0146%) foi superior à encontrada em LMC FA, com mediana de 0,0059% ($p < 0,01$), às custas de CEMs ($p = 0,0103$) (tabela 9).

Tabela 9 – Análise da quantificação das CECs e subtipos, em portadores de LMC e grupo saudável

Grupos	CEC	CEM	CEP	CEC ativada
	*p	*p	*p	*p
Doadores vs FC	0,3387	0,1302		
Doadores vs CB	0,0120	<0,01		
Doadores vs FA	0,5901	0,8114	0,1769	0,0987
FC vs CB	0,1296	0,1271		
FC vs FA	0,1804	0,2561		
CB vs FA	<0,01	0,0103		

*Teste não paramétrico para amostras independentes de Kruskal-Wallis

Utilizando os resultados obtidos de CEC e subtipos no grupo controle, definimos os valores de normalidade na população brasileira, ainda não relatados na literatura. Os dados estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 – Valores de Normalidade de CEC e subtipos, segundo grupo saudável

	Valor Observado	Valor Médio	Desvio padrão
Sem considerar o Sexo			
CEP	0,00225	0,002466	0,0005369
CEM	0,00220	0,002769	0,0008508
CEC ativadas	0,00210	0,001956	0,0004354
CEC	0,00585	0,006376	0,001619
Levando em consideração somente o sexo feminino			
CEP	0,00210	0,002404	0,001049
CEM	0,00210	0,001868	0,0004688
CEC ativadas	0,00210	0,001820	0,0006112
CEC	0,00420	0,004626	0,001800
Levando em consideração somente o sexo masculino			
CEP	0,00230	0,002602	0,0007023
CEM	0,00520	0,004876	0,0007916
CEC ativadas	0,00220	0,002133	0,000630
CEC	0,00760	0,008171	0,001971

Teste de reamostragem – bootstrap

5.2 Análise da eficiência do PCR em tempo real

5.2.1 hSecurina, VEGF E GUSB

Para a análise de eficiência foram realizadas diluições seriadas do RNA das células KG1 nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng para realização de PCR em tempo real. Essas concentrações escolhidas devem-se ao fato de que a concentração de uso nos experimentos foi 50ng. As amostras foram amplificadas em duplicata.

As figuras 19, 20 e 21 demonstram a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNA. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Desta forma a eficiência de amplificação dos genes hSecurina foi 99%, VEGF 98% e GUSB 99%.

Figura 19. Curva de eficiência para o gene hSecurina

Figura 20. Curva de eficiência para o gene VEGF

Figura 21. Curva de eficiência para o gene endógeno Gusb

5.3 VEGF

Observamos aumento da expressão do gene VEGF na FC (mediana de 0,330 e $p < 0,01$), FA (mediana de 0,320 e $p < 0,01$) e CB (mediana de 0,245 e $p < 0,04$) quando comparados com grupo controle que apresentou mediana de 0,145. A análise comparativa do grupo CB demonstrou aumento significativo na CB mielóide em relação à CB linfóide ($p < 0,01$) (tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Valores de mediana e desvio-padrão dos grupos estudados para o gene VEGF

Grupos	Mediana	Desvio-Padrão
Saudáveis	0,145	0,1461
FC	0,330	0,2719
FA	0,320	0,7083
CB	0,245	0,5249

Tabela 12 - Análise do gene VEGF nos portadores de LMC e grupo saudável

Grupo Comparados	*p
Saudáveis vs FC	<0,01
Saudáveis vs FA	<0,01
Saudáveis vs CB	0,04
FC vs FA	0,82
FC vs CB	0,52
FA vs CB	0,65

*Teste não paramétrico para amostras independentes de Kruskal-Wallis

5.4 hSecurina

Encontramos aumento significativo da expressão do gene hsecurina na CB, com mediana de 0,390 em relação aos grupos controle com mediana de 0,125 ($p < 0,01$) e FA, com mediana de 0,230 ($p = 0,04$). Os pacientes na FC da doença apresentaram mediana de 0,260 e $p = 0,03$ quando comparados com o grupo controle (tabelas 13 e 14).

Tabela 13 – Valores de mediana e desvio-padrão dos grupos estudados para o gene hSecurina

Grupos	Mediana	Desvio-Padrão
Saudáveis	0,125	0,1660
FC	0,260	0,2484
FA	0,225	0,8723
CB	0,390	0,3699

Tabela 14 - Análise do gene hSecurina nos portadores de LMC e grupo saudável

Grupo Comparados	*p
Saudáveis vs FC	0,03
Saudáveis vs FA	0,09
Saudáveis vs CB	<0,01
FC vs FA	0,65
FC vs CB	0,09
FA vs CB	0,04

*Teste não paramétrico para amostras independentes de Kruskal-Wallis

6. DISCUSSÃO

Em nosso estudo observamos aumento significativo da porcentagem de CECs às custas de CEM e da hiperexpressão dos genes hSecurina e VEGF no sangue periférico de pacientes com LMC em CB. Entretanto, na FC detectamos elevação significativa somente dos genes hSecurina e VEGF. Por outro lado, na FA encontramos apenas hiperexpressão do gene VEGF.

A hipótese inicial do nosso estudo era de encontrar aumento significativo de CECs em sangue periférico às custas de CEPs na CB da LMC. Este aumento estaria relacionado ao maior calibre vascular observado nesta fase, em consequência da formação neovascular e do aumento da densidade microvascular no microambiente da medula óssea, o que está diretamente associado à mobilização de CEPs (Korkolopoulou et al., 2003; Musolino et al., 2002). Entretanto, essa hipótese não foi confirmada em nosso estudo. O aumento de CEC em sangue periférico às custas de CEM na CB da LMC observado em nossos resultados nos leva a crer que este subtipo de CEC pode ter sido derivado da mobilização de vasos recém-formados ou até recrutados de vasos vizinhos para neoangiogênese, com liberação de CEM. Este evento foi demonstrado em modelos tumorais em murinos. (Rafii et al., 2002).

Para corroborar os achados das CECs utilizamos a análise da expressão gênica de VEGF. Este fator de crescimento tem importante papel como mediador da angiogênese e está relacionado à patogênese de neoplasias mielóides, incluindo a LMC (Krauth et al., 2004). No entanto,

observamos aumento de VEGF em todas as fases da LMC. Estudos anteriores corroboram nossos resultados por demonstrar que as células malignas da LMC hiperexpressam VEGF. Desta forma, este marcador não tem se mostrado útil para discriminar as diversas fases da LMC. Entretanto, observamos aumento significativo de VEGF na CB mielóide em relação à CB linfóide corroborando os resultados obtidos por Krauth et al. Estes autores sugerem que o melhor prognóstico das LMC em CB linfóide, está associado ao fato de apresentarem menor atividade angiogênica, em comparação com os casos de CB mielóide (Krauth et al., 2004).

Em 2004, Auner et al, demonstraram associação entre hiperangiogênese e hiperexpressão da proteína hSecurina. De acordo com esta hipótese, a hiperexpressão de hSecurina poderia estimular a síntese do fator básico de crescimento de fibroblastos, ocasionando a migração e a proliferação de CEC, potencializando a angiogênese (Auner et al., 2004; Ishikawa et al., 2001). Assim, investigamos a expressão do gene hSecurina para entender o processo angiogênico e confrontar com os valores de CECs e do gene VEGF. Observamos aumento significativo do gene hSecurina na FC e CB da LMC. O aumento deste gene na FC pode estar relacionado à elevação da taxa de proliferação celular, como sugerido por Auner et al (Auner et al., 2004). Em 2009, Patel e Gordon observaram aumento da proteína separase em FC e CB da LMC. Este estudo não teve como objetivo investigar os motivos pelo qual este aumento foi detectado, mas sim a relação com reguladores chaves do ciclo celular, principalmente os

centrossomos. Acreditamos que este aumento está diretamente relacionado ao nosso achado, pois a separase só é liberada após degradação da securina. Desta forma, acreditamos que o aumento do gene hSecurina, observado em nosso estudo, poderia estar envolvido com a liberação e o aumento dos níveis de separase observados por Patel e Gordon. O aumento da separase pode causar anormalidades centrossomais, contribuindo para instabilidade genômica, o que não foi avaliado em nosso estudo (Patel e Gordon, 2009). Estudos correlacionando as diversas fases da LMC e o comportamento aneuplóide de suas respectivas células neoplásicas poderiam ser realizados com intuito de se avaliar o real significado desta alteração na evolução da LMC.

Observamos neste estudo que a quantificação de CEC é uma ferramenta útil para prever e identificar precocemente a progressão da LMC para CB utilizando amostra de sangue periférico, diferentemente da variável VEGF que se mostrou elevada em todas as fases.

Apesar dos resultados significativos observados em nosso estudo, acreditamos ser importante a realização de estudo prospectivo com seguimento do paciente desde o diagnóstico e durante o tratamento para quantificar a porcentagem de CEC e a expressão dos genes VEGF e hSecurina, assim como o monitoramento destas variáveis. Assim, poderíamos acompanhar qualquer variação desses resultados e o impacto destas variáveis na progressão entre as fases da LMC. Além disso, com este estudo poderíamos avaliar e entender melhor o comportamento destas

variáveis frente aos pacientes refratários ao tratamento, tendo em vista mais uma ferramenta para tentar auxiliar no tratamento.

7. CONCLUSÃO

Células Endoteliais Circulantes

1) Observamos aumento estatisticamente significativo de CEC em portadores de LMC em CB quando comparado ao grupo controle, às custas de CEM;

2) Observamos aumento estatisticamente significativo de CEC em portadores de LMC em CB quando comparados à LMC em FA, às custas de CEM;

3) Não observamos diferenças estatisticamente significativas de CEC e subtipos em LMC nas fases crônica e acelerada quando comparadas entre si e grupo saudável;

4) CEC ativadas e precursoras não apresentaram diferença estatística em nenhum dos grupos analisados.

Gene VEGF

1) Portadores de LMC nas fases crônica e acelerada e CB apresentaram aumento estatisticamente significativo do gene VEGF quando comparados com grupo saudável;

2) Não observamos diferença estatisticamente significativa do gene VEGF quando comparados com FC, FA e CB;

3) LMC em CB mielóide apresentou aumento estatisticamente significativo do gene VEGF em relação à CB linfóide.

Gene hSecurina

1) Portadores de LMC em FC e CB apresentaram aumento estatisticamente significativo do gene hsecurina quando comparados com grupo saudável;

2) Observamos aumento estatisticamente significativo do gene hSecurina em LMC em CB quando comparados com portadores de LMC em FA;

3) Portadores de LMC em FA não apresentaram diferença estatisticamente significativa para o gene hSecurina quando comparado com os grupos saudável e LMC em FC.

Células endoteliais circulantes e genes VEGF e hSecurina

1) Portadores de LMC em CB apresentaram aumento estatisticamente significativo para as três variáveis estudadas;

2) A FC da LMC apresentou aumento estatisticamente significativo de hSecurina e VEGF;

3) Na FA da LMC observamos aumento estatisticamente significativo da variável VEGF.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M Ž F Ž
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP.....TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M Ž F Ž
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO:..... CIDADE:
- CEP..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : “Quantificação de Células Endoteliais Circulantes em Portadores de Leucemia Mielóide Crônica por Citometria de Fluxo”.

PESQUISADOR: **Profa. Dra. Juliana Pereira**

CARGO/FUNÇÃO: **Médica**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **73746**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Hematologia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO(X)

RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO ()

RISCO MAIOR () Ž

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:**1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:**

O (a) Sr. (a) está convidado (a) a participar de uma pesquisa em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica, com ou sem tratamento, para que possamos quantificar as células endotéliais, nos diferentes estágios da doença, utilizando uma técnica chamada “Citometria de Fluxo”.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Será coletado sangue de uma veia localizada no antebraço. Para isso, será inicialmente passado algodão com álcool no local, depois será utilizado um elástico para garrotear o braço e o sangue será coletado com agulha e seringa descartáveis. Após a coleta o(a) Senhor(a) deverá pressionar o local com algodão por algum tempo para não haver o aparecimento de uma mancha roxa. Este sangue coletado será utilizado para a realização da pesquisa.

3. Desconfortos e riscos esperados:

O risco de hematomas e dor no local da punção não poderá ser descartado, se houver compressão inadequada no local.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

O(a) Sr(a) ajudará no desenvolvimento de um exame diagnóstico, que talvez possa auxiliar no diagnóstico da Leucemia Mielóide Crônica nas diferentes fases.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não existe a necessidade de optar por um procedimento alternativo, decorrente da simplicidade do procedimento utilizado.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Caso o(a) Senhor(a) tenha dúvidas ou precise de informações sobre a pesquisa favor entrar em contato com o Laboratório de Imunopatologia pelo telefone (11) 3061-5544 ramal 339, falar com Dra. Juliana Pereira, Dra. Beatriz Beitler de Maurino, Dra. Gracia Martinez ou Carla Rosa T. de Godoy nos períodos da manhã ou da tarde.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

O(a) Senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. O(a) Senhor(a) não será prejudicado por não querer mais fazer parte da pesquisa.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Todas as informações obtidas para o desenvolvimento da pesquisa serão confidenciais, respeitando a sua privacidade.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Caso haja danos à sua saúde por causa da pesquisa, o Senhor(a) receberá assistência através do Ambulatório do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HCFMUSP e Hospital Dia.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

O estudo prevê apenas a coleta de sangue e, deste modo, não implica em danos à saúde do(a) Sr(a) ou indenização.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso o(a) Senhor(a) tenha dúvidas ou queira maiores informações sobre a pesquisa, estaremos a disposição através do telefone (11) 3061-5544 ramal 339. Favor falar com Dra. Juliana Pereira, Dra. Beatriz Beitler de Maurino, Dra. Gracia Martinez ou Carla Rosa T. de Godoy.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20____.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“Quantificação de Células Endoteliais Circulantes em portadores de Leucemia Mielóide Crônica por citometria de fluxo”**

PESQUISADOR: **Profa. Dra. Juliana Pereira**

CARGO/FUNÇÃO: **Médica**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: **CRM 73746**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Hematologia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O(a) Sr(a) está convidado a participar de uma pesquisa, para que possamos quantificar um gene chamado hSecurina, utilizando uma técnica chamada “PCR quantitativo em Tempo Real”. Sua amostra será usada como controle saudável.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: O procedimento realizado para o desenvolvimento da pesquisa será feito em amostra de sangue da veia. Depois da coleta será extraído RNA das células e realizada uma série de procedimentos. Depois de processado esse RNA será colocado em uma máquina onde será concluído o resultado.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: Será coletado sangue de uma veia do antebraço. Para isso, será passado um algodão com álcool no local, depois será utilizado um elástico para garrotear o braço e o sangue será coletado com agulha e seringa descartáveis. Após a coleta o(a) Sr(a) deverá pressionar o local com algodão para evitar o aparecimento de mancha roxa.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: O risco de hematomas e dor local da punção não poderá ser descartado, se houver compressão inadequada no local.

5 – Benefícios para o participante: O(a) Sr(a) ajudará no desenvolvimento de um exame diagnóstico mas, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não existe a necessidade de optar por um procedimento alternativo, decorrente da simplicidade do procedimento utilizado.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o Sr. terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Juliana Pereira, que pode ser encontrada

no endereço: Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, sala 61, bloco 4, tel: (11) 3061-5544 ramal 339. Se o Sr. tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

09 – **Direito de confidencialidade:** As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros controles saudáveis, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Quantificação de Células Endoteliais Circulantes em portadores de Leucemia Mielóide Crônica por citometria de fluxo”**

Eu discuti com a Dra Juliana Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do doador/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

ANEXO C

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES, EM DUPLICATA, DE CEPs E
CEMs NOS INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
1	GRG	F	24	0,0000	0,0000	0,0031	0,0000
2	GCSC	F	30	0,0000	0,0010	0,0013	0,0050
3	FJNZ	F	26	0,0000	0,0010	0,0111	0,0090
4	IPS	F	35	0,0060	0,0028	0,0060	0,0081
5	DFT	M	50	0,0037	0,0030	0,0062	0,0075
6	AC	M	57	0,0056	0,0020	0,0067	0,0000
7	GAB	F	29	0,0010	0,0009	0,0021	0,0063
8	ALLPM	F	30	0,0012	0,0010	0,0023	0,0046
9	AV	M	57	0,0064	0,0070	0,0042	0,0051
10	DRW	F	41	0,0086	0,0070	0,0021	0,0084
11	ACMBS	F	28	0,0033	0,0040	0,0000	0,0000
12	AFP	F	31	0,0011	0,0010	0,0000	0,0000
13	CAS	M	56	0,0000	0,0050	0,0159	0,0198
14	CCS	M	32	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
15	DAL	M	30	0,0038	0,0020	0,0009	0,0036
16	DU	F	46	0,0039	0,0040	0,0000	0,0000
17	DGF	M	41	0,0123	0,0120	0,0146	0,0146
18	JCG	M	63	0,0265	0,0200	0,0265	0,0265
19	JRO	M	49	0,0126	0,0130	0,0052	0,0080
20	JOD	F	30	0,0212	0,0200	0,0021	0,0063
21	LMMR	F	51	0,0037	0,0040	0,0010	0,0040
22	MBSR	F	52	0,0010	0,0020	0,0021	0,0000
23	MCS	F	55	0,0246	0,0190	0,0045	0,0090
24	MHPR	F	61	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
25	MJGLLM	F	52	0,0110	0,0080	0,0000	0,0000
26	OM	M	61	0,0000	0,0000	0,0330	0,0290
27	RAL	M	45	0,0095	0,0080	0,0042	0,0000
28	RAS	F	40	0,0020	0,0059	0,0010	0,0030
29	SMS	F	29	0,0110	0,0080	0,0011	0,0011

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
30	SMC	F	29	0,0031	0,0080	0,0010	0,0040
31	TR	F	49	0,0000	0,0030	0,0044	0,0000
32	VAVS	F	20	0,0010	0,0030	0,0021	0,0063
33	VN	F	40	0,0140	0,0120	0,0042	0,0042
34	WM	M	47	0,0044	0,0030	0,0011	0,0011
35	YMG	F	47	0,0034	0,0000	0,0011	0,0022
36	RML	M	29	0,0053	0,0050	0,0011	0,0011
37	MCS	F	70	0,0021	0,0079	0,0021	0,0000
38	DMR	F	79	0,0010	0,0000	0,0175	0,0175
39	JCPF	M	37	0,0010	0,0001	0,0052	0,0061
40	IFA	M	35	0,0022	0,0022	0,0110	0,0110
41	OS	M	54	0,0022	0,0000	0,0033	0,0066
42	NA	M	49	0,0011	0,0020	0,0021	0,0021
43	LMK	M	57	0,0023	0,0046	0,0000	0,0000
44	AV	M	59	0,0031	0,0031	0,0052	0,0075

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP	2CEP	1CEM	2CEM
				%	%	%	%
45	LCOV	M	46	0,0022	0,0030	0,0054	0,0054
46	CRMO	M	36	0,0024	0,0000	0,0225	0,0225
47	WJD	M	19	0,0000	0,0080	0,0052	0,0052
48	MAG	M	52	0,0022	0,0030	0,0054	0,0000
49	NNF	M	65	0,0010	0,0050	0,0021	0,0021
50	JCTG	M	66	0,0010	0,0015	0,0021	0,0021

CEP: Célula endotelial precursor; CEM: Célula endotelial madura

ANEXO D

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES, EM DUPLICATA, DE CEPs E
CEMs EM PORTADORES DE LMC EM FC**

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
1	ORA	M	53	0,0021	0,0010	0,0083	0,0042
2	HMT	F	70	0,0012	0,0015	0,0082	0,0000
3	EP	M	68	0,0034	0,0029	0,0125	0,0250
4	EAG	M	60	0,0083	0,0090	0,0280	0,0000
5	MHRAC	F	51	0,0071	0,0080	0,0061	0,0061
6	NCM	F	69	0,0011	0,0009	0,0022	0,0088
7	MSF	M	54	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000
8	SMJ	F	63	0,0021	0,0010	0,0189	0,0095
9	DEKL	F	44	0,0021	0,0015	0,0032	0,0032
10	APF	M	56	0,0000	0,0000	0,0085	0,0000
11	LLC	F	63	0,0000	0,0000	0,0090	0,0270
12	NPS	F	40	0,0000	0,0000	0,0027	0,0027
13	MLSO	F	43	0,0211	0,0220	0,0000	0,0000
14	OSC	F	82	0,0000	0,0000	0,0138	0,0069

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
15	VB	M	52	0,0011	0,0022	0,0077	0,0154
16	ALF	M	77	0,0032	0,0010	0,0085	0,0000
17	LCJA	M	26	0,0022	0,0010	0,0033	0,0000
18	SAS	F	27	0,0011	0,0015	0,0023	0,0069
19	AAVG	F	51	0,0011	0,0020	0,0022	0,0000
20	RSR	M	50	0,0011	0,0012	0,0057	0,0000
21	ASF	M	73	0,0167	0,0149	0,0010	0,0030
22	MOM	F	29	0,0031	0,0010	0,0015	0,0015
23	WRJ	M	54	0,0103	0,0115	0,0011	0,0011
24	EMH	M	47	0,0011	0,0018	0,0083	0,0000
25	JGTS	M	34	0,0030	0,0025	0,0021	0,0042
26	AP	F	52	0,0012	0,0015	0,0010	0,0010
27	ALL	F	27	0,0000	0,0000	0,0011	0,0011
28	AC	M	52	0,0000	0,0009	0,0021	0,0000
29	AP	M	69	0,0011	0,0008	0,0021	0,0021

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
30	SFS	M	33	0,0344	0,0356	0,1213	0,0607
31	VDC	M	19	0,0056	0,0056	0,0142	0,0142

CEP: Célula endotelial precursora; CEM: Célula endotelial madura

ANEXO E

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES, EM DUPLICATA, DE CEPs E
CEMs NOS PORTADORES DE LMC EM CB**

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
1	MFSM	F	43	0,0172	0,0160	0,0053	0,0106
2	VB	M	52	3,7587	3,7600	0,0100	0,0100
3	APM	F	74	0,0035	0,0020	0,0141	0,0423
4	RPS	M	31	0,1011	0,1010	0,3642	0,3642
5	JIS	M	40	0,0044	0,0045	0,0121	0,0061
6	RCJMR	M	55	0,0022	0,0020	0,0281	0,0281
7	MTMB	F	50	0,0196	0,0200	0,0041	0,0000
8	JRPJ	M	38	0,0012	0,0011	0,0059	0,0059
9	SMJ	F	70	0,0010	0,0010	0,0124	0,0124
10	NCT	F	57	0,2407	0,2400	0,1976	0,0988
11	RAR	M	51	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000
12	APSF	M	53	0,0000	0,0000	0,0033	0,0099
13	JLS	M	35	0,2437	0,2450	0,8766	0,8766
14	FES	M	20	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
15	JPF	F	59	0,0000	0,0000	0,0044	0,0044
16	EMF	F	66	0,0029	0,0028	0,0085	0,0000
17	AJS	M	34	0,7381	0,7300	0,0033	0,0000
18	LMS	F	53	0,0041	0,0040	0,0072	0,0060
19	FAF	M	24	0,0020	0,0018	0,0000	0,0000
20	AORP	M	53	0,0022	0,0019	0,0056	0,0050
21	NM	M	67	0,0182	0,0180	0,0000	0,0000
22	SMAL	F	58	0,0033	0,0030	0,0085	0,0080
23	FSS	F	30	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

CEP: Célula endotelial precursor; CEM: Célula endotelial madura

ANEXO F

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES, EM DUPLICATA, DE CEPs E
CEMs NOS PORTADORES DE LMC EM FA**

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
1	FCC	F	65	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000
2	JRA	M	59	0,0000	0,0000	0,0430	0,0215
3	CFD	M	27	0,0000	0,0000	0,0046	0,0015
4	EMF	F	66	0,0020	0,0015	0,0100	0,0000
5	ECP	F	57	0,0010	0,0020	0,0053	0,0212
6	ZS	F	81	0,0586	0,0540	0,0018	0,0018
7	VSO	F	62	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000
8	MGJS	F	78	0,0044	0,0040	0,0016	0,0005
9	JRG	M	58	0,0082	0,0090	0,0035	0,0035
10	MN	M	55	0,0047	0,0050	0,0011	0,0000
11	RGSA	M	40	0,0000	0,0000	0,0068	0,0068
12	JFR	M	61	0,0022	0,0035	0,0012	0,0012
13	RMR	M	36	0,0028	0,0010	0,0025	0,0050
14	UPF	F	42	0,0060	0,0040	0,0012	0,0012

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
15	ASC	F	53	0,0024	0,0030	0,0012	0,0000
16	BAM	M	79	0,0036	0,004	0,0012	0,0000
17	JPF	F	59	0,0000	0,0000	0,0014	0,0014
18	LFB	M	26	0,0033	0,0010	0,0010	0,0000
19	LLS	F	63	0,0078	0,0069	0,0135	0,0068
20	ESF	M	52	0,0000	0,0000	0,0066	0,0264
21	GBCA	F	46	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022
22	AMN	M	55	0,0024	0,0038	0,0100	0,0100
23	MFM	M	59	0,0030	0,0022	0,0041	0,0164
24	RRS	M	57	0,0010	0,0011	0,0011	0,0033
25	MMM	F	57	0,0000	0,0000	0,0022	0,0022
26	RVM	F	59	0,0072	0,0069	0,0189	0,0189
27	JAV	M	59	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
28	FVS	M	37	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000
29	MECR	F	67	0,0080	0,0071	0,0041	0,0041

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	1CEP %	2CEP %	1CEM %	2CEM %
30	TG	M	45	0,0049	0,0036	0,0114	0,0038

CEP: Célula endotelial precursor; CEM: Célula endotelial madura

ANEXO G

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CEPs NOS PORTADORES
DE LMC EM FC**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
1	ORA	M	53	0,0010	0,0073	0,0083
2	HMT	F	70	0,0012	0,0061	0,0073
3	EP	M	68	0,0012	0,0035	0,0047
4	EAG	M	60	0,0000	0,0052	0,0052
5	MHRAC	F	51	0,0010	0,0010	0,0020
6	NCM	F	69	0,0000	0,0000	0,0000
7	MSF	M	54	0,0000	0,0000	0,0000
8	SMJ	F	63	0,0010	0,0095	0,0105
9	DEKL	F	44	0,0022	0,0022	0,0044
10	APF	M	56	0,0000	0,0013	0,0013
11	LLC	F	63	0,0000	0,0044	0,0044
12	NPS	F	40	0,0000	0,0000	0,0000
13	MLSO	F	43	0,0000	0,0112	0,0112
14	OSC	F	82	0,0021	0,0210	0,0231

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
15	VB	M	52	0,0055	0,0033	0,0088
16	ALF	M	77	0,0011	0,0032	0,0043
17	LCJA	M	26	0,0000	0,0000	0,0000
18	SAS	F	27	0,0024	0,0024	0,0048
19	AAVG	F	51	0,0011	0,0000	0,0011
20	RSR	M	50	0,0000	0,0067	0,0067
21	ASF	M	73	0,0073	0,0094	0,0167
22	MOM	F	29	0,0031	0,0000	0,0031
23	WRJ	M	54	0,0080	0,0023	0,0103
24	EMH	M	47	0,0000	0,0011	0,0011
25	JGTS	M	34	0,0010	0,0020	0,0030
26	AP	F	52	0,0000	0,0012	0,0012
27	ALL	F	27	0,0000	0,0000	0,0000
28	AC	M	52	0,0000	0,0000	0,0000
29	AP	M	69	0,0000	0,0011	0,0011

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
30	SFS	M	33	0,0080	0,0264	0,0344
31	VDC	M	19	0,0011	0,0045	0,0056

CEP: Célula endotelial precursora

ANEXO H

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CEPs NOS PORTADORES DE
LMC EM CB**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
1	MFSM	F	43	0,0011	0,0161	0,0172
2	VB	M	52	0,0021	3,7566	3,7587
3	APM	F	74	0,0000	0,0035	0,0035
4	RPS	M	31	0,0000	0,1011	0,1011
5	JIS	M	40	0,0022	0,0022	0,0044
6	RCJMR	M	55	0,0011	0,0011	0,0022
7	MTMB	F	50	0,0098	0,0098	0,0196
8	JRPJ	M	38	0,0000	0,0012	0,0012
9	SMJ	F	70	0,0000	0,0010	0,0010
10	NCT	F	57	0,0101	0,2306	0,2407
11	RAR	M	51	0,0000	0,0000	0,0000
12	APSF	M	53	0,0000	0,0000	0,0000
13	JLS	M	35	0,0623	0,1814	0,2437
14	FES	M	20	0,0000	0,0000	0,0000

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
15	JPF	F	59	0,0000	0,0000	0,0000
16	EMF	F	66	0,0000	0,0029	0,0029
17	AJS	M	34	0,0034	0,7347	0,7381
18	LMS	F	53	0,0010	0,0031	0,0041
19	FAF	M	24	0,0010	0,0010	0,0020
20	AORP	M	53	0,0022	0,0000	0,0022
21	NM	M	67	0,0109	0,0073	0,0182
22	SMAL	F	58	0,0000	0,0033	0,0033
23	FSS	F	30	0,0000	0,0000	0,0000

CEP: Célula endotelial precursora

ANEXO I

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CEPs NOS PORTADORES
DE LMC EM FA**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
1	FCC	F	65	0,0000	0,0000	0,0000
2	JRA	M	59	0,0000	0,0000	0,0000
3	CFD	M	27	0,0000	0,0000	0,0000
4	EMF	F	66	0,0000	0,0020	0,0020
5	ECP	F	57	0,0000	0,0010	0,0010
6	ZS	F	81	0,0069	0,0517	0,0586
7	VSO	F	62	0,0012	0,0000	0,0012
8	MGJS	F	78	0,0000	0,0044	0,0044
9	JRG	M	58	0,0046	0,0036	0,0082
10	MN	M	55	0,0035	0,0012	0,0047
11	RGSA	M	40	0,0000	0,0000	0,0000
12	JFR	M	61	0,0011	0,0011	0,0022
13	RMR	M	36	0,0028	0,0000	0,0028
14	UPF	F	42	0,0048	0,0012	0,0060

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD345	CEP Total%
15	ASC	F	53	0,0012	0,0012	0,0024
16	BAM	M	79	0,0012	0,0024	0,0036
17	JPF	F	59	0,0000	0,0000	0,0000
18	LFB	M	26	0,0011	0,0022	0,0033
19	LLS	F	63	0,0000	0,0078	0,0078
20	ESF	M	52	0,0000	0,0000	0,0000
21	GBCA	F	46	0,0000	0,0000	0,0000
22	AMN	M	55	0,0000	0,0024	0,0024
23	MFM	M	59	0,0010	0,0020	0,0030
24	RRS	M	57	0,0010	0,0000	0,0010
25	MMM	F	57	0,0000	0,0000	0,0000
26	RVM	F	59	0,0000	0,0072	0,0072
27	JAV	M	59	0,0000	0,0000	0,0000
28	FVS	M	37	0,0000	0,0000	0,0000
29	MECR	F	67	0,0000	0,0080	0,0080

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP CD133%	CEP CD34%	CEP Total%
30	TG	M	45	0,0000	0,0049	0,0049

CEP: Célula endotelial precursora

ANEXO J

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CECs NOS INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS**

N	Inicias	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
1	GRG	F	24	0,0000	0,0031	0,0021	0,0031	6.200
2	GCSC	F	30	0,0000	0,0013	0,0013	0,0013	6.300
3	FJNZ	F	26	0,0000	0,0111	0,0000	0,0111	7.900
4	IPS	F	35	0,0060	0,0060	0,0048	0,0120	5.000
5	DFT	M	50	0,0037	0,0062	0,0075	0,0099	5.400
6	AC	M	57	0,0056	0,0067	0,0011	0,0123	6.500
7	GAB	F	29	0,0010	0,0021	0,0010	0,0031	5.900
8	ALLP M	F	30	0,0012	0,0023	0,0035	0,0035	7.200
9	AV	M	57	0,0064	0,0042	0,0011	0,0106	4.500
10	DRW	F	41	0,0086	0,0021	0,0043	0,0107	6.000
11	ACMB S	F	28	0,0033	0,0000	0,0000	0,0033	7.700
12	AFP	F	31	0,0011	0,0000	0,0000	0,0011	8.000
13	CAS	M	56	0,0000	0,0159	0,0053	0,0159	5.400
14	CCS	M	32	0,0013	0,0000	0,0000	0,0013	6.000

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm³
15	DAL	M	30	0,0038	0,0009	0,0000	0,0047	6.000
16	DU	F	46	0,0039	0,0000	0,0013	0,0039	7.200
17	DGF	M	41	0,0123	0,0146	0,0023	0,0269	7.200
18	JCG	M	63	0,0265	0,0265	0,0133	0,0530	6.200
19	JRO	M	49	0,0126	0,0052	0,0094	0,0178	4.500
20	JOD	F	30	0,0212	0,0021	0,0053	0,0233	7.000
21	LMMR	F	51	0,0037	0,0010	0,0082	0,0047	5.300
22	MBSR	F	52	0,0010	0,0021	0,0021	0,0031	7.000
23	MCS	F	55	0,0246	0,0045	0,0034	0,0291	4.200
24	MHPR	F	61	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	5.600
25	MJGLLM	F	52	0,0110	0,0000	0,0057	0,0110	4.500
26	OM	M	61	0,0000	0,0330	0,0016	0,0330	7.000
27	RAL	M	45	0,0095	0,0042	0,0010	0,0137	8.100
28	RAS	F	40	0,0020	0,0010	0,0010	0,0030	7.100
29	SMS	F	29	0,0110	0,0011	0,0011	0,0121	7.400

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm³
30	SMC	F	29	0,0031	0,0010	0,0031	0,0041	9.900
31	TR	F	49	0,0000	0,0044	0,0022	0,0044	5.000
32	VAVS	F	20	0,0010	0,0021	0,0010	0,0031	6.300
33	VN	F	40	0,0140	0,0042	0,0021	0,0182	7.200
34	WM	M	47	0,0044	0,0011	0,0022	0,0055	5.500
35	YMG	F	47	0,0034	0,0011	0,0011	0,0045	6.000
36	RML	M	29	0,0053	0,0011	0,0011	0,0064	6.400
37	MCS	F	70	0,0021	0,0021	0,0000	0,0042	6.000
38	DMR	F	79	0,0010	0,0175	0,0109	0,0185	4.200
39	JCPF	M	37	0,0010	0,0052	0,0031	0,0062	7.400
40	IFA	M	35	0,0022	0,0110	0,0044	0,0132	6.700
41	OS	M	54	0,0022	0,0033	0,0022	0,0055	4.600
42	NA	M	49	0,0011	0,0021	0,0021	0,0032	8.500
43	LMK	M	57	0,0023	0,0000	0,0000	0,0023	3.800
44	AV	M	59	0,0031	0,0052	0,0010	0,0083	5.000

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm³
45	LCOV	M	46	0,0022	0,0054	0,0032	0,0076	4.900
46	CRMO	M	36	0,0024	0,0225	0,0095	0,0249	3.100
47	WJD	M	19	0,0000	0,0052	0,0031	0,0052	9.200
48	MAG	M	52	0,0022	0,0054	0,0043	0,0076	6.300
49	NNF	M	65	0,0010	0,0021	0,0010	0,0031	7.000
50	JCTG	M	66	0,0010	0,0021	0,0010	0,0031	5.000

CEP: Célula endotelial precursora; CEM: Célula endotelial madura; aCEC: Célula endotelial circulante ativada; CEC: Célula endotelial circulante; GB: glóbulos brancos

ANEXO K

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CECs NOS PORTADORES
DE LMC EM FC**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm³
1	ORA	M	53	0,0083	0,0083	0,0010	0,0166	195.000
2	HMT	F	70	0,0073	0,0082	0,0000	0,0155	18.680
3	EP	M	68	0,0047	0,0125	0,0091	0,0172	4.900
4	EAG	M	60	0,0052	0,0280	0,0135	0,0332	55.000
5	MHRAC	F	51	0,0020	0,0061	0,0020	0,0081	56.600
6	NCM	F	69	0,0000	0,0022	0,0011	0,0022	25.200
7	MSF	M	54	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12.300
8	SMJ	F	63	0,0105	0,0189	0,0105	0,0294	369.000
9	DEKL	F	44	0,0044	0,0032	0,0010	0,0076	12.900
10	APF	M	56	0,0013	0,0085	0,0000	0,0098	4.500
11	LLC	F	63	0,0044	0,0090	0,0020	0,0134	49.200
12	NPS	F	40	0,0000	0,0027	0,0000	0,0027	21.300
13	MLSO	F	43	0,0112	0,0000	0,0106	0,0112	6.200
14	OSC	F	82	0,0231	0,0138	0,0011	0,0369	99.200

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
15	VB	M	52	0,0088	0,0077	0,0022	0,0165	7.800
16	ALF	M	77	0,0043	0,0085	0,0011	0,0128	32.800
17	LCJA	M	26	0,0000	0,0033	0,0000	0,0033	20.300
18	SAS	F	27	0,0048	0,0023	0,0023	0,0071	5.800
19	AAVG	F	51	0,0011	0,0022	0,0000	0,0033	13.400
20	RSR	M	50	0,0067	0,0057	0,0045	0,0124	16.500
21	ASF	M	73	0,0167	0,0010	0,0010	0,0177	47.500
22	MOM	F	29	0,0031	0,0015	0,0000	0,0046	6.800
23	WRJ	M	54	0,0103	0,0011	0,0011	0,0114	21.200
24	EMH	M	47	0,0011	0,0083	0,0010	0,0094	6.210
25	JGTS	M	34	0,0030	0,0021	0,0010	0,0051	106.500
26	AP	F	52	0,0012	0,0010	0,0000	0,0022	14.200
27	ALL	F	27	0,0000	0,0011	0,0000	0,0011	50.600
28	AC	M	52	0,0000	0,0021	0,0000	0,0021	25.200
29	AP	M	69	0,0011	0,0021	0,0000	0,0032	37.200

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
30	SFS	M	33	0,0344	0,1213	0,0251	0,1557	293.000
31	VDC	M	19	0,0056	0,0142	0,0076	0,0198	2.900

CEP: Célula endotelial precursora; CEM: Célula endotelial madura; aCEC: Célula endotelial circulante ativada; CEC: Célula endotelial circulante; GB: glóbulos brancos

ANEXO L

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CECs NOS PORTADORES
DE LMC EM CB**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
1	MFSM	F	43	0,0172	0,0053	0,0053	0,0225	22.300
2	VB	M	52	3,7587	0,0100	0,0090	3,7687	115.900
3	APM	F	74	0,0035	0,0141	0,0000	0,0176	18.810
4	RPS	M	31	0,1011	0,3642	0,0296	0,4653	127.200
5	JIS	M	40	0,0044	0,0121	0,0044	0,0165	106.910
6	RCJMR	M	55	0,0022	0,0281	0,0011	0,0303	15.800
7	MTMB	F	50	0,0196	0,0041	0,0041	0,0237	111.400
8	JRPJ	M	38	0,0012	0,0059	0,0000	0,0071	11.100
9	SMJ	F	70	0,001	0,0124	0,0000	0,0134	101.200
10	NCT	F	57	0,2407	0,1976	0,0329	0,4383	66.500
11	RAR	M	51	0,0000	0,0011	0,0044	0,0011	61.900
12	APSF	M	53	0,0000	0,0033	0,0022	0,0033	54.100
13	JLS	M	35	0,2437	18,7066	0,0284	18,950 3	87.500

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
14	FES	M	20	0,0000	0,0011	0,0000	0,0011	20.8000
15	JPF	F	59	0,0000	0,0044	0,0029	0,0044	90.800
16	EMF	F	66	0,0029	0,0117	0,0000	0,0146	2.400
17	AJS	M	34	0,7381	0,8190	0,0134	1,5571	153.900
18	LMS	F	53	0,0041	0,0072	0,0000	0,0113	162.800
19	FAF	M	24	0,0020	0,0000	0,0000	0,0020	123.400
20	AORP	M	53	0,0022	0,0056	0,0033	0,0078	342.000
21	NM	M	67	0,0182	0,0000	0,0000	0,0182	28.600
22	SMAL	F	58	0,0033	0,0085	0,0000	0,0118	51.900
23	JAS	M	54	0,0042	0,0062	0,0021	0,0104	700.000

CEP: Célula endotelial precursora; CEM: Célula endotelial madura; aCEC: Célula endotelial circulante ativada; CEC: Célula endotelial circulante; GB: glóbulos brancos

ANEXO M

**RESULTADOS DAS QUANTIFICAÇÕES DE CECs NOS PORTADORES
DE LMC EM FA**

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
1	FCC	F	65	0,0000	0,0011	0,0000	0,0011	10.000
2	JRA	M	59	0,0000	0,0430	0,0085	0,0430	99.200
3	CFD	M	27	0,0000	0,0046	0,0000	0,0046	152.000
4	EMF	F	66	0,0020	0,0100	0,0039	0,0120	137.700
5	ECP	F	57	0,0010	0,0053	0,0000	0,0063	25.600
6	ZS	F	81	0,0586	0,0018	0,0000	0,0604	21.500
7	VSO	F	62	0,0012	0,0000	0,0000	0,0012	15.100
8	MGJS	F	78	0,0044	0,0016	0,0000	0,0060	2.700
9	JRG	M	58	0,0082	0,0035	0,0000	0,0117	5.600
10	MN	M	55	0,0047	0,0011	0,0011	0,0058	6.500
11	RGSA	M	40	0,0000	0,0068	0,0014	0,0068	3.000
12	JFR	M	61	0,0022	0,0012	0,0000	0,0034	2.300
13	RMR	M	36	0,0028	0,0025	0,0012	0,0053	5.300
14	UPF	F	42	0,0060	0,0012	0,0000	0,0072	5.800

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
15	ASC	F	53	0,0024	0,0012	0,0012	0,0036	3.400
16	BAM	M	79	0,0036	0,0012	0,0000	0,0048	20.480
17	JPF	F	59	0,0000	0,0014	0,0000	0,0014	4.000
18	LFB	M	26	0,0033	0,0010	0,0010	0,0043	6.700
19	LLS	F	63	0,0078	0,0135	0,0011	0,0213	3.900
20	ESF	M	52	0,0000	0,0066	0,0044	0,0066	4.600
21	GBCA	F	46	0,0000	0,0022	0,0011	0,0022	6.600
22	AMN	M	55	0,0024	0,0100	0,0050	0,0124	3.800
23	MFM	M	59	0,0030	0,0041	0,0041	0,0071	11.100
24	RRS	M	57	0,0010	0,0011	0,0011	0,0021	4.700
25	MMM	F	57	0,0000	0,0022	0,0011	0,0022	6.600
26	RVM	F	59	0,0072	0,0189	0,0116	0,0261	3.500
27	JAV	M	59	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	7.000
28	FVS	M	37	0,0000	0,0024	0,0000	0,0024	5.300
29	MECR	F	67	0,0080	0,0041	0,0000	0,0121	7.200

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	CEP %	CEM %	aCEC %	CEC %	GB mm ³
30	TG	M	45	0,0049	0,0114	0,0079	0,0163	3.600

CEP: Célula endotelial precursora; CEM: Célula endotelial madura; aCEC: Célula endotelial circulante ativada; CEC: Célula endotelial circulante; GB: glóbulos brancos

ANEXO N

**RESULTADOS DOS GENES hSECURINA E VEGF NOS INDIVÍDUOS
SAUDÁVEIS**

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
1	JCPF	M	40	0,15	0,32
2	IFA	M	38	0,09	0,76
3	OS	M	54	0,13	0,03
4	NA	M	40	0,72	0,16
5	LOSH	M	21	0,07	0,06
6	BZB	F	46	0,12	0,24
7	RAAA	M	53	0,77	0,32
8	LSN	M	52	0,06	0,38
9	EMM	M	64	0,05	0,05
10	JFB	F	50	0,15	0,32
11	CRS	F	38	0,21	0,22
12	MLS	M	54	0,09	0,28
13	CAS	M	39	0,06	0,05
14	GAB	F	32	0,10	0,19

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
15	KSS	F	46	0,05	0,12
16	EMC	F	41	0,16	0,09
17	JSS	M	55	0,24	0,10
18	LJS	M	59	0,04	0,24
19	MCMRF	F	42	0,09	0,19
20	FJNZ	F	49	0,05	0,06
21	LAF	F	50	0,16	0,05
22	CASF	F	60	0,34	0,06
23	FF	F	26	0,22	0,18
24	RAF	M	63	0,17	0,10
25	MSS	M	65	0,25	0,09
26	LM	M	59	0,10	0,11
27	JMP	F	48	0,20	0,28
28	PDD	F	53	0,10	0,21
29	MHPR	F	63	0,17	0,05

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
30	DLP	M	59	0,08	0,05
31	MR	M	77	0,10	0,26
32	TFS	F	52	0,20	0,13

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

ANEXO O

**RESULTADOS DOS GENES hSECURINA E VEGF EM PORTADORES DE
LMC EM FC**

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
1	APF	M	56	0,06	0,09
2	RSR	M	50	0,12	0,60
3	NPS	F	40	0,33	0,50
4	LLC	F	63	0,72	0,33
5	OSC	F	82	0,22	0,33
6	VB	M	52	0,17	0,06
7	ALF	M	77	0,32	0,87
8	HMT	F	70	0,32	0,87
9	NCM	F	69	0,62	0,24
10	EAC	M	60	0,33	0,33
11	MHRAC	F	51	0,32	0,27
12	EP	M	68	1,09	0,36
13	ORA	M	53	0,41	0,49
14	ASF	M	72	0,05	0,07

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
15	SAS	F	27	0,08	0,14
16	AAVG	F	51	0,27	0,43
17	MOM	F	29	0,26	0,11
18	WRJ	M	54	0,09	0,35
19	EMH	M	47	0,09	0,16
20	AP	F	52	0,19	0,23
21	AP	M	69	0,42	0,47
22	ALL	F	27	0,06	1,15
23	AC	M	52	0,13	0,47
24	JGTS	M	34	0,61	0,27
25	VD	M	19	0,10	0,11

 VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

ANEXO P

**RESULTADOS DOS GENES hSECURINA E VEGF NOS PORTADORES
DE LMC EM CB**

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
1	RCJM	M	55	0,07	0,17
2	RPS	M	30	0,35	0,44
3	VB	M	53	0,31	0,16
4	MFSM	F	43	1,54	0,38
5	APSF	M	53	0,18	0,77
6	JRPJ	M	38	0,19	0,24
7	AJS	M	34	0,13	0,01
8	EMF	F	66	0,74	0,15
9	JLS	M	35	0,45	0,24
10	FAF	M	24	0,70	0,09
11	AORP	M	53	0,33	0,25
12	NM	M	67	0,57	2,11
13	SMAL	F	58	0,43	0,45
14	JAS	M	54	0,47	0,25

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

ANEXO Q

**RESULTADOS DOS GENES hSECURINA E VEGF NOS PORTADORES
DE LMC EM FA**

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
1	EMF	F	65	0,18	0,46
2	FCC	F	65	0,13	0,12
3	JRA	M	59	0,25	0,33
4	ECP	F	57	0,05	0,26
5	ZS	F	81	0,26	0,91
6	VSO	F	62	0,13	0,71
7	JRG	M	58	0,01	0,32
8	JFR	M	61	0,09	0,32
9	MN	M	55	4,52	0,81
10	UPF	F	42	0,20	0,32
11	RMR	M	36	0,08	0,08
12	ASC	F	53	0,36	0,06
13	MGJS	F	78	0,08	0,16
14	RGSA	M	40	0,04	0,19

Continua

Continuação

N	Iniciais	Sexo	Idade	hSecurina	VEGF
15	BAM	F	79	0,68	0,11
16	JPF	F	59	0,51	1,69
17	LFB	M	26	0,05	0,07
18	LLS	F	63	1,14	0,40
19	ESF	M	52	0,36	0,11
20	MFG	M	59	0,62	1,04
21	RRS	M	57	0,31	3,22
22	MMM	F	57	0,11	0,07
23	RVM	F	59	0,63	1,03
24	FVS	M	37	0,30	0,33
25	MECR	F	67	0,30	1,55
26	TG	M	45	0,04	0,02

 VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

9. REFERÊNCIAS

Agrawal R, Conway GS, Sladkevicius P, Payne NN, Bekir J, Campbell S, Tan SL, Jacobs HS. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in the normal menstrual cycle: association with changes in ovarian and uterine Doppler blood flow. *Clin Endocrinol*.1999;50:101-6.

Aguayo A, Kantarijan H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000;96:2240-5.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I, Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007a;100:158-73.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II, Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007b;100:174-90.

ANVISA. *Resolução da Diretoria Colegiada número 153*. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f987d38042f8415293ed97536d6308db/rdc_153.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0. Acesso em: 01 de fev. de 2011.

Auner HW, Zebisch A, Schimek MG, Bodner C, Hiden K, Linkesch W, Haas OA, Beham-Schmid C, Sill H. High expression of the sister-chromatid separation regulator and proto-oncogene *hSecurin* occurs in a subset of myeloid leukaemias but is not implicated in the pathogenesis of aneuploidy. *Leukemia*. 2004;18:303-8.

Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, Cervantes F, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Hochhaus A, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Radich J, Simonsson B, Silver RT, Goldman J, Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J of Clin Oncol*. 2009;27:6041-51.

Bain BJ. An overview of translocation-related oncogenesis in the chronic myeloid leukaemias. *Acta Haemat*. 2002;107:57-63.

Bartram CR, Klein A, Hagemeijer A, Agthoven Tv, Kessel AGv, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M, Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306:277-80.

Bazarbachi A, Abou MR, Gessain A, Talhouk R, El-Khoury H, Nasr R, Gout O, Sulahian R, Homaidan F, de Thé H, Hermine O, El-Sabban ME. Human T-cell lymphotropic virus type I-infected cells extravasate through the endothelial barrier by a local angiogenesis-like mechanism. *Cancer Res.* 2004;64:2039-46.

Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration for the blood. *Edinburgh Med Surg J.* 1845;64:413-23.

Blann AD, Waywoldt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GYH, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells – Biomarker of vascular disease. *J Tromb Haemost.* 2005;93:228-35.

Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5:123-7.

Carella AM, Daley GQ, Eaves CJ, Goldman JM, Hehlmann R. *Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment.* United Kingdom. Martin Dunitz, 2001:3-101.

Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene*. 2000;248:41-50.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature*. 2006;1:581-5.

Clancy R, Marder G, Martin V, Belmont HM, Abramson SB, Buyon J. Circulating activated endothelial cells ins systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;5:1203-8.

Cortelezzi A, Francchiolla NS, Moronetti Mazzeo L, Silvestris I, Pomati M, Solmavico F, Bertolini F, Mancuso P, Pruneri GC, Gianelli U, Pasquini MC, Cortiana M, Lambertenghi Deliliers G. Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:1345-51.

Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, Garcia-Manero G, Faderl Stefan, Thomas DA, Wierda W, Ferrajoli A, Jeha S, Kantarjian. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic

myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*. 2003;101:3794-3800.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia. Estrutural e Funcional*. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000; 233-95.

Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-3356.

Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampol J, Dignat-George F. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *J Thromb Haemost*. 2005;94:1270-9.

Efron B, Tibshirani R. *An introduction to the Bootstrap*. New York: Chapman & Hall, 1993. p 1-430.

Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP, Jr. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of

lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*. 2005;106:2923-4.

Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1305-13.

Fang B, Zheng C, Liao L, Han Q, Sun Z, Jiang X, Zhao CH. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood*. 2005;105:2733-2740.

Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med*. 2004;351:215-6.

Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic Myelogenous Leukemia: A Review and Update of Therapeutic Strategies. *Cancer*. 2003;98:437-57.

Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2000;110:2-11.

Gil-Barnabé AM, Romero F, Limón-Mortés MC, Tortolero M. Protein phosphatase 2A stabilizes human securin, whose phosphorylated forms are degraded via the SCF ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4017-27.

Go RS, Jobe DA, Asp KE, Callister SM, Mathiason MA, Meyer LA, Bottner WA, Cole CE, Farnen JP, Frisby KA. Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2008;87:369-73.

Goldman JM, Melo JV. Mechanisms of Disease: Myeloid Leukemia: Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451-64.

Hartge MM, Kintscher U, Unger T. Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006;35:551-60.

Horning NCD, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol.* 2002;12:973-82.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:201-6.

Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498-508.

Huntly BJP, Bench A, Green AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. Review in translational hematology. *Blood*. 2003;102:1160-4.

Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;106:1525-31.

Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*. 2001;105:445-57.

Kay NE. Circulating endothelial cells in chronic lymphocyte leukemia: more evidence of disturbed angiogenesis. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:8-9.

Khan SS, Solomon MA, McCoy Jr JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64B:1-8.

Khakoo AY, Finkel T. Endothelial Progenitor Cells. *Annu Rev Med.* 2005;56:79-96.

Koffler HP, Golde DW. Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* 200. 1978:1153-4.

Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzaz N, Patsouris E, Thymara I, Pavlopoulos PM, Terpos E, Stamatopoulos K, Plata E, Anargyrou K, Androulaki A, Davaris P, Yataganas X. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. *Leukemia.* 2003;17:89-97.

Lamalice L, Le BF, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100:782-94.

Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair. *Circ Res.* 2007;100:1243-5.

Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The *BCR* gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. [Review] *Cancer Res.* 2001; 61:2343-55.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001;97:3658-61.

Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, Orlando L, Maisonneuve P, Pruneri G, Agliano A, Goldhirsch A, Shaked Y, Kerbel RS, Bertolini F. Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood*. 2006;108:452-9.

Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, Braidotti P, Wu HK, Zurita AJ, Saronni L, Cheng JB, Shalinsky DR, Heymach JV, Bertolini F. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: Flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res*. 2009;15:267-73.

Mariucci S, Rovati B, Bencardino K, Manzoni M, Danova M. Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Int J Lab Hematol*. 2008;27:1-9.

Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature*. 2007;7:441-53.

Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *Hematology – Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:132-52.

Moroni G, Del PN, Moronetti LM, Vitali C, Maglione W, Comina DP, et al, Increased levels of circulating endothelial cells in chronic periaortitis as a marker of active disease. *Kidney Int*. 2005;68:562-8.

Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, Baudouin SV. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:195-200.

Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Loteta B, Quartarone E, Gangemi D, Massara E, Calabro L. Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implication. *Eur J Haematol*. 2004;72:416-9.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia (Abstract). *Science*. 1960;132:1497.

O'Dwyer ME, Mauro MJ, Kurilik G, Mori M, Balleisen S, Olson S, Magenis E, Capdeviller R, Druker BJ. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML. *Blood*. 2002;100:1628-33.

Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B. Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996;88:2410-4.

Papa ND, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, Comina DP, Vitali C, Fantini F, Cortelezzi A. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1296-304.

Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124:643-60.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC 133

by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-8.

Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *Br J Haemat*. 2001;115:186-94.

Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:826-35.

Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2004;8:294-300.

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3.

Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogenes. *Sem Hemat*. 2003;40:4-10.

Sawyers LC. Chronic Myeloid Leukemia. Review. *N Engl J Med.* 1999;340:1330-40.

Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P, A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell*, 2005;7:3-4.

Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER. Flow Cytometric Measurement of Circulating Endothelial Cells: The effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006;70B:56-62.

Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985;315:550-4.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1997;2:1584-90.

Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res.* 2006;4:130-7.

Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M, Thiele J. Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1 positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008. p 32-37.

Verstovsek S, Kantarjian H, Manshouri T, Cortes J, Giles FJ, Rogers A, Albitar M. Prognostic significance of cellular vascular endothelial growth factor expression in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2002;99:2265-7.

Wieczorek AJ, Majka M, Curtis LM, Wetheim JA, Turner AR, Ratajczak MZ. Bcr- abl-positive secrete angiogenic factors including matrix metalloproteinases and stimulate angiogenesis *in vivo* in Matrigel implants. *Leukemia.* 2002;16:1160-6.

Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, Smolewski P. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haemat.* 2005;75:492-7.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90:5002-12.

Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells', Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:493-503.

Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smih ELP, Maroney J, Chen L, Dai K, Berenson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Ozçelik T, Batuman OA. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* 2005;105:3286-94.