

KARINA DE ARAUJO DUARTE

**PADRONIZAÇÃO DE ESTUDO DE MORTE DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA ÓPTICA EM PACIENTES QUIMIOTRATADOS.**

Rio de Janeiro

2020

KARINA DE ARAUJO DUARTE

**PADRONIZAÇÃO DE ESTUDO DE MORTE DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA ÓPTICA EM PACIENTES QUIMIOTRATADOS.**

**Dissertação de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas (Biofísica)**

Orientador(a): Dra. Isalira Peroba Rezende Ramos
Dr. Allan Cezar de Azevedo Martins

Rio de Janeiro

2020

Duarte, Karina de Araújo

Padronização de estudo de morte de leucócitos por microscopia óptica em pacientes quimiotratados. / Karina de Araújo Duarte. – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2020.

55 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Isalira Peroba Rezende Ramos e Allan Cezar de Azevedo Martins.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2020.

Referências: f.44-49.

1. Neoplasias - tratamento farmacológico. 2. Antineoplásicos - efeitos adversos . 3. Morte celular. 4. Leucócitos. 5. Neutropenia. 6. Ciências Biológicas - Tese. I. Ramos, Ramos. II. Martins, Allan Cezar de Azevedo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós- graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

KARINA DE ARAUJO DUARTE

**PADRONIZAÇÃO DE ESTUDO DE MORTE DE LEUCÓCITOS POR
MICROSCOPIA ÓPTICA EM PACIENTES QUIMIOTRATADOS.**

Dissertação de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica apresentada ao
Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas (Biofísica)

Aprovada em: __/__/2020

(Isalira Peroba Rezende Ramos, Doutora da Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Allan Cezar de Azevedo Martins, Doutor da Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Marcel Frajblat)

(Renata Travassos de Lima)

(Andrezza de Souza Piccoli)

Rio de Janeiro

2020

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo implementar no laboratório de análises clínicas do Hospital Federal de Bonsucesso (HFB) um procedimento operacional padrão (POP) relacionada a uma nova técnica que investigasse o processo de morte celular em leucócitos de pacientes quimiotratados a fim de diagnosticar de forma preditiva um possível avanço para o quadro clínico de neutropenia grave, quadro este considerado de suma importância pela equipe médica pois torna o paciente susceptível a graves infecções bacterianas, levando a interrupções ou adiamento das sessões quimioterápicas, aumentando assim a morbidade e mortalidade dos mesmos. Para avaliar qual melhor procedimento para esse estudo foi comparado duas diferentes técnicas: método de coloração direta e método de isolamento de leucócitos por gradientes de densidade, estes métodos avaliam as características morfológicas sugestivas de morte leucocitária através do uso de microscopia óptica de campo claro, a fim de confirmar tais resultados, lançamos mão do uso da técnica de microscopia fluorescência automatizada através da análise do High Contat Analysis. Conclui-se através da análise de 15 participantes quimiotratados no HFB, entre 18 a 65 anos, de ambos os sexos que a técnica mais satisfatória para implementação do POP foi o método de coloração direta, pois foi o método que melhor preservou a características sugestivas de morte leucocitária e por isso seus resultados foram mais compatíveis com o método confirmatório. Temos como expectativas a implementação desse método no HFB com o devido treinamento de profissionais capacitados e a criação de novos estudos afim de melhor relacionar a presença de características sugestivas de morte leucocitária com o real avanço do quadro de neutropenia grave.

Palavras-chaves: câncer, quimioterapia, neutropenia grave, morte celular.

ABSTRAT

This study aimed to implement in the clinical analysis laboratory of the Federal Hospital of Bonsucesso (HFB) a standard operating procedure (POP) related to a new technique that investigated the process of cell death that occurs in leukocytes of chemically treated patients in order to diagnose predictive form a possible advance for the clinical picture of severe neutropenia, a picture considered extremely important by the medical team because it makes the patient susceptible to serious bacterial infections, leading to interruptions or postponement of chemotherapy sessions, thus increasing their morbidity and mortality. In order to evaluate which best procedure for this study, two different techniques were compared: direct method and method of isolating leukocytes by density gradients, these methods evaluate the morphological characteristics suggestive of leukocyte death through the use of bright field optical microscopy, in order to confirm such results, we resorted to the use of the automated fluorescence microscopy technique through the analysis of the High Contat Analysis. It was concluded through the analysis of 15 chemotreated participants in the HFB, between 18 and 65 years old, of both sexes that the most satisfactory technique for implementing POP was the direct method. We expect the implementation of this method at the HFB with the appropriate training of trained professionals and the creation of new studies in order to better relate the presence of characteristics suggestive of leukocyte death with the real progress of severe neutropenia.

Keywords: cancer, chemotherapy, severe neutropenia, cell death.

LISTA DE SIGLAS

ATG	<i>Autophagy-related gene</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CAD	DNase ativada por caspase
CD-95	Ligante de receptor de morte 95
DNase	Desoxirribonuclease
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETC	Cadeia de transporte de elétrons
FA	Fluorescência automatizada
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Ligante Faz
HCA	High Content Analysis
H&E	Hematoxilina e Eosina
HFB	Hospital Federal de Bonsucesso
IMM	Membrana mitocondrial interna
IMS	Espaço intermembranar.
Inca	Instituto Nacional do Câncer
JNK	Quinases N terminais
LC3	Proteína de cadeia leve 3
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
MO	Microscopia Óptica
mTOR	Alvo de mamíferos da rapamicina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMM	Membrana mitocondrial externa
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI	Iodeto de Propídeo
POP	Procedimento Operacional Padrão
PTP	Poros de transição de permeabilidade
RIPK1	Proteína quinase RP1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR3 /4	<i>Toll-like receptor</i>

TNF *Tumor-necrosis-fator*

TRAF2 Fator 2 associado ao receptor TNF

TRAIL-R *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação de agentes antineoplásicos por Calabresi e Chabner.

Figura 2: A transdução de sinal cascata levando à morte celular necrótica e o papel do RIP1.

Figura 3: Mecanismo de estimulação com Ca^{2+} da geração de ERO mitocondrial.

Figura 4: Indução da apoptose via receptores de morte e por disfunção mitocondrial

Figura 5: Características morfológicas de apoptose e necrose.

Figura 6: Comparação de concentrado de leucócitos x sangue total. 6A-concentrado de leucócitos. 6B-Distensão sanguínea. 6C- Análise quantitativa de leucócitos em 20 diferentes campos

Figura 7: Comparação da Técnica de Coloração Direta com a Técnica Confirmatória de número de células mortas encontradas no sangue total expressos em valores percentuais.

Figura 8: Neutrófilo e Monócito com vacuolização citoplasmática.

Figura 9: Foto de isolado de leucócitos visualizado em microscopia de campo claro.

Figura 10: Comparação de número de células mortas analisadas em MO e analisadas em FA somente com material submetido a Técnica de Isolado de Leucócitos.

Figura 11: Comparação de células mortas visualizadas somente em MO. Parte do material foi submetido a Técnica de Coloração Direta e outra parte foi submetida a Técnica de Isolamento de Leucócitos.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de dados dos participantes do estudo.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 O Câncer	11
1.2 Quimioterapia	12
1.2.1 Classificação dos quimioterápicos antineoplásicos.	12
1.3 Os Efeitos Colaterais e a Neutropenia Grave	15
1.4 Processo de Morte Celular	16
1.4.1 Necrose celular	17
1.4.2 Apoptose celular	20
1.5 Atuação e Importância do Laboratório de Análises Clínicas nos Centros Oncológicos	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos:	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Aspectos Éticos	26
3.2 Pacientes e Amostra	26
3.3 Coleta de Amostras	27
3.4. Técnica de Coloração Direta.	28
3.5. Técnica de Isolamento de Leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares	29
3.6. Técnica de Triagem Celular em Microscopia de Fluorescência Automatizado – Técnica Confirmatória	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Análise da Técnica de Isolamento de Leucócitos	32
4.2 Análise de Viabilidade Comparativa de Microscopia Óptica x Fluorescência Automatizada em Sangue Total	34
4.3 Análise de Viabilidade Comparativa de Microscopia Óptica x Fluorescência Automatizada em Isolado de Leucócitos.	36
4.4 Análise de Viabilidade Comparativa de Sangue Total e Isolado de Leucócitos em Microscopia Óptica.	36
5. CONCLUSÃO	40
6. EXPECTATIVAS FUTURAS	40

7. REFERÊNCIAS.....	41
8. APÊNDICES	47
APÊNDICE A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO : MÉTODO DIRETO	47
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE	48
APÊNDICE C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

De acordo com Instituto Nacional do Câncer – INCA (2018) o câncer é um problema de saúde pública mundial e sua incidência cresceu 20% na última década. Acredita-se que em 2030, ocorram 27 milhões de novos casos de câncer ao redor do mundo. Já no Brasil, estimou-se para 2018/2019, cerca de 600 mil novos casos.

A explicação desse percentual tão alto de casos de câncer está diretamente relacionada à maior exposição dos indivíduos a fatores de risco cancerígenos. Os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho e nutrição, por exemplo, expõem os indivíduos a fatores ambientais mais agressivos, relacionados a agentes químicos, físicos e biológicos resultantes de um processo de industrialização cada vez mais desenvolvido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Vale citar que o progresso nos últimos anos tanto no âmbito tecnológico quanto na abordagem multidisciplinar especializada a fim de contribuir mais no campo diagnóstico, podem favorecer o aumento em número de novos casos, como por exemplo o estudo genômico correlacionando o gene com o tipo de câncer possibilitando conhecer a predisposição genética que o indivíduo venha apresentar (DANTAS et al., 2009) ou o surgimento de equipamentos de imagem mais sofisticados e até mesmo a contribuição da nanotecnologia colaboram com imagens altamente refinadas auxiliando em um diagnóstico preditivo e confiável (LEOPOLDINO et al., 2005).

O aumento da exposição a agentes cancerígenos pode provocar alterações no material genético de células normais, reprogramando-as de tal forma a promover o crescimento desordenado das mesmas que se dividem rapidamente, tendem ser um crescimento agressivo e incontrolável, afetando tecidos adjacentes e até mesmo órgãos distantes, formando metástases. Esse é o princípio básico da carcinogênese. (CAMPOS et al., 2012).

Contudo, paralelo a esse cenário há cada vez mais estudos sobre ação de tratamentos para combate ao câncer. De acordo com Andrade (2007; *apud* SILVA, 2015), atualmente os tratamentos de escolha são composta basicamente pela

remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e uso de bloqueadores enzimáticos.

Sendo a quimioterapia o mais usado, e por isso escolhido como nosso foco de estudo.

1.2 Quimioterapia

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos (quimioterápicos) no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de antineoplásica ou antilábica (INCA, 2018).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. (INCA,2018).

A partir dos estudos com gás de mostarda, criaram-se inúmeros agentes neoplásicos onde em sua maioria interagem quimicamente com o DNA, logo a interferência nesta molécula afeta a função e a proliferação tanto de células saudáveis quanto em células neoplásicas. Foi a partir dessa observação que Bruce et al. (2012) fizeram a classificação dos antineoplásicos de acordo com a atuação no ciclo celular, demonstrado e explicitado no item a seguir.

1.2.1 Classificação dos quimioterápicos antineoplásicos.

1.2.1.1 Quanto a sua relação ao ciclo celular.

Ciclo Inespecífico: atua nas células que estão ou não no ciclo proliferativo. Esse grupo de drogas que são eficazes quando células neoplásicas estão em ciclo de divisão (mitose) ou em repouso. Atuam geralmente em tumores de crescimento lento, com baixa fração de duplicação. Exemplo: mostardas nitrogenadas (BRUCE et al.,2012).

Ciclo Específico: atua somente nas células que se encontram em proliferação. Estes agentes são eficazes em tumores grandes com mais células ativas em divisão no momento da administração da droga. Estes quimioterápicos são geralmente dose-

dependente, ou seja, o número de células destruídas é diretamente proporcional à dose de droga administrada (BRUCE et al.,2012).

Do ponto de vista farmacocinético, apresentam geralmente uma curva de dose-resposta linear em que quanto maior a quantidade de droga administrada, maior a fração de células mortas. Exemplo: ciclofosfamida (BRUCE et al.,2012).

Fase – Específica: atua em determinadas fases do ciclo celular. A especificidade para a fase apresenta implicações importantes: observa-se um limite no número de células que podem ser erradicadas com uma única exposição instantânea (ou muito curta) à droga, uma vez que somente aquelas células que estiverem na fase sensível serão mortas. Uma dose mais elevada não consegue matar mais células. É necessário, então, promover-se uma exposição prolongada ou repetir a dose da droga para permitir que mais células entrem na fase sensível do ciclo (BRUCE et al.,2012).

As drogas fase-específicas atingem um limite na sua capacidade de aniquilamento celular, mas seu efeito é uma função tanto do tempo quanto da concentração. Acima de certa dose, maiores incrementos nas doses das drogas não resultam em mais morte celular. Se a concentração da droga é mantida por um período de tempo, mais células entrarão na fase letal específica do ciclo e serão mortas. Exemplo: Metotrexato (fase S), Ectoposídeo (fase G2), Vincristina (fase M). (Ações de enfermagem para o controle de câncer, 2015).

1.2.1.2 Quanto à relação com o ponto de interferência no DNA.

Outra classificação é a de Calabresi e Chabner (2003), os antineoplásicos classificam-se de acordo com o ponto de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese de DNA, transcrição e tradução como demonstrado na figura 1.

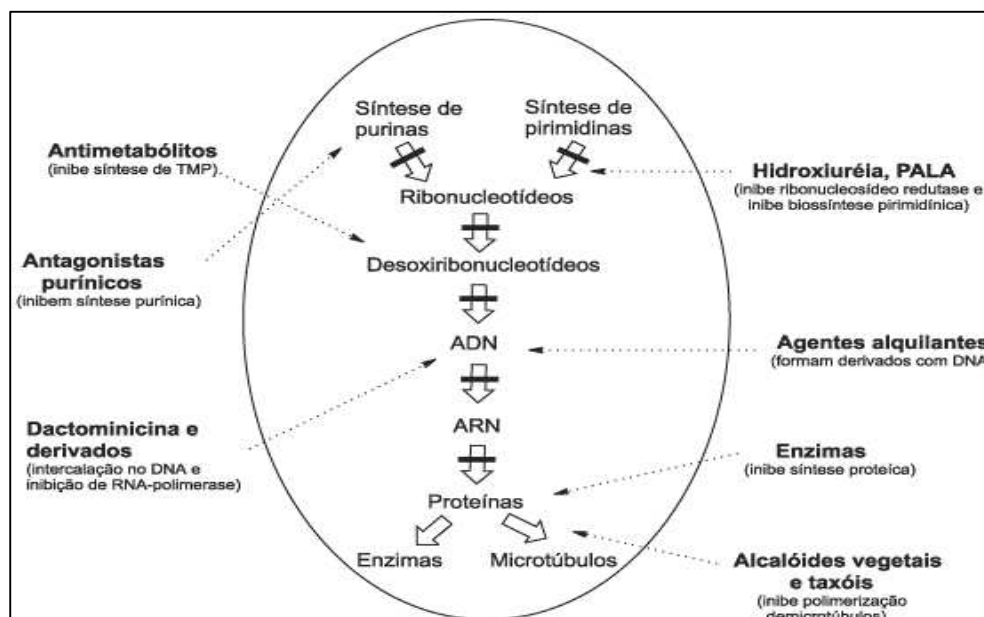


Figura 1: Classificação de agentes antineoplásicos por Calabresi e Chabner. Fonte: ALMEIDA, 2004

1.2.1.3 Quanto à estrutura química e função celular.

De acordo com Schulze (2007) os principais fármacos antineoplásicos utilizadas no tratamento de câncer atuam em alguma fase do ciclo celular e classificam-se de diferentes formas, como explicitado abaixo.

Alquilantes polifuncionais: se ligam ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno indispensável para a replicação. Afetam as células em todas as fases do ciclo celular. Raramente produzem efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes, também fase-específicos do ciclo celular. (mostarda nitrogenada, mostarda fenil-alanina, ciclofosfamida, o bussulfam, as nitrosuréias, cisplatina, ifosfamida) (SCHULZE, 2007).

Antimetabólicos: inibem a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e RNA, impedindo a multiplicação e funções normais da célula. São particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese celular durante a intérfase (fase S). Esta inibição da biossíntese pode ser dirigida às purinas (como é a ação dos quimioterápicos 6-mercaptopurina e 6tioguanina), à produção de ácido timidílico (5-fluoruracil e metotrexate) e outras etapas da síntese de ácidos nucléicos (citosina-arabinosídeo) (SCHULZE, 2007).

Antibióticos antitumorais: embora inibam a síntese de DNA e de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular. Possuem anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos. Podem apresentar outro grupo funcional que lhes acrescenta novos mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou inibição da função do DNA por intercalação (bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D e adriamicina e seus análogos mitroxantona e epirrubicina) (SCHULZE, 2007).

Inibidores mitóticos: podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Assim os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular. Tem os alcalóides da vinca rósea (vincristina, vimblastina e vindesina) e os derivados da podofilotoxina (o VP-16, etoposide; e o VM-26, teniposide). Devem ser associados a outros agentes para maior efetividade da quimioterapia (SCHULZE, 2007).

Outros agentes: algumas drogas não são agrupadas em uma determinada classe farmacológica como a dacarbazina (usada no tratamento de melanoma avançado, sarcoma de partes moles e linfomas), procarbazina (usada na doença de Hodgkin) (SCHULZE, 2007).

1.3 Os Efeitos Colaterais e a Neutropenia Grave

Entre os tratamentos para pacientes com câncer a quimioterapia antineoplásica é uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater a doença. Porém sua ação inespecífica leva a inúmeros efeitos colaterais (ALMEIDA et al. 2004).

Há conhecimento hoje na literatura de inúmeros efeitos colaterais, no tecido hematopoiético, por exemplo, os fármacos quimioterápicos podem causar pancitopenia: caracterizada pela redução das hemácias, dos leucócitos (principalmente os neutrófilos) e das plaquetas, gerada pela ação inespecífica dos fármacos, lesando tanto células malignas quanto saudáveis (GELESSON et al., 2009). Além de outros efeitos colaterais como: náuseas, perda de cabelo e suscetibilidade a infecções bacterianas (ALMEIDA et al. 2004).

Dentre os diferentes efeitos colaterais o que causa maior preocupação à área médica é o quadro de neutropenia grave. Essa situação é caracterizada quando a contagem absoluta de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) segue menor que 500 células/microlitro (ou $<0.5 \cdot 10^9/L$). Os neutrófilos desempenham um papel crítico na resposta inflamatória aguda e na defesa imunológica contra infecções bacterianas (BOXER; DALE, 2012). A neutropenia grave promove no paciente uma vulnerabilidade a agentes infecciosos, o que requer alterações no regime terapêutico preconizado, podendo, por um lado, conduzir a redução de doses ou, por outro, levar ao atraso de administração de ciclos. Tais alterações afetam significativamente a morbidade e por vezes, a mortalidade destes pacientes (BARROSO; DAMASCENO; DINIS, 2008).

Em vista disso, mostram-se importantes e necessários que laboratórios que atuam em centros oncológicos compreendem e reconhecem melhor o processo de morte leucocitária a fim de levar informações significativas sobre essa abordagem ao campo diagnóstico, podendo assim contribuir de forma preditiva ao combate a neutropenia grave, quadro clínico delicado retratado no trabalho de Barroso e colaboradores (2008)

1.4 Processo de Morte Celular.

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares. Em resposta ao estresse, ou lesão provocada na célula, a morte celular é a resposta final de um organismo e é um dos mais cruciais eventos na evolução de uma doença em qualquer tecido ou órgão. Porém, esse fenômeno ocorre também em circunstâncias normais como na embriogênese, no desenvolvimento dos órgãos e na manutenção da homeostase. (GRIVICICH et al., 2007).

As principais vias para morte celular são necrose e apoptose. Cada via apresenta características morfológicas e bioquímicas especiais que serão descritas neste trabalho.

1.4.1 Necrose celular

1.4.1.1 Necrose e o câncer

Há relatos de estudos que avaliam a ação de fármacos em proteínas específicas no processo de necrose na tentativa de atuar na eliminação de células malignas, como é o caso dos estudos em células ricas em RIPK1 (proteína quinase RP1), onde, verificou-se que a ação sobre elas podem demonstrar a propagação de necrose induzida pela proteína Fas, TNF (fator de necrose tumoral, do inglês, *tumor-necrosis-factor*) e pelo TRAIL-R (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF, do inglês, *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) pois estas dependem da presença de RIPK1 ativa. A morte celular induzida por RIPK1 e TRAF2 (fator 2 associado ao receptor TNF), são cruciais para a ativação do JNK (quinases N terminais). Esta quinase então prejudica a integridade da membrana mitocondrial, causando a liberação de proteínas do espaço intermembranar mitocondrial e consequentemente a necrose. (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

1.4.1.2 Aspecto bioquímicos/moleculares

A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem uma injúria que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose o conteúdo intracelular é liberado iniciando uma reação inflamatória local e danificando as células vizinhas (GRIVICICH et al, 2007).

Há também a morte celular independente da caspase pode fornecer um mecanismo de suicídio de backup se o mecanismo clássico de apoptose falhar. A morte celular induzida sob tais condições não possui as características típicas da apoptose, ao invés disso, se assemelha a necrose. Assim, a morte celular necrótica não é o resultado de uma cascata de sinalização bem descrita, mas é a consequência de uma extensa crosstalk (conversa cruzada) entre vários eventos moleculares em

diferentes níveis celulares. Dependendo do contexto, a necrose pode ser totalmente desregulada ou, pelo contrário, programada. (ÁLVAREZ; LACALLE; ÁLVAREZ, 2010).

Como representado na figura 2, o acionamento dos receptores de morte e do *Toll-like receptor* (TLR3 / 4), iniciam uma via de sinalização que leva à sobrevivência ou morte das células. Dependendo do contexto celular, a presença (figura 2 linha tracejada) ou ausência (figura 2 linha completa) de inibidores da caspase, as células morrem por apoptose ou necrose. O FADD (Domínio de morte celular associada ao receptor Fas, do inglês, *Fas-associated protein with death domain*) é um importante adaptador na sinalização do receptor da proteína RP1. (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

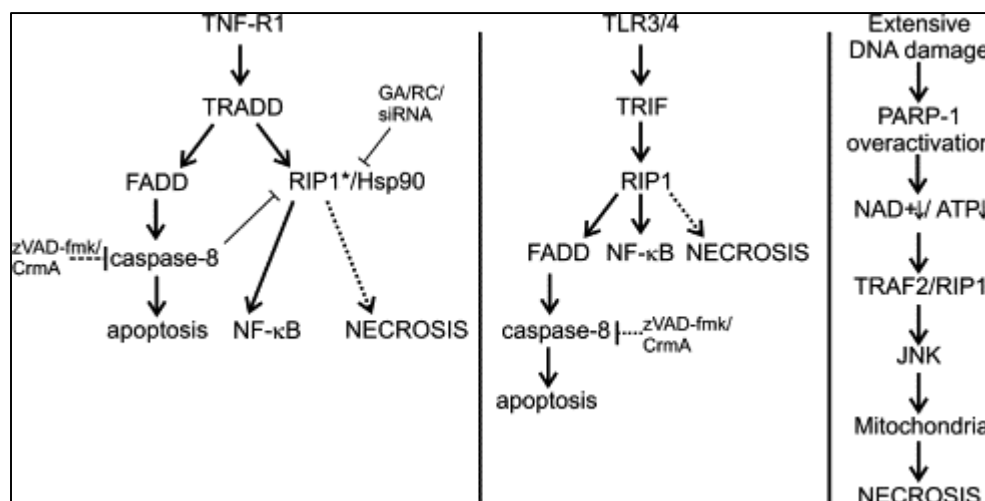


Fig 2: A transdução de sinal cascata levando à morte celular necrótica e o papel do RIP1.

Fonte: Festjens; Berghe; Vandenabeele (2006).

Há muitos outros mediadores envolvidos na fase de execução da morte celular necrótica, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO), cálcio (Ca²⁺), calpaína, catepsina, fosfolipases e ceramida. (EDINGER, THOMPSON, 2004).

As mitocôndrias são a principal fonte de ERO na célula. Os elétrons frequentemente escapam ao longo da cadeia de transporte de elétrons (ETC), geralmente nos complexos I e III. A reação do elétron renegado com oxigênio molecular produz um radical de oxigênio. As ERO formadas e atuando no ambiente hidrofóbico da membrana mitocondrial interna desempenham um papel importante

na citotoxicidade necrótica induzida por TNF α . (FESTJENS; BERGHE; VANDENABEELE, 2006).

Como mostrado na figura 3, a estimulação com Ca²⁺ melhora o fluxo de elétrons na cadeia respiratória, e a estimulação com Ca²⁺ da NOS (óxido nítrico sintase) e a geração subsequente de NO (óxido nítrico) inibem a respiração no complexo IV. Estes eventos aumentam a produção de ROS. Além disso, o NO e o Ca²⁺ podem inibir o complexo I, possivelmente aumentando a produção de ERO. Ca²⁺ em altas concentrações desencadeia a abertura do PTP (poro de transição de permeabilidade).

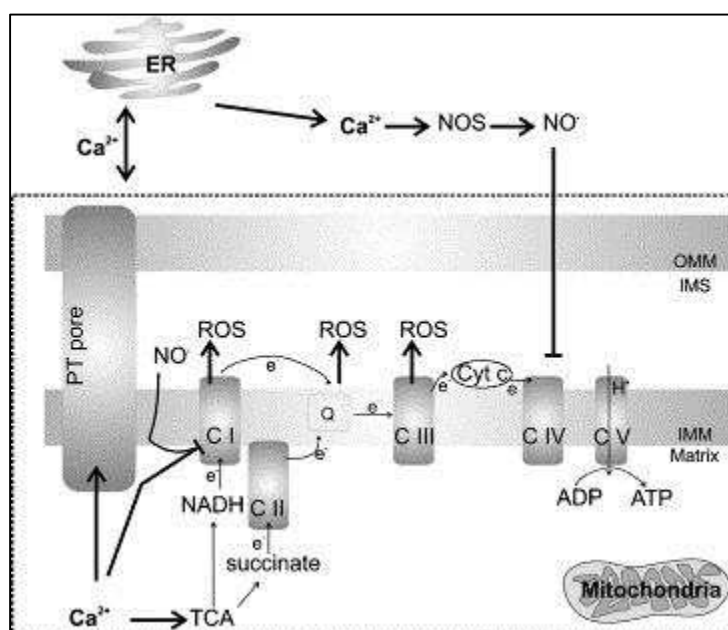


Figura 3: Mecanismo de estimulação com Ca²⁺ da geração de ERO mitocondrial. OMM: membrana mitocondrial externa. IMM: membrana mitocondrial interna. IMS: espaço intermembranar. Fonte: Festjens; Berghe; Vandenabeele (2006)

1.4.1.3 Aspectos morfológicos

A presença de células necróticas aumenta a eosinofilia (aumento da coloração rósea devido a maior concentração de enzimas acidófilas). Este fato é observado através de uma técnica utilizada em grande escala em rotina de laboratