

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

MARÍLIA PYLES PATTO KANEGAE

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO QUIMILUMINESCENTE
BASEADO NA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE
ALCALINA PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E REAÇÕES
LEUCEMÓIDES**

ARARAQUARA – SP

2006

MARÍLIA PYLES PATTO KANEGAE

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO QUIMILUMINESCENTE
BASEADO NA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE
ALCALINA PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA E REAÇÕES
LEUCEMÓIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
para obtenção do título de mestre em Análises Clínicas,
Área de Análises Clínicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

ARARAQUARA – SP

2006

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca
(Orientador)

Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite
(Membro titular)

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego
(Membro titular)

Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzochi Machado
(Membro suplente)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
(Membro suplente)

*Aos meus pais, Paulo e Ady, pelo amor
incondicional, incentivo, apoio, força e
coragem para seguir em frente.*

Obrigada por tudo!

Ao meu orientador

Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca

pela orientação, incentivo e por me transmitir

parte de seu conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Leonardo por toda sua dedicação, pelo seu amor, muita paciência e compreensão nas horas difíceis.

Às minhas irmãs, Laura e Júlia pela companhia, amor e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos voluntários e pacientes que gentilmente contribuíram com este trabalho. Sem vocês nada seria possível...

Aos meus amigos Helen, Najeh, Ana Paula, Débora, Fernanda, José Carlos, José Mario, Camila, Helene, Tatiane e Thaís pela amizade, companhia e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Valdecir pela sua grande ajuda na execução deste trabalho, disponibilidade e amizade.

À Eliana, Max, Marcos, Valéria, Rosemira e Tirene pela amizade e solicitude.

A todos os funcionários da Biblioteca que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos professores Dr. Iguatemy e Dra. Teresa por contribuírem com a minha formação e também por permitir que eu utilizasse seu laboratório.

Aos professores Dr. Amauri, Dra. Cleni e Dr. Eduardo pela ajuda no decorrer do trabalho e também pelas indispensáveis contribuições na redação da dissertação.

Ao Dr. Éderson e Dr. Virgílio do Hospital Amaral Carvalho (Jaú) pela imensa ajuda e colaboração.

*À Cláudia, Laura e Sônia da Seção de Pós-Graduação pela paciência,
ajuda e solicitude com que sempre me atenderam.*

À Capes pela bolsa de estudo concedida.

*A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização
deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo ou um sorriso. Muito obrigada!*

RESUMO

Em hematologia, a principal aplicação da determinação da atividade da fosfatase alcalina (FA) neutrofílica é no auxílio ao diagnóstico diferencial entre leucemia mielóide crônica (LMC) e reações leucemóides neutrofílicas (RL) decorrentes de doenças mieloproliferativas, como a mielofibrose, policitemia vera ou de inflamações/ infecções. Tradicionalmente esta determinação é realizada por um ensaio citoquímico subjetivo, no qual se atribui uma pontuação (*SCORE*) para o nível de FA. Neste trabalho apresentamos um método quimiluminescente, objetivo, quantitativo, sensível e barato para a determinação de FA neutrofílica baseado no reagente comercial Immulite[®]. Leucócitos íntegros obtidos de amostras de sangue periférico de trinta e dois indivíduos saudáveis, nove portadores de LMC e nove portadores de RL foram submetidos ao protocolo otimizado. Através da determinação da emissão de luz por quatro concentrações de neutrófilos, foi possível detectar a atividade de FA por célula (inclinação – *SLOPE* – da curva obtida por regressão linear). Uma alta correlação foi obtida quando o método quimiluminescente (*SLOPE*), aqui desenvolvido, foi comparado ao citoquímico (*SCORE*). Obtivemos uma variação do *SLOPE* entre 0,61-8,49 (10^{-5} mV.s/célula) para amostras do grupo controle (indivíduos saudáveis), sendo que o valor da mediana foi 2,04 (10^{-5} mV.s/célula). Estes resultados foram estatisticamente diferentes das amostras do grupo LMC (variação: 0,07 - 1,75; mediana: 0,79) e do grupo RL (variação: 3,84 - 47,24; mediana: 9,58) ($p < 0,05$).

Palavras-chave: quimiluminescência, Immulite[®], AMPPD, leucemia mielóide crônica, reações leucemóides, fosfatase alcalina neutrofílica.

ABSTRACT

In haematology the main application of the leukocyte alkaline phosphatase (LAP) assay is in distinguishing chronic myeloid leukaemia (CML) from other myeloproliferative diseases, particularly from myelofibrosis, polycythaemia or other inflammatory/infectious diseases (LR). Traditionally, this is performed by subjective cytochemical assays where a SCORE is attributed to the level of LAP. Here we present a non-subjective, quantitative, sensitive and inexpensive chemiluminescent technique for LAP determination, based on the commercial reagent Immulite[®]. Intact leukocytes obtained from thirty-two healthy subjects, nine CML and nine LR patients were submitted to the optimized protocol. By measuring the light emission elicited by four concentrations of neutrophils, it was possible to estimate the activity of LAP per cell (the SLOPE of the curve obtained by linear regression). A high linear correlation was found between the chemiluminescent result (SLOPE) and the cytochemical SCORE. The SLOPE for healthy individuals ranged between 0.61 and 8.49 (10^{-5} mV.s/cell), with a median of 2.04 (10^{-5} mV.s/cell). These results were statistically different from CML patients (range 0.07 - 1.75, median 0.79) and LR patients (range 3.84 – 47.24, median 9.58) ($p < 0.05$).

Keywords: chemiluminescence, Immulite[®], AMPPD, chronic myeloid leukaemia, leukaemoid reactions, leukocyte alkaline phosphatase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL : microlitro

AMP: 2-amino-2-metil-1-propanol

AMPPD: 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-tricyclo[3.3.1.1]decan]4-il) fenilfosfato

Co^{+2} : cobalto

DNA: ácido desoxirribonucléico

FA: fosfatase alcalina

FISH: Fluorescent in Situ Hybridization

g: grama

HCl: ácido clorídrico

HLA: Human Leukocyte Antigen

LLA: leucemia linfóide aguda

LMA: leucemia mielóide aguda

LMC: leucemia mielóide crônica

M: mol/L

Mg^{+2} : magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

Mn^{+2} : manganês

mV: milivolt

NaCl: cloreto de sódio

Ph: cromossomo Filadélfia

pH: potencial hidrogeniônico

PMN: polimorfonuclear

RL: reação leucemóide

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction

s: segundo

TMO: transplante de medula óssea

v: volume

V_f : volume final

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
1. Introdução.....	11
1.1. Leucemias.....	12
1.2. Leucemia mielóide crônica.....	13
1.3. Reações leucemóides neutrofílicas.....	15
1.4. Neutrófilos.....	16
1.5. Fosfatase alcalina.....	16
1.6. Quimiluminescência.....	17
1.7. AMPPD (3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-tríciclo[3.3.1.1.]decan]4-il)fenilfosfato.....	17
2. Objetivos.....	20
3. Casuística.....	22
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1. Reagentes.....	26
4.2. Soluções.....	26
4.2.1. Solução de dextran 6%.....	26
4.2.2. Tampão AMP 1,5M.....	26
4.3. Separação de células por gradiente duplo de densidade (Histopaque®).....	26
4.4. Separação de células com dextran 6% - obtenção de leucócitos totais.....	27
4.5. Determinação da fosfatase alcalina por metodologia colorimétrica.....	28
4.6. Ensaio quimiluminescente para fosfatase alcalina neutrofílica.....	29

4.7. Ensaio citoquímico para fosfatase alcalina neutrofílica.....	30
4.8. Análise estatística.....	30
5. Resultados e Discussão.....	32
5.1. Padronização dos ensaios quimiluminescentes com IMMULITE® (AMPPD).....	33
5.2. Aplicação do método.....	39
5.2.1. Valores normais.....	39
5.2.2. Diagnóstico diferencial entre LMC e RL neutrofílicas.....	44
6. Conclusão.....	50
7. Referências Bibliográficas.....	52

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Leucemias

As leucemias são um grupo de doenças no qual a manifestação comum é a proliferação desregulada e maligna de células hematopoiéticas na medula óssea. As leucemias envolvem qualquer linhagem hematopoética ou seus precursores. Embora cada tipo de leucemia progrida diferencialmente, as células proliferantes usualmente substituem os constituintes normais; eventualmente levam à falência funcional da medula óssea; podem invadir outros órgãos e levam à morte se não tratadas adequadamente (BAIN, 2003).

A despeito das intensas pesquisas nas áreas de cariotipagem e biologia molecular que levaram às subclassificações mais atuais (JAFFE et al., 2001), as leucemias podem, ainda, ser genericamente divididas em agudas e crônicas. As leucemias agudas são caracterizadas pela infiltração de blastos (células imaturas de origem mielóide ou linfóide) neoplásicos na medula óssea constituindo pelo menos 20% de todas as células nucleadas da mesma. As leucemias agudas são divididas ainda em mielóides (LMA) e linfóides (LLA). O grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico definiu, basicamente, oito subtipos de LMA e três de LLA (BENNETT et al., 1976; BENNETT et al., 1985).

A classificação laboratorial adequada do tipo de leucemia, principalmente dentro das categorias LMA e LLA, é essencial, não só para a instituição da terapia adequada, como também para o estabelecimento do prognóstico do paciente (BAIN, 2003).

1.2. Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) integra o grupo das desordens mieloproliferativas, sendo uma doença clonal de células-tronco com características hematológicas, citogenéticas e genéticas moleculares típicas (KURZROCK et al., 2003). O sangue periférico revela principalmente leucocitose com contagem diferencial bastante característica, em que predominam neutrófilos maduros (segmentados e bastonetes) e mielócitos. Observam-se precursores granulocíticos imaturos, mas os promielócitos são menos numerosos que os mielócitos e raros blastos podem ser observados (SPIERS et al., 1997).

A LMC foi a primeira doença maligna na qual se pode estabelecer uma sólida relação com uma anormalidade citogenética adquirida não aleatória. Em 1960 Nowell e Hungerford relataram sua associação a um “cromossomo diminuto” anormal, que recebeu a designação de cromossomo Filadélfia (Ph) (GOLDMAN & MELO, 2003; KURZROCK et al., 2003). Posteriormente comprovou-se, nessa patologia, uma translocação recíproca característica t (9; 22) (q34; q11), presente em 95% dos pacientes, sendo que o cromossomo derivado 22q, correspondia ao cromossomo Ph previamente relatado (ROWLEY, 1973). A translocação 9; 22 origina a fusão de uma das seqüências do gene BCR (“*breakpoint cluster region*”) em 22q11 com uma das seqüências do oncogene ABL (*Abelson leukemia virus*), translocado de 9q34. Forma-se assim um gene híbrido, o BCR-ABL, no cromossomo 22. O BCR-ABL codifica uma proteína tirosina quinase com atividade aumentada que desempenha um papel central na leucemogênese (CLARKSON et al., 1997; FADERL et al, 1999; VERFAILLIE, 1999; DRUKER et al, 2001).

Alguns estudos mostraram que esta proteína, *in vitro*, pode transformar as células hematopoiéticas, de modo que seu crescimento e sobrevivência se tornam

independentes de citocinas e também as protege da apoptose em resposta à retirada de citocinas ou dano ao DNA causado por quimioterapia ou radiação (MCLAUGHLIN et al., 1987; GISHIZKY & WITTE, 1992; EVANS et al., 1993; NISHII et al., 1996). As células progenitoras malignas anormais também apresentam alteração da adesão ao estroma medular, o que facilita sua migração para o sangue periférico (GORDON et al., 1984).

Clinicamente a doença pode ser dividida em três fases: crônica, acelerada e crise blástica. A evolução de fase crônica à blástica pode ocorrer gradualmente ou abruptamente podendo haver evolução para leucemia mielóide aguda ou leucemia linfóide aguda (CERVANTES et al., 1998).

O tratamento para LMC se inicia assim que a doença é diagnosticada e se faz por transplante de medula óssea (TMO) ou células-tronco, com quimioterapia ablativa prévia, ou por terapia medicamentosa com uma das seguintes drogas ou uma combinação delas: interferon α , hidroxiuréia, citarabina, bussulfan e mais recentemente, mesilato de imatinibe (DULLEY & HAMERSCHLACK, 2004). O único tratamento curativo para a LMC, em mais da metade dos pacientes eleitos, é o transplante alogeneico de medula óssea ou de células-tronco. No entanto muitos pacientes não possuem indicação para esta terapia devido à idade, comorbidades ou falta de doador compatível (OZER et al., 1993; LEE et al., 1998). O Registro Internacional de Transplante de Medula Óssea e o Grupo Europeu para Transplante de Sangue e Medula relataram taxas de sobrevivência de 50 a 60% entre pacientes com LMC na fase crônica que receberam somente quimioterapia ou radioterapia mais quimioterapia seguidas por TMO de doadores relacionados HLA-compatíveis (HOROWITZ et al., 1996; VAN RHEE et al., 1997).

A introdução do mesilato de imatinibe iniciou a era da terapia molecular. Este medicamento consiste em um inibidor tirosina quinase Abl-específico, capaz de inibir a proliferação de linhagens celulares da LMC (DRUKER et al., 1996). Foi administrado pela primeira vez em 1998, apresentando resultados promissores. Estudos recentes mostraram que, quase todos os pacientes com LMC na fase crônica tratados com o mesilato de imatinibe, atingiram resposta hematológica completa e 80 a 90% daqueles tratados no início da fase crônica alcançaram remissão citogenética completa (KANTARJIAN et al., 2002; O'BRIEN et al., 2003). Todavia, alguns pacientes, particularmente aqueles tratados em estágios avançados da doença, podem desenvolver resistência ao imatinibe. Assim, novas estratégias terapêuticas têm sido avaliadas (CORTES & KANTARJIAN, 2005).

O diagnóstico conclusivo da LMC pode ser feito por cariotipagem, que evidencia o cromossomo Ph, ou por modernas técnicas de biologia molecular como *FISH (Fluorescent in Situ Hybridization)* e *RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)* que demonstram a presença do gene BCR/ABL (JAFFE et al., 2001). Todavia esses procedimentos são demorados e onerosos.

1.3. Reações leucemóides neutrofílicas

O termo leucemóide foi empregado pela primeira vez em 1926 por Krumbhaar para descrever um grupo de condições não-malignas com elevadas contagens de leucócitos que mimetizam o quadro hematológico da LMC, dificultando seu diagnóstico. Usualmente essa reação leucemóide neutrofílica (RL) ocorre no curso de doenças inflamatórias ou necrose tecidual (queimaduras extensas, trauma, infarto, gota, vasculite, complexos antígeno-anticorpo, ativação do complemento), neoplasias ou infecções graves (infecções agudas bacterianas localizadas ou

sistêmicas, micóticas e algumas infecções virais) (DALE, 2001); sendo que as contagens absolutas atingem entre 30.000 a 100.000 neutrófilos por microlitro (μL) de sangue, com o aparecimento de células imaturas dessa linhagem (desvio à esquerda).

O diagnóstico diferencial entre LMC e RL é essencial para a implementação da terapia adequada e para o estabelecimento do prognóstico (BAIN, 2004).

1.4. Neutrófilos

Os neutrófilos constituem a primeira linha interna de defesa do organismo contra agentes invasores; função que se deve não somente à fagocitose, como também à destruição dos microrganismos fagocitados por mecanismos oxidativos (*burst* respiratório) – produção de um grande número de espécies reativas de oxigênio no vacúolo fagocítico – e à ação das enzimas e peptídeos microbicidas presentes em seus grânulos (mecanismo independente de oxigênio). No caso dos neutrófilos estes grânulos são divididos em: primários ou azurófilos, secundários ou específicos e vesículas secretórias (BAINTON, 2001).

1.5. Fosfatase alcalina

Fosfatases são enzimas responsáveis pela transferência de um grupo fosfato de um composto a outro. São chamadas fosfatases alcalinas (FA) as enzimas pertencentes a um subgrupo que tem atividade ótima *in vitro* em pH 10,0 aproximadamente (PESCE & KAPLAN, 1987). Alguns íons divalentes como Mg^{+2} , Co^{+2} e Mn^{+2} são ativadores da enzima e os íons fosfato, borato, oxalato e cianeto são inibidores (BURTIS & ASHWOOD, 2001).

A fosfatase alcalina neutrofílica está localizada nas vesículas secretórias dos neutrófilos (BAINTON, 2001) e está diminuída ou ausente em mais de 90% dos pacientes com LMC e alta nas leucocitoses reativas, um percentual de positividade similar ao da pesquisa do cromossomo Ph por cariotipagem (MITUS & KIOSSOGLON, 1968; DE PALMA et al., 1996). Na verdade, o RNA mensageiro para a fosfatase alcalina é indetectável em neutrófilos provenientes do clone leucêmico de pacientes com LMC (RAMBALDI et al., 1989).

O teste citoquímico da fosfatase alcalina vem sendo utilizado há longo tempo para auxílio no diagnóstico diferencial da LMC, mas é, no máximo, semi-quantitativo, laborioso e subjetivo, estando, portanto, sujeito à grande variação interlaboratorial (KAPLOW, 1963; RAMBALDI et al, 1997).

1.6. Quimiluminescência

A quimiluminescência advém de reações químicas capazes de produzir energia suficiente para formar moléculas-produto no estado eletronicamente excitado que, quando retornam ao seu estado fundamental emitem luz (ALLEN et al., 1972). As reações quimiluminescentes são muito úteis em metodologias analíticas por terem alta sensibilidade, serem facilmente associadas a reações de interesse biológico e por possibilitarem a detecção, quantificação e visualização de eventos químicos em células vivas (XIMENES, 2000).

1.7. AMPPD (3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-tricyclo[3.3.1.1]decan]4-il) fenilfosfato) (Tropix Inc. Bedford, MA, USA)

Várias reações quimiluminescentes oxidativas têm peróxidos como intermediários (MCCAPRA, 1966). Em alguns sistemas quimiluminescentes,

peróxidos cíclicos com quatro anéis, 1,2-dioxetanos, são propostos como intermediários responsáveis pela geração de espécies excitadas e conseqüente emissão de luz ao decair ao estado fundamental. No entanto, tais compostos são muito instáveis para que possam ser isolados e aplicados em metodologias analíticas. Esta deficiência foi resolvida quando se descobriu que a presença de um grupo “protetor” ligado ao anel dioxetânico poderia aumentar a sua estabilidade. Com esta abordagem, foi sintetizado o substrato AMPPD, um composto dioxetânico estabilizado por um grupo fosfato que, ao ser hidrolisado pela ação catalítica da enzima fosfatase alcalina, se transforma em um sistema instável e que se decompõe emitindo luz intensa e prolongada (Figura 1). O pH influencia a velocidade da reação, pois afeta o estado de ionização dos grupos funcionais no sítio ativo da enzima. A máxima emissão de luz gerada pela decomposição do substrato AMPPD pela FA ocorre em pH 9,0 (BRONSTEIN et al., 1989).

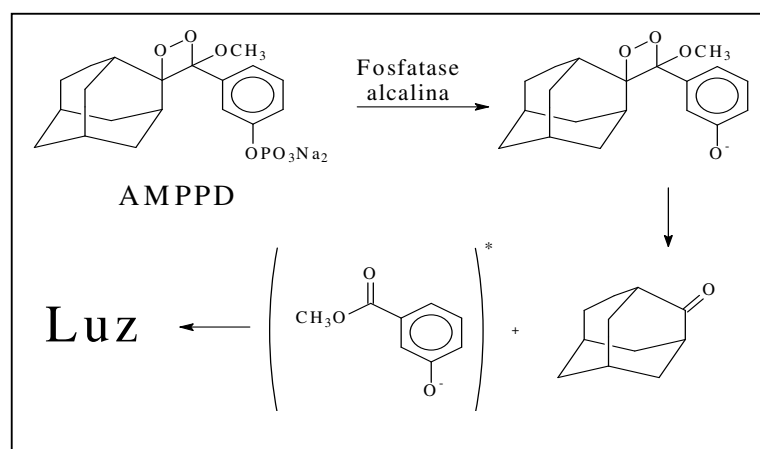


Figura 1: Reação quimiluminescente para determinação de fosfatase alcalina baseada na hidrólise do substrato AMPPD (KRICKA et al., 2000).

Neste trabalho utilizamos, como fonte de substrato AMPPD, o reagente comercial IMMULITE[®]. Este é utilizado em sistemas comerciais que efetuam imunoenaios de quimiluminescência para diagnóstico *in vitro*. Este reagente contém Lumigen[®]PPD (AMPPD), tampão AMP e intensificador cloreto de polivinilbenziltributilfosfonio.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Neste trabalho propusemos:

- O desenvolvimento de uma metodologia quimiluminescente, sensível e específica, para avaliação da atividade da fosfatase alcalina neutrofílica em neutrófilos íntegros;
- Avaliar a aplicação desta metodologia no diagnóstico diferencial entre leucemia mielóide crônica e reações leucemóides neutrofílicas.

3. CASUÍSTICA

3. Casuística

O presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP e recebeu parecer favorável à sua execução (Anexo 1). Todos os voluntários foram informados dos riscos e propósitos da pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Em todo o experimento foram utilizadas 56 amostras de sangue periférico obtidas por punção venosa.

Para a padronização dos ensaios foram utilizadas 6 amostras coletadas de voluntários adultos saudáveis do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. A coleta foi realizada utilizando tubos a vácuo contendo ou não heparina sódica, conforme a necessidade de se utilizar sangue total ou soro, respectivamente, nos ensaios. A heparina sódica foi utilizada como anticoagulante pois, anticoagulantes complexantes, como o EDTA, citrato e oxalato, inibem a FA (BURTIS & ASHWOOD, 2001). Do total 3 eram do sexo feminino (23 a 30 anos de idade) e 3 do sexo masculino (30 a 56 anos de idade).

Após a padronização, foram constituídos três grupos para a aplicação do método quimiluminescente proposto. Como o objetivo desta dissertação foi o desenvolvimento de uma metodologia alternativa ao método citoquímico clássico, este também foi realizado nos três grupos a seguir:

- Grupo controle: 32 voluntários adultos saudáveis do Hemonúcleo Regional de Araraquara, 25 homens e 7 mulheres, com faixa etária variando entre 23 a 50 anos nos voluntários do sexo masculino, e 24 a 47 anos nas voluntárias do sexo feminino;

- Grupo LMC: 9 pacientes portadores de LMC, sendo 6 provenientes do Hospital Amaral Carvalho de Jaú e 3 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sendo deste total 6 mulheres (28 a 62 anos de idade) e 3 homens (19 a 58 anos de idade). Os pacientes inclusos no projeto tiveram o diagnóstico de LMC estabelecido por exame de citogenética com bandeamento G apresentando a translocação t (9,22) ou exame de RT-PCR método qualitativo apresentando transcrição do gene BCR/ABL. Pacientes elegíveis tinham que apresentar leucometria acima de 15.000 leucócitos/ μ L de sangue no dia da coleta sangüínea. Foram incluídos no estudo pacientes portadores de LMC sem tratamento prévio ou que tinham feito uso somente de hidroxiuréia. Para os casos em que havia sido feito uso de interferon α ou mesilato de imatinibe foi necessário exame de citogenética apresentando 20 metáfases, todas com a presença do cromossomo Ph sem outras alterações cromossômicas.
- Grupo RL: 9 pacientes portadores de reações leucemóides provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Destes 4 eram mulheres (38 a 76 anos de idade) e 5 homens (28 a 74 anos de idade). Foram incluídos no estudo pacientes com RL com contagens absolutas de leucócitos acima de 25.000 leucócitos/ μ L de sangue, com desvio à esquerda e com a presença de, pelo menos, metamielócitos.

Todos os pacientes dos grupos LMC e RL, no momento da coleta das amostras, já possuíam diagnóstico clínico-laboratorial comprovado ou de RL ou de LMC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e métodos

4.1. Reagentes

O kit para dosagem de FA foi obtido da Labtest[®] (Lagoa Santa, MG). Histopaque 1077[®] e 1119[®] e AMP (2-amino-2-metil-1-propanol) foram adquiridos da Sigma Diagnostics[®] (MO, E.U.A.). O substrato IMMULITE[®] (AMPPD (3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetano-3,2'-tríciclo[3.3.1.1]decan]4-il) fenilfosfato)) foi obtido da DPC[®] (CA, E.U.A.). Dextran T500 foi adquirido da Pharmacia Amersham[®] (Uppsala, Suécia) e o kit Leucognost[®]-Alpa da Merck[®] (Darmstadt, Alemanha).

4.2. Soluções

4.2.1. Solução de dextran 6%

Foram dissolvidos 6 g de dextran em um volume final de 100 mL de solução de cloreto de sódio 0,15M (NaCl).

4.2.2. Tampão AMP (2-amino-2-metil-1-propanol) 1,5 M

Foram adicionados 15,0 mL de AMP, 50 mL de água deionizada e 19 mL de HCl 1M a um recipiente. Este foi aquecido até que houvesse a completa dissolução do AMP. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e logo após foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 100mL com água deionizada. O pH foi acertado a 10,5 com HCl 0,5M.

4.3. Separação de células por gradiente duplo de densidade (Histopaque[®]) (BOYUM, 1968; ENGLISH & ANDERSEN, 1974)

Com a finalidade de estudar a especificidade do método proposto, foi necessário avaliar se a emissão de luz, decorrente da clivagem do AMPPD, era

proveniente somente da ação dos neutrófilos. Para isso leucócitos mononucleares e polimorfonucleares (PMN) foram separados de acordo com o método descrito abaixo.

A um tubo cônico de centrífuga de 15 mL foram adicionados 3 mL de Histopaque-1119[®]. Cuidadosamente, e pelas paredes do tubo, foram adicionados 3 mL de Histopaque-1077[®] sobre o Histopaque-1119[®]. Sobre o gradiente superior, foram adicionados 6 mL de sangue total heparinizado. O tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, de modo que camadas distintas puderam ser observadas após a centrifugação. O plasma foi descartado, a camada contendo os leucócitos mononucleares transferidos para um tubo e a camada contendo os leucócitos polimorfonucleares para outro. De acordo com o ensaio a ser realizado, o tubo contendo os mononucleares ou o tubo contendo os PMN foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi lavado duas vezes com solução de NaCl 0,15M, centrifugando-se por 10 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em aproximadamente 2 mL de solução de NaCl 0,15M.

4.4. Separação de células com dextran 6% - obtenção de leucócitos totais

(CIZ & LOJEK, 1997)

Como o método proposto se mostrou altamente específico para neutrófilos (ver resultados-Figura 5), pudemos fazer uso de uma metodologia mais simples e de baixo custo para obtenção de leucócitos.

O sangue total coletado com heparina foi misturado a uma solução de dextran 6%. Esta mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por uma hora. Após o repouso, o plasma rico em leucócitos foi retirado e transferido para um

tubo cônico onde foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células lavado duas vezes com solução de NaCl 0,15M, centrifugando por 10 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em aproximadamente 2 mL de solução de NaCl 0,15M e contadas em câmara hematimétrica.

4.5. Determinação da FA por metodologia colorimétrica (KING, 1943; ROY, 1970)

Foi necessário avaliar se o método quimiluminescente proposto se correlacionaria com o método colorimétrico já descrito para a determinação de FA sérica. Para isso a FA presente em soro foi determinada pelo método descrito abaixo e, posteriormente, este resultado foi comparado com o obtido por quimiluminescência.

Para determinação da FA sérica por método colorimétrico foi utilizado o kit comercial da Labtest[®] cuja metodologia utilizada (ROY modificado) se baseia na hidrólise da timolftaleína monofosfato a timolftaleína, em meio alcalino. A cor azul formada é diretamente proporcional à atividade enzimática.

A três tubos de ensaio, denominados branco, teste e padrão, respectivamente, foram adicionados 0,05 mL de substrato (timolftaleína monofosfato 22mM) e 0,05 mL de tampão (não citado 300mM). Somente ao tubo “padrão” foram adicionados 0,05 mL do reagente padrão (45 U/L). Os tubos foram incubados a 37°C por 2 minutos e, sem retirar os tubos do banho-maria, foram adicionados 0,05 mL da amostra (soro) a ser analisada ao tubo “amostra”.

Os tubos continuaram em incubação por mais 10 minutos. Após este tempo foram retirados do banho e 2,0 mL do reagente de cor (carbonato de sódio 94mM e hidróxido de sódio 250mM) foram adicionados a todos os tubos.

As absorvâncias do teste e do padrão foram determinadas em 590 nm, acertando o zero com o branco. A concentração de FA (U/L) presente na amostra foi calculada do seguinte modo:

$$\text{FA (U/L)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 45$$

4.6. Ensaio quimiluminescente para fosfatase alcalina neutrofílica

A mistura de reação era composta por IMMULITE[®] 20% (Lumigen[®]PPD (AMPPD), tampão AMP e intensificador cloreto de polivinilbenziltributílfosfonio), água deionizada e suspensão de neutrófilos, completando um volume final de 0,5 mL. As reações foram disparadas pela adição do substrato e monitoradas por 15 minutos a 25°C em um luminômetro Bio Orbit 1251 (Turku, Finlândia). A integral da emissão de luz foi utilizada como parâmetro analítico.

Para cada amostra, quatro concentrações diferentes de neutrófilos foram analisadas. Além de garantir que a concentração de FA fosse a única variável, a curva obtida para cada amostra permitiu o cálculo exato da atividade de FA por célula (*SLOPE* obtido por regressão linear). Assim, o *SLOPE* foi escolhido como parâmetro analítico para comparação entre os grupos.

4.7. Ensaio citoquímico para fosfatase alcalina neutrofílica (kit Leucognost® ALPA – Merck®)

O esfregaço sangüíneo foi confeccionado utilizando-se sangue total sem anticoagulante. Após secagem foi fixado na mistura fixadora LEUCOGNOST® por 1 minuto. Logo após foi lavado sob água corrente e deixou-se secar ao ar. O esfregaço foi então submerso por 10-15 minutos em uma solução recém-preparada do substrato 1-naftil-fosfato de sódio e revelador azul de viramina B. Após este tempo foi lavado com água destilada e deixou-se secar ao ar. Finalmente o esfregaço foi corado com corante de Mayer por 5 minutos, lavado com água corrente e seco ao ar.

Contaram-se 100 neutrófilos segmentados para se estabelecer o *score*. A faixa normal vai de 10 a 100 (HAYHOE & QUAGLINO,1958) ou 130 (KAPLOW, 1963).

Exemplo:

Contagem de células (%)	x	Intensidade da coloração	=	Produto
8	x	0	=	0
42	x	1	=	42
24	x	2	=	48
12	x	3	=	36
7	x	4	=	28
7	x	5	=	35
Soma = <i>score</i> de FA:			=	189

4.8. Análise estatística

Na comparação entre os grupos os resultados foram expressos pela mediana, primeiro e terceiro quartis. Os grupos foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) Kruskal-Wallis on ranks, seguido do teste de Dunn para comparação múltipla, com nível de significância em $p \leq 0,05$. A comparação entre as

técnicas colorimétrica e quimiluminescente ou citoquímica e quimiluminescente foi realizada por análise de regressão linear de Spearman.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e discussão

5.1. Padronização dos ensaios quimiluminescentes com IMMULITE® (AMPPD)

Embora o substrato IMMULITE® seja largamente utilizado em procedimentos imunoenzimáticos, inicialmente realizamos ensaios para nos assegurar que haveria uma correlação entre as técnicas colorimétrica convencional e a metodologia quimiluminescente aqui estudada. Para isso, a atividade da FA presente em soro foi determinada por colorimetria e comparada com a emissão de luz quando a mesma amostra foi submetida ao ensaio quimiluminescente. Como pode ser observado, foi obtida uma alta correlação entre as técnicas (Figura 2).

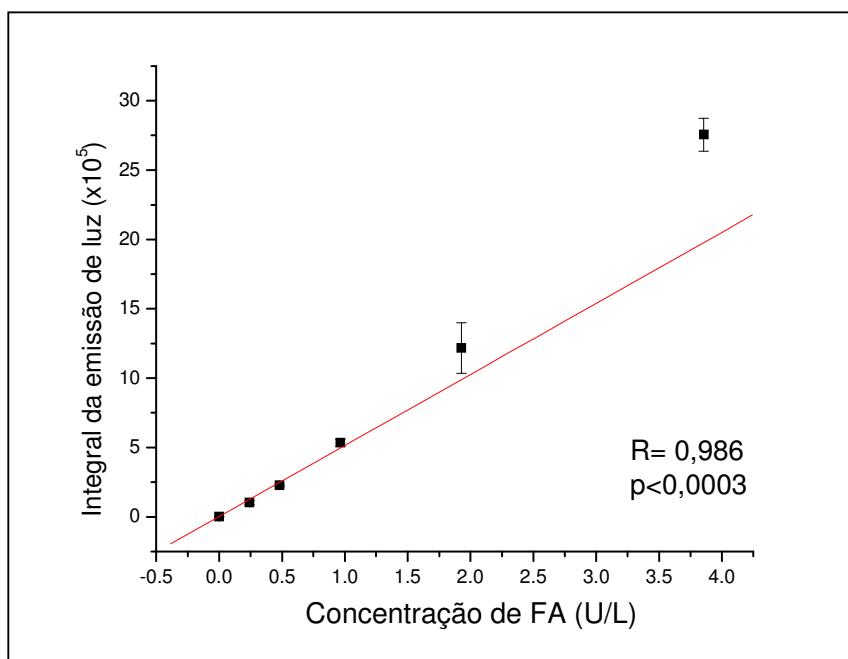


Figura 2: Correlação entre as técnicas colorimétrica e quimiluminescente. A determinação da atividade de FA por colorimetria está apresentada em materiais e métodos. O ensaio quimiluminescente continha soro diluído 100 vezes, IMMULITE® 3% (v/v), tampão AMP 30mM, 25°C, tempo de leitura 10 min, $V_f=0,5$ mL. Ensaios realizados em triplicata.

Como o substrato utilizado já é comercializado em condições otimizadas para uso no aparelho IMMULITE 2000[®], tornou-se necessário estudar em que condições o mesmo poderia ser utilizado para determinação da FA neutrofílica. O primeiro passo foi determinar a melhor concentração de tampão AMP (preparo demonstrado em Materiais e Métodos), que é o tampão de escolha para a determinação da FA por colorimetria. Vale lembrar que o substrato IMMULITE[®] também apresenta este tampão, embora em concentração desconhecida. A Figura 3 mostra a resposta quimiluminescente em relação à presença ou não do tampão AMP. O melhor resultado foi obtido sem a adição de tampão, ou seja, diluindo-se o substrato comercial apenas em água.

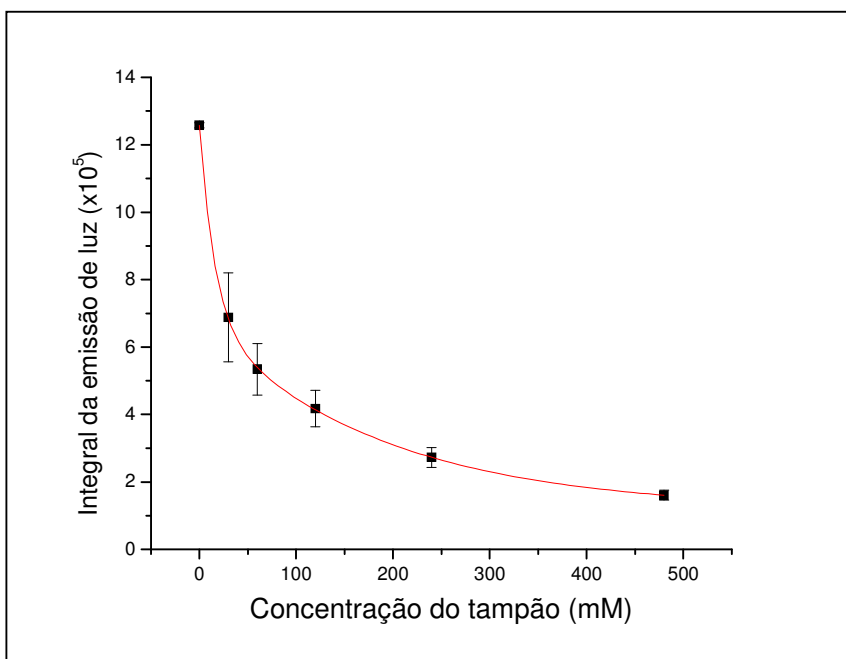


Figura 3: Estudo do efeito da diluição do tampão AMP na sensibilidade da técnica. Condições experimentais: soro humano diluído contendo FA (2,4U/L), IMMULITE[®] 5% (v/v), tampão (AMP), 25°C, tempo de leitura 10 min, $V_f=0,5\text{mL}$. Ensaio realizado em triplicata.

Considerando que os resultados anteriores mostraram que o substrato IMMULITE[®] poderia ser usado para determinação de FA em soro, passamos aos estudos com células. Na Figura 4 pudemos confirmar que a FA, presente em neutrófilos **íntegros** isolados por gradiente duplo de densidade (Histopaque[®]) de amostras de indivíduos saudáveis, poderia funcionar como elemento desencadeador da reação enzimática. A integral da emissão de luz foi proporcional ao número de células presente na reação. Quantidades superiores a 4×10^6 neutrófilos/mL ultrapassaram a capacidade de detecção do luminômetro (10.000 mV).

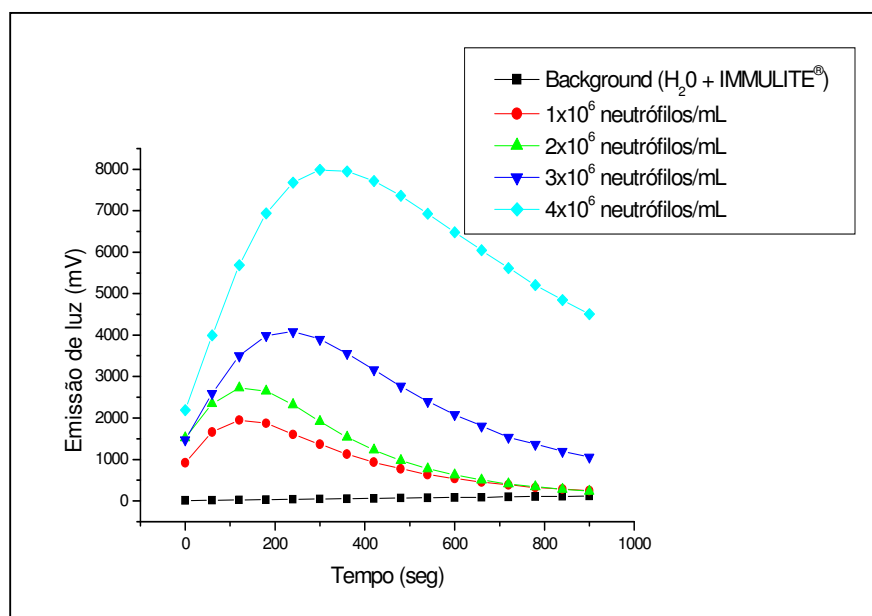


Figura 4: Perfil cinético da emissão de luz promovido pela hidrólise do AMPPD catalisada pela FA neutrofílica presente em neutrófilos íntegros isolados. Condições de reação: IMMULITE[®] 5% (v/v), 25°C, $V_f=0,5$ mL. Ensaios realizados em triplicata.

Seguindo o processo de otimização da técnica, foi testado o efeito da concentração do substrato IMMULITE® na eficiência da reação frente a um número constante de células provenientes de indivíduo saudável. Pode-se observar que, a partir da concentração de 15% (v/v) nenhum ganho de rendimento na reação foi observado; o que nos levou a padronizar arbitrariamente a concentração de IMMULITE® em 20% (v/v) (Figura 5). A saturação do meio em relação à concentração de substrato é essencial pois garante que a emissão de luz seja dependente somente da atividade da FA.

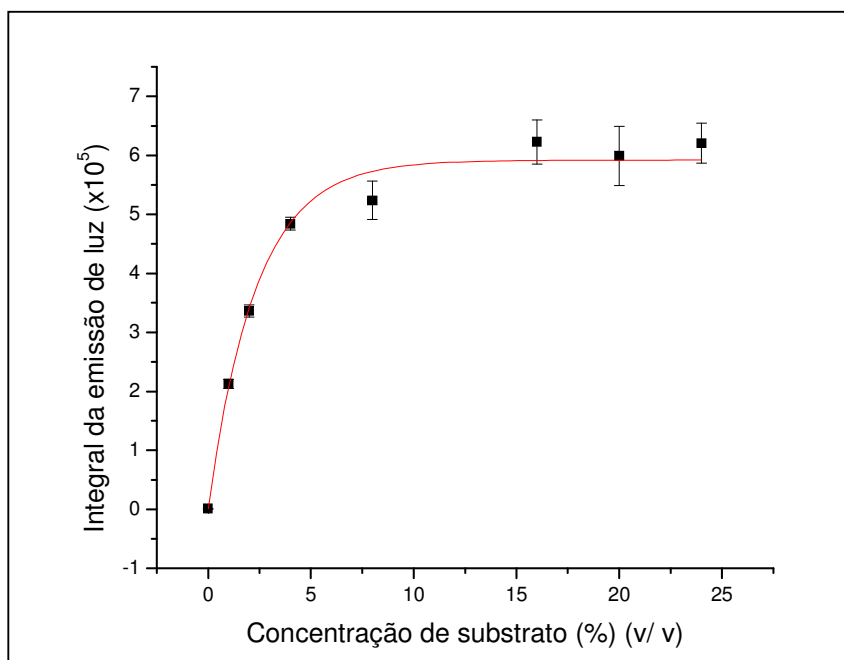


Figura 5: Efeito da concentração do substrato IMMULITE® na determinação de FA neutrofílica. Condições de reação: 60.000 neutrófilos/mL, 25°C, tempo de leitura 6 min, $V_f=0,5\text{mL}$. Ensaios realizados em triplicata.

Um ponto importante da metodologia proposta seria sua especificidade, ou seja, a garantia de que a emissão de luz seria decorrente apenas da presença dos neutrófilos. Assim, seria possível a utilização de procedimentos mais simples para separação de neutrófilos descartando a necessidade de procedimentos dispendiosos para isolamento de linhagens celulares purificadas. A Figura 6 mostra um experimento em que utilizamos leucócitos mononucleares e PMN isolados por gradiente duplo de densidade (Histopaque[®]). Como se pode observar, a emissão de luz decorrente da clivagem do AMPPD foi totalmente relacionada com os neutrófilos, uma vez que uma emissão próxima do *background* pôde ser observada com a fração dos leucócitos mononucleares. Deste modo pudemos concluir que a obtenção de leucócitos por hemossedimentação (dextran) seria suficiente, ou seja, não seria necessária uma preparação pura de neutrófilos ou mesmo a extração da enzima a partir dessas células.

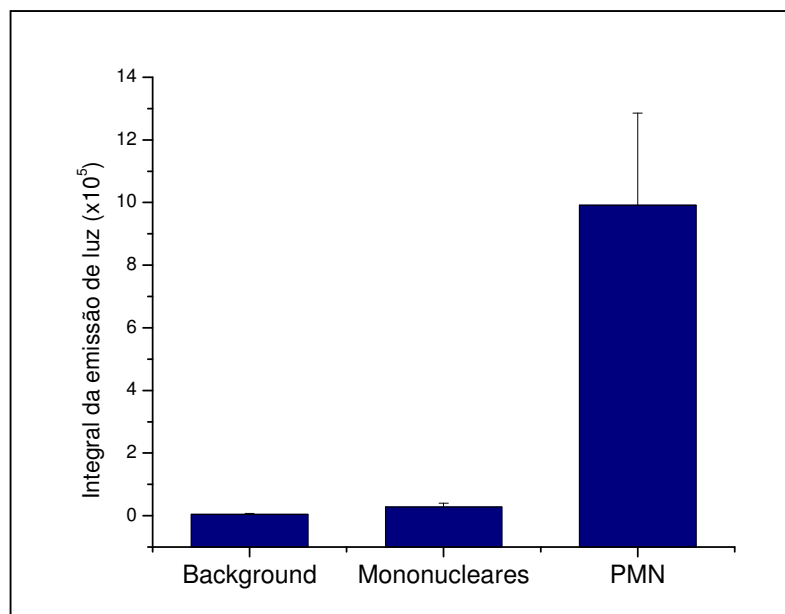


Figura 6: Neutrófilos *versus* células mononucleares como promotores de quimiluminescência. Condições de reação: 19.000 células/mL, IMMULITE[®] 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, $V_f = 0,5$ mL. Ensaios realizados em triplicata.

Depois de encontradas as condições ótimas de reação – IMMULITE® na concentração de 20% (v/v), reação realizada sem adição de tampão AMP, tempo de 15 minutos e temperatura de 25°C – o próximo passo foi avaliar a sensibilidade da técnica. Através de diluições sucessivas de uma suspensão de neutrófilos, pudemos constatar que o método possui uma altíssima sensibilidade, sendo o seu limite de detecção (sinal/ruído=3) de 500 neutrófilos de indivíduo normal por mililitro de reação (Figura 7). Evidentemente este limite também está condicionado à amostra testada, uma vez que existem patologias em que a atividade da FA por neutrófilo está alterada.

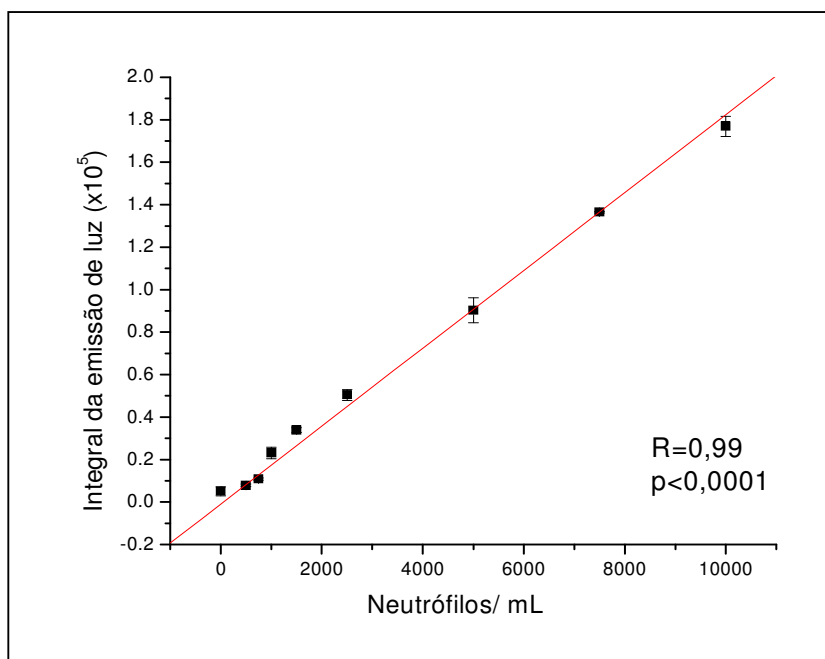


Figura 7: Curva de calibração número de neutrófilos *versus* emissão de luz. Condições de reação: IMMULITE® 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, $V_f=0,5\text{mL}$. Ensaios realizados em triplicata.

5.2. Aplicação do método

5.2.1. Valores normais

Uma vez otimizada a metodologia (IMMULITE® na concentração de 20% (v/v), reação realizada sem adição de tampão AMP, tempo de 15 minutos e temperatura de 25°C), utilizou-se a mesma para medir a atividade de FA neutrofílica em amostras de indivíduos normais.

A atividade da FA neutrofílica foi avaliada em quatro concentrações de células para cada amostra. Assim, construíram-se curvas de calibração correlacionando emissão de luz e número de neutrófilos. Além de garantir que a atividade da FA fosse a única variável, a curva obtida para cada amostra permitiu o cálculo exato da atividade de FA por célula (*SLOPE* obtido por regressão linear)

A Figura 8 mostra a obtenção dos *SLOPEs* para amostras de diferentes pacientes. O ensaio quimiluminescente proposto mostrou-se altamente reprodutível e linear, independente da amostra apresentar um alto (Figura 8A) ou baixo (Figura 8B) conteúdo de FA por neutrófilo.

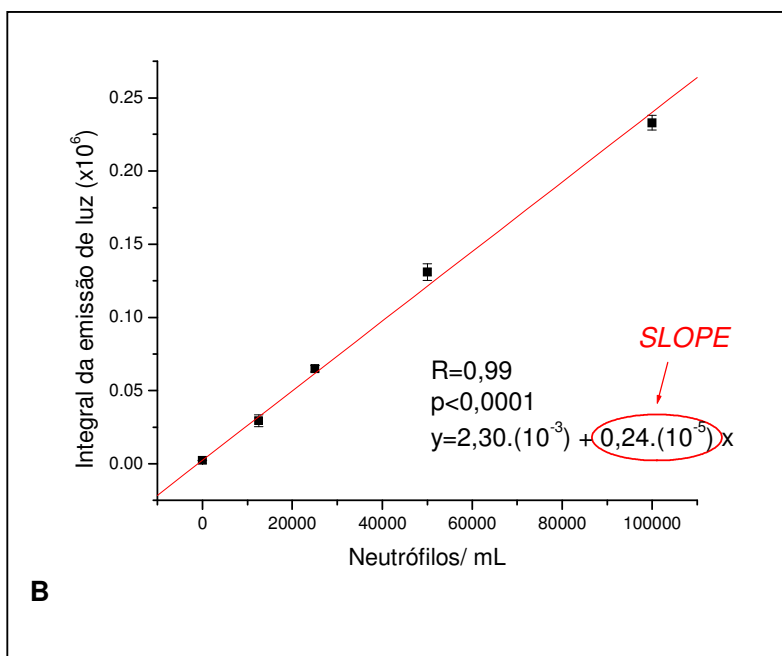
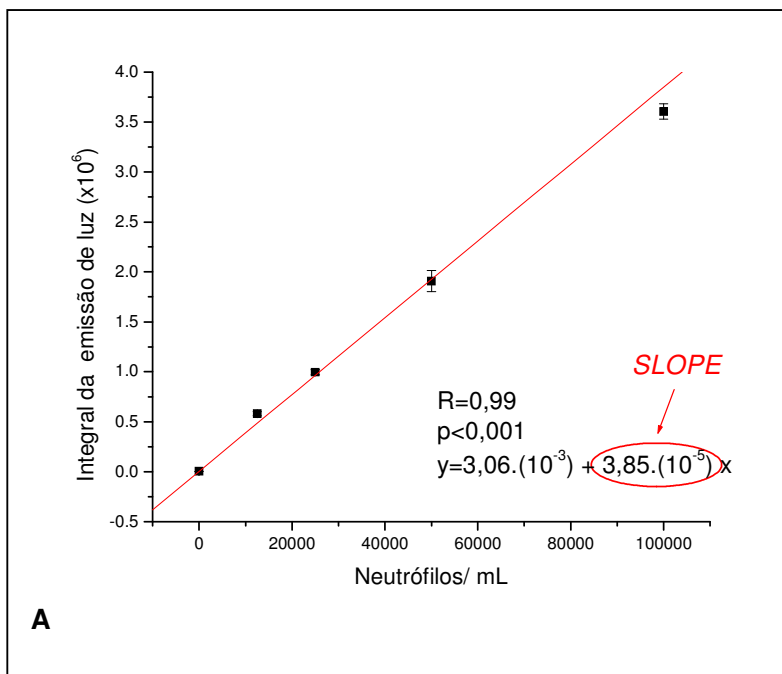


Figura 8: Curva de calibração número de neutrófilos *versus* emissão de luz para **(A)** alto conteúdo de FA (curva representativa da amostra 1 do Grupo RL) e **(B)** baixo conteúdo de FA (curva representativa da amostra 5 do Grupo LMC). Condições de reação: IMMULITE® 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, $V_i=0,5\text{mL}$. Ensaio realizado em triplicata.

Foram avaliados para o método proposto, neutrófilos de 32 indivíduos normais (Tabela 1). Tendo em conta que o objetivo desta dissertação foi o desenvolvimento de uma metodologia alternativa ao uso do método tradicional citoquímico em esfregaço sangüíneo, as mesmas amostras foram também submetidas a essa última metodologia. Como descrito na introdução, esta técnica tem como resultado a atribuição de um *SCORE*, o qual está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de *SLOPE* e *SCORE* para amostras de pacientes normais.

Amostras	<i>SLOPE</i> (10^{-5} mV.s / célula)	<i>SCORE</i>
1	5,60	111
2	0,61	15
3	1,57	42
4	1,43	31
5	1,30	50
6	4,81	116
7	5,06	88
8	1,65	35
9	8,49	158
10	1,88	37
11	7,24	127
12	1,81	36
13	2,16	48
14	2,77	74
15	2,70	76
16	1,93	53
17	5,35	121
18	1,44	41
19	1,26	24
20	4,51	82
21	2,75	52
22	2,58	44
23	1,14	22
24	1,70	29
25	2,42	34
26	1,53	19
27	3,79	82
28	0,68	13
29	7,24	124
30	2,31	47
31	0,78	12
32	0,77	11
Mediana	2,04	46
Varição	0,61 – 8,49	11 – 158

A Figura 9 mostra a correlação *SCORE* versus *SLOPE* para os indivíduos normais. O alto índice de correlação obtido entre as técnicas valida a metodologia aqui desenvolvida.

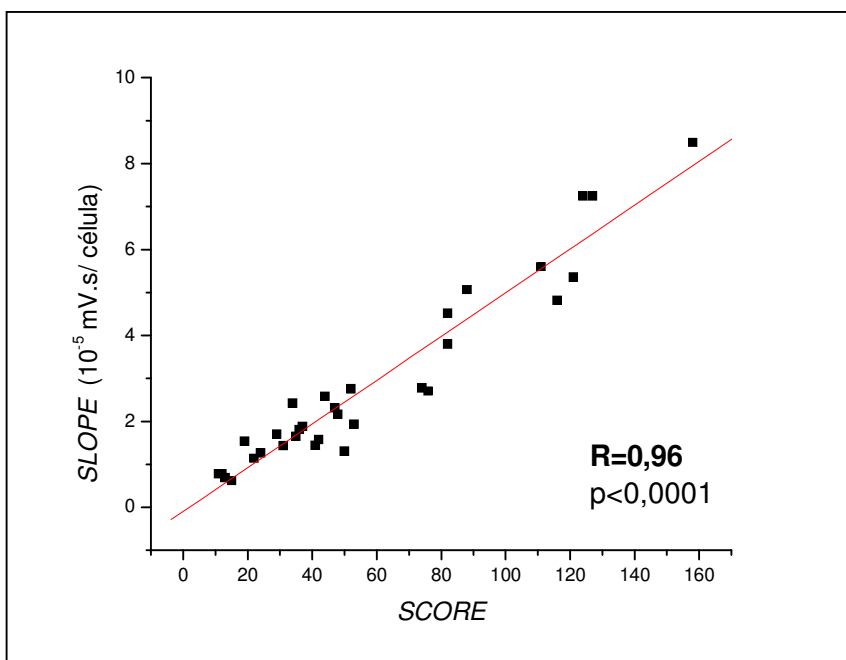


Figura 9: Correlação entre os ensaios quimiluminescente e citoquímico. Condições de reação: IMMULITE® 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, $V_f = 0,5\text{mL}$. $n = 32$.

5.2.2. Diagnóstico diferencial entre LMC e RL neutrofílicas

A Tabela 2 mostra os valores de *SLOPE* e *SCORE* para amostras do Grupo RL. Como pode ser observado na Figura 10, uma alta correlação foi obtida para *SCORE* versus *SLOPE* para neutrófilos de pacientes portadores de RL, da mesma maneira que para os indivíduos normais.

Tabela 2: Valores de *SLOPE* e *SCORE* para amostras de pacientes portadores de RL.

Amostras	<i>SLOPE</i> (10 ⁻⁵ mV.s/célula)	<i>SCORE</i>
1	3,85	181
2	28,80	343
3	9,58	297
4	6,60	251
5	7,50	301
6	47,20	423
7	4,30	243
8	36,10	401
9	40,80	345
Mediana	9,58	301
Varição	3,85 - 47,20	181 - 423

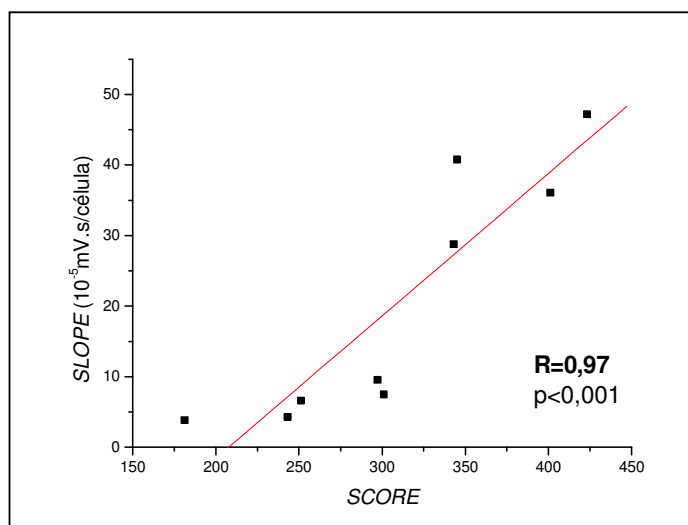


Figura 10: Correlação entre os ensaios quimiluminescente e citoquímico para indivíduos portadores de RL (n=9). Condições de reação: IMMULITE® 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, V_f=0,5mL.

A Tabela 3 mostra os valores de *SLOPE* e *SCORE* para amostras do Grupo LMC. Para os pacientes deste grupo, embora a correlação não seja tão forte como nos grupos anteriores, ela é significativa, verificando-se uma tendência clara de aumento do *SLOPE* em função do *SCORE* (Figura 11). Consideramos que esta correlação poderá ser melhorada com o aumento do número de casos.

Tabela 3: Valores de *SLOPE* e *SCORE* para amostras de pacientes portadores de LMC.

Amostras	<i>SLOPE</i> (10^{-5} mV.s/célula)	<i>SCORE</i>
1	1,75	70
2	0,51	16
3	1,14	7
4	1,03	4
5	0,24	5
6	0,79	11
7	0,07	1
8	1,05	3
9	0,15	2
Mediana	0,79	5
Varição	0,07 - 1,75	1 - 70

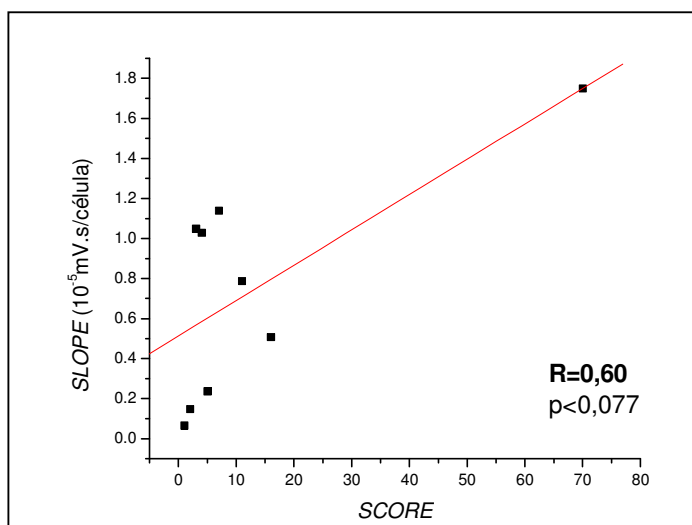


Figura 11: Correlação entre os ensaios quimiluminescente e citoquímico para indivíduos portadores de LMC (n=9). Condições de reação: IMMULITE® 20% (v/v), 25°C, tempo de leitura 15 min, $V_f=0,5$ mL.

A Figura 12 mostra que a medida do *SLOPE*, aqui proposta, permitiu uma diferenciação estatisticamente significativa entre os portadores de RL e os indivíduos acometidos de LMC. É importante ressaltar que todos os casos de RL puderam ser distinguidos dos casos de LMC quando um valor de *cutoff* de 2,40 (10^{-5} mV.s/célula) foi escolhido arbitrariamente (média + 3 DP) para os casos de LMC.

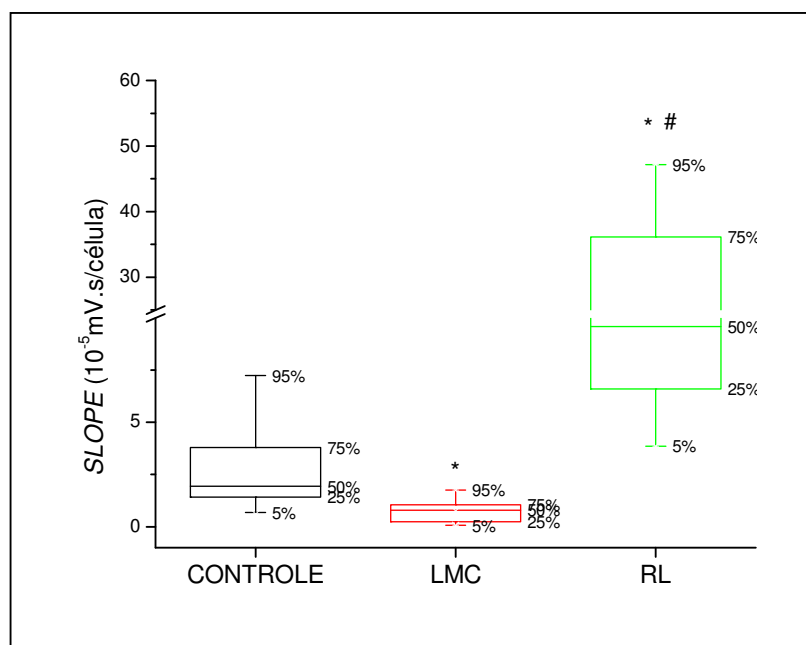


Figura 12: Comparação entre os *SLOPEs* de indivíduos normais, portadores de LMC e portadores de RL. O *box plot* mostra a mediana, primeiro e terceiro quartis e as barras de erro, o intervalo entre 5 e 95%.

* $p < 0,05$ CONTROLE versus LMC e RL.

$p < 0,05$ RL versus LMC.

A Figura 13 mostra essa mesma avaliação para a reação da FA por reação citoquímica.

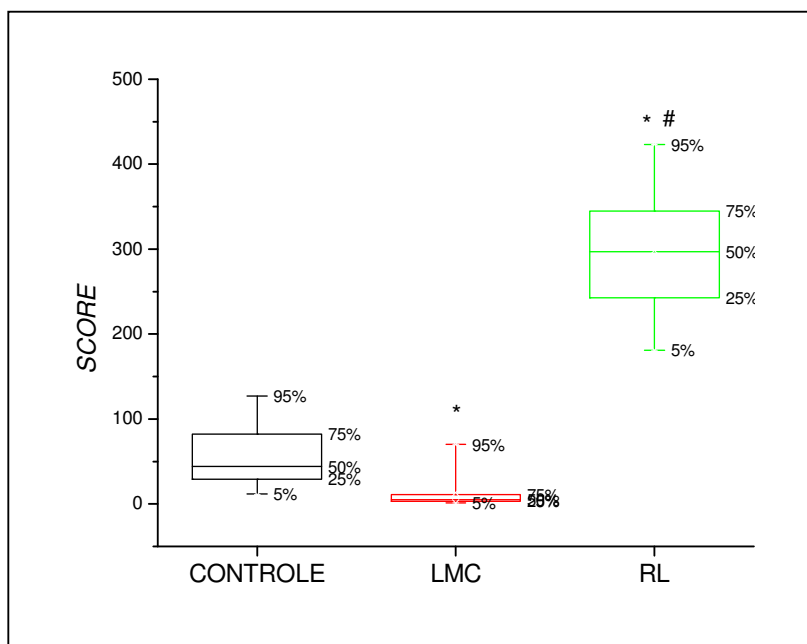


Figura 13: Comparação entre os SCOREs de indivíduos normais, portadores de LMC e portadores de RL. O *box plot* mostra a mediana, primeiro e terceiro quartis e as barras de erro, o intervalo entre 5 e 95%.

* $p < 0,05$ CONTROLE versus LMC e RL.

$p < 0,05$ RL versus LMC.

Como vimos, a LMC consiste em uma doença de células-tronco em que as características hematológicas e moleculares são bem definidas. Nesta patologia os granulócitos apresentam proliferação desregulada e algumas alterações funcionais, incluindo: i) diminuição de receptores mediadores de endocitose (MONTEIRO et al., 1992; KANT et al., 1995); ii) polimerização da actina diminuída (TARACHANDANI et al., 1995); iii) anormalidades na adesão, migração e fagocitose (KASIMIR-BAUER et al., 1994; RADHIKA et al., 1996). Entretanto, a característica mais comum na LMC é a ausência ou marcada diminuição da FA neutrofílica (DE PALMA et al., 1996).

As fosfatases alcalinas incluem diferentes isoenzimas capazes de hidrolisar ésteres de fosfato sob condições alcalinas (BURTIS & ASHWOOD, 2001). Em Hematologia a principal aplicação da determinação da atividade da FA se dá na diferenciação da LMC de outras doenças mieloproliferativas, como mielofibrose, policitemia *vera* ou de reações leucemóides (RL) decorrentes de inflamação/infecção (BENNETT et al., 1982). Apesar de ter um custo relativamente baixo (aproximadamente R\$ 34,00/ reação, levando-se em conta o valor do kit comercial) e de ser muito útil e, a metodologia citoquímica utilizada para determinação da FA em esfregaços sangüíneos é semi-quantitativa, laboriosa e subjetiva, sendo, portanto, sujeita à grande variação interlaboratorial (KAPLOW, 1963; RAMBALDI et al, 1997).

Embora antigo e subjetivo, o ensaio citoquímico ainda encontra larga aplicação em estudos epidemiológicos de triagem para LMC (GHANEI & VOSOGHI, 2002) ou como marcador de evolução da doença (GANTI et al, 2003). A determinação da FA neutrofílica, juntamente com dados clínicos, também pode ser utilizada como um indicativo de que caminho seguir, ou seja, pode determinar se procedimentos mais invasivos e/ou onerosos como biópsia de medula óssea, análise

molecular ou citogenética devem ser realizados (DE PALMA et al, 1996). Apesar de já ter sido descrito um ensaio por citometria de fluxo para determinação da FA neutrofílica, este consiste em um ensaio oneroso devido ao alto custo do citômetro de fluxo (aproximadamente R\$ 170.000,00), além de requerer um anticorpo específico para reconhecimento da enzima (RAMBALDI et al, 1997).

Nosso laboratório tem desenvolvido vários procedimentos quimiluminescentes como alternativa às reações citoquímicas clássicas; todos eles muito superiores a estas (FONSECA et al., 1993; FONSECA et al., 1998; FONSECA et al., 2003; DA COSTA et al., 2004).

O ensaio quimiluminescente aqui proposto torna-se, portanto, uma importante alternativa ao ensaio citoquímico clássico. Deve ser destacada a praticidade do método o qual permite trabalhar com neutrófilos íntegros sem a necessidade de extrair a FA dessas células e seu baixo custo (aproximadamente R\$0,60/ ensaio, levando-se em conta somente o preço dos reagentes). Sua sensibilidade também é excelente, podendo detectar uma quantidade ínfima de neutrófilos por reação (cerca de 1 célula por μL). Alternativamente ao processo de determinação proposto (*SLOPE*), poderíamos ter estipulado uma concentração fixa de células por reação para cada amostra e quantificado a quimiluminescência através da leitura do pico de emissão, ou da integral da luz emitida em determinado tempo de leitura. Todavia esse procedimento não nos pareceu o mais adequado uma vez que, o cálculo do *SLOPE* garante que a quantidade de enzima seja o único fator limitante da reação, garantindo-se assim a determinação da FA neutrofílica em condições experimentais ideais.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

O ensaio quimiluminescente desenvolvido torna-se, portanto, uma alternativa ao ensaio citoquímico, uma vez que foi capaz de detectar a enzima presente em neutrófilos íntegros apresentando alta sensibilidade. Além disso, como um ensaio quantitativo, esta técnica não é dependente de critérios subjetivos como reconhecimento de morfologia celular. A alta correlação observada entre o ensaio citoquímico clássico e o ensaio quimiluminescente é uma clara indicação de que este protocolo pode ser uma excelente alternativa ao método anterior.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R.C.; SJERNHOLM, R.L.; STEELE, R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 47, p. 679-684, 1972.

BAIN, B.J. **Diagnóstico em leucemias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 1-2; 123-135.

BAIN, B.J. **Células sangüíneas** – Um guia prático. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 369-370.

BAINTON, D.F. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. (Ed.) **Williams Hematology**. 6th ed. McGraw-Hill, 2001. p. 731-733.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br. J. Haematol.**, v. 33, p. 451-458, 1976.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 51, p. 189-199, 1982.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann. Intern. Med.**, v. 103, p.620-625, 1985.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 21 (97), p. 77, 1968.

BRONSTEIN, I.; EDWARDS, B.; VOYTA, J.C. 1,2-Dioxetanes: Novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 4, p. 99-111, 1989.

BURTIS, C.A.; ASWOOD, E.R. **Fundamentos em Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p. 304-305.

CERVANTES, F.; VILLAMOR, N.; ESTEVE, J.; MONTOTO, S.; RIVES, S.; ROZMAN, C.; MONTSERRAT, E. 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct haematological features. **Br. J. Haematol.**, v.100, p. 123-128, 1998.

CIZ, M.; LOJEK, A. Improved dextran preparation of human leucocytes for chemiluminescence analysis of the oxidative burst of polymorphonuclear cells. **Clin. Lab. Haem.**, v. 19, p. 49-51, 1997.

CLARKSON, B.D.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEK, C.; CARPINO, N. New understanding of the pathogenesis of CML: a prototype of early neoplasia. **Leukemia**, v. 11, p.1404-1411, 1997.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. New targeted approaches in chronic myeloid leukemia. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 6316-6324, 2005.

DA COSTA, M.; XIMENES, V.F.; BRUNETTI, I.L.; FALCÃO, R.P.; FONSECA, L.M. p-Iodophenol-enhanced luminol chemiluminescent assay applied to discrimination between acute lymphoblastic and minimally differentiated acute myeloid (FAB-M0) or acute megacaryoblastic (FAB-M7) leukemias. **Hematol. J.**, v. 5, p. 496-499, 2004.

DALE, D.C. Neutropenia and neutrophilia. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. (Ed.) **Williams Hematology**. 6th ed. McGraw-Hill, 2001. p. 831.

DE PALMA, L.; DELGADO, P.; WERNER, M. Diagnostic discrimination and cost-effective assay strategy for leukocyte alkaline phosphatase. **Clin. Chim. Acta**, v. 6, p. 83-91, 1996.

DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J.M.; LYDON, N.B.; KARTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C.L. Efficacy and safety of specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 344(14), p. 1031-1037, 2001.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G.M.; FANNING, S.; ZIMMERMAN, J.; LYDON, N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat. Med.**, v. 2, p. 561-566, 1996.

DULLEY, F.; HAMERSCHLACK, N. (rev). Manual ABRALE de Leucemia Mielóide crônica – Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia, 2004.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. **J. Immunol. Methods**, v. 5, p. 249, 1974.

EVANS, C.A.; OWEN-LYNCH, P.J.; WHETTON, A.D.; DIVE, C. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with suppression of apoptosis in hemopoietic cells. **Cancer Res.**, v. 53, p. 1735-8, 1993.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M. Mechanisms of disease: the biology of chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 341 (3), p. 164-172, 1999.

FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; CAMPA, A.; CATALANI, L.H.; CALADO, R.T.; FALCÃO, R.P. Assessment of monocytic component in acute myelomonocytic and monocytic/monoblastic leukemias by a chemiluminescent assay. **Hematol. J.**, v. 4, p. 26-30, 2003.

FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; REGO, E.M.; GARCIA, A.B.; CILENTO, G.; FALCÃO, R.P. Characterization of myeloid or lymphoid acute leukemia by chemiluminescence assay. Comparison with immunocytochemistry using an antimyeloperoxidase antibody. **Acta Haematol.**, v. 1, p. 19-24, 1993.

FONSECA, L.M.; YAVO, B.; CATALANI, L.H.; FALCÃO, R.P.; BRUNETTI, I.L.; CAMPA, A. Chemiluminescent determination of esterases in monocytes. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 13, p. 195-200, 1998.

GANTI, A.K.; POTTI, A.; MEHDI, S.A. Chromosomal anomalies in two coexistent myeloproliferative disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 145, p. 172-175, 2003.

GHANEI, M.; VOSOGHI, A.A. An epidemiologic study to screen for chronic myeloid leukemia in war victims exposed to mustard gas. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p. 519-521, 2002.

GISHIZKY, M.L.; WITTE, O.N. Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by bcr-abl in vitro. **Science**, v. 256, p. 836-9, 1992

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. **N. Engl. J. Med.**, v. 349 (15), p. 1451-64, 2003.

GORDON, M.Y.; DOWDING, C.R.; RILEY, G.P.; GOLDMAN, J.M.; GREAVES, M.F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of hematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. **Nature**, v. 328, p. 342-344, 1984.

HAYHOE, F.G.J.; QUAGLINO, D. Cytochemical demonstration and measurement of leukocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by a modified azo-dye coupling technique. **Br. J. Haematol.**, v.4, p.375-389, 1958.

HOROWITZ, M.M.; ROWLINGS, P.A.; PASSWEG, J.R. Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. **Bone Marrow Transplant**, v. 17:Suppl 3:S5-S6, 1996.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. (Ed.) **World Health Organization Classification of Tumours**. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, 2001. p.76-105.

KANT, A.; ADVANI, S.; ZINGDE, S. Decreased expression of both FcrRII and FcrRIII mRNA in leukemic granulocytes. **Leuk. Res.**, v. 19, p. 997-1000, 1995.

KANTARJIAN, H.; SAWYERS, C.; HOCHHAUS, A.; GUILHOT, F.; SCHIFFER, C.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; NIEDERWIESER, D.; RESTA, D.; CAPDEVILLE, R.; ZOELLNER, U.; TALPAZ, M.; DRUKER, B.; GOLDMAN, J.; O'BRIEN, S.G.; RUSSELL, N.; FISCHER, T.; OTTMANN, O.; CONY-MAKHOUL, P.; FACON, T.; STONE, R.; MILLER, C.; TALLMAN, M.; BROWN, R.; SCHUSTER, M.; LOUGHRAN, T.; GRATWOHL, A.; MANDELLI, F.; SAGLIO, G.; LAZZARINO, M.; RUSSO, D.; BACCARANI, M.; MORRA, E.; INTERNATIONAL STI571 CML STUDY GROUP. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 645-652, 2002.

KAPLOW, L.S. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase. Use of complex naphthol AS phosphates in azo dye-coupling techniques. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 439-449, 1963.

KASIMIR-BAUER, S.; OTTINGER, H.; BRITTINGER, G.; KONING, W. Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: functional defects in circulating mature neutrophils of untreated and interferon-alpha treated patients. **Exp. Hematol.**, v. 22, p. 426-431, 1994.

KING, E. J. Preparation of phenolphthalein phosphate. **J. Path. Bact.**, v. 55, p. 31, 1943.

KRICKA, L.; VOYTA, J. C.; BRONSTEIN, I. Chemiluminescent methods for detecting and quantitating enzyme activity. In: ZIEGLER, M. M.; BALDWIN, T. O. (Ed.) **Methods in enzymology**, 2000. v. 305, p.382.

KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H.M.; DRUKER, B.J.; TALPAZ, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. **Ann. Intern. Med.**, v. 138 (10), p. 819-830, 2003.

KRUMBHAAR, E.B. Leukemoid blood pictures in various clinical conditions. **Am. J. Med. Sci.**, v.172, p. 519-533, 1926. apud CALHOUN, D.A. DO; KIRK, J.M.S.; CHRISTENSEN, R.D.M.D. Incidence, significance, and kinetic mechanism responsible for leukemoid reactions in patients in the neonatal intensive care unit: A prospective evaluation. **J. Pediatr.**, v. 129(3), p.403-409, 1996.

LEE, S.J.; ANASETTI, C.; HOROWITZ, M.M.; ANTIN, J.H. Initial therapy for chronic myelogenous leukemia: playing the odds. **J. Clin. Oncol.**, v. 16 (9), p. 2897-2903, 1998.

MCCAPRA, F. Chemiluminescence of organic compounds. **Q. Rev. Chem. Soc.**, v. 20, 485-510, 1966.

MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6558-62, 1987.

MITUS, W. J.; KIOSSOGLON, K. A. Leukocyte alkaline phosphatase in myeloproliferative syndrome. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 155, p. 976-983, 1968.

MONTEIRO, J.; ADVANI, S.; ZINGDE, S. Decreased expression of FcrRIII mRNA in leukemic granulocytes. **FEBS Lett.**, v. 300, p. 105-107, 1992.

NISHII, K.; KABAROWSKI, J.H.; GIBBONS, D.L.; GRIFFITHS, S.D.; TITLEY, I.; WIEDEMANN, L.M.; GREAVES, M.F. BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. **Oncogene**, v. 13, p. 2225-2234, 1996.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A diminute chromosome in human CML. **Science**, v. 132, p.1497, 1960.

O'BRIEN, S.G.; GUILHOT, F.; LARSON, R.A.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, J.J.; FISCHER, T.; HOCHHAUS, A.; HUGHES, T.; LECHNER, K.; NIELSEN, J.L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; SAGLIO, G.; SHEPHERD, J.; SIMONSSON, B.; GRATWOHL, A.; GOLDMAN, J.M.; KANTARJIAN, H.; TAYLOR, K.; VERHOEF, G.; BOLTON, A.E.; CAPDEVILLE, R.; DRUKER, B.J.; IRIS INVESTIGATORS. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 994-1004, 2003.

OZER, H.; GEORGE, S.L.; SCHIFFER, C.A.; RAO, K.; RAO, P.N.; WURSTER-HILL, D.H.; POWELL, B.; GOTTLIEB, A.; PETERSON, B.A.; RAI, K.; TESTA, J.R.; LEBEAU, M.; TANTRAVAHU, R.; BLOOMFIELD, C.D. Prolonged subcutaneous administration of recombinant alpha 2b interferon in patients with previously untreated Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myelogenous leukemia: effect on remission duration and survival: Cancer and Leukemia Group B study 8583. **Blood**, v. 82 (10), p. 2975-2984, 1993.

PESCE, A.J.; KAPLAN, L.A. (Ed). **Methods in Clinical Chemistry**. St. Louis: The C.V. Morby Company, 1987. p. 1074-1077.

RADHIKA, V.; THENNARASU, S.; NAIK, N.R.; KUMAR, A.; ADVANI, S.H.; BHISEY, A.N. Granulocytes from chronic myeloid leukemia (CML) patients show differential response to different chemoattractants. **Am. J. Hematol.**, v. 52, p. 155-164, 1996.

RAMBALDI, A.; TERAU, M.; BETTONI, S.; BASSAN, R.; BATTISTA, R.; BARBUI, T.; GARATTINI, E. Differences in the expression of alkaline phosphatase in mRNA in chronic myelogenous leukemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 73, p. 1113-1115, 1989.

RAMBALDI, A.; MASUHARA, K.; BORLERI, G.M.; AMARU, R.; GIANI, M.; TERAU, M.; BARBUI, T.; GARATTINI, E. Flow cytometry of leucocyte alkaline

phosphatase in normal and pathologic leukocytes. **Br. J. Haematol.**, v. 96, p. 815-822, 1997.

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

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. **Clin. Chem.**, v.16, p. 431-436, 1970.

SPIERS, A. S. D.; BAIN, B. J.; TURNER, J. E. The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. **Scand. J. Haematol.**, v. 18, p.25-38, 1977.

TARACHANDANI, A.; ADVANI, S.H.; BHISEY, A.N. Chronic myeloid leukemia granulocytes exhibit reduced actin polymerization after chemotactic peptide stimulation. **Hematol. Pathol.**, v. 9, p. 27-35, 1995.

VAN RHEE, F.; SZYDLO, R.M.; HERMANS, J.; DEVERGIE, A.; FRASSONI, F.; ARCESE, W.; de WITTE, T.; KOLB, H.J.; NIEDERWISER, D.; JACOBSEN, N.; GAHRTON, G.; BANDINI, G.; CARRERAS, E.; BACIGALUPO, A.; MICHALLET, M.; RUUTU, T.; REIFFERS, J.; GOLDMAN, J.M.; APPERLEV, J.; GRATWOHL, A. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 20, p. 553-60, 1997.

VERFAILLIE, C. M. Chronic myelogenous leukemia: from pathogenesis to therapy. **J. Hemotherapy**, v. 8, p. 3-21, 1999.

XIMENES, V. E. **Estudo de novos sistemas quimiluminescentes aplicados na determinação de atividade enzimática.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000. 212 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.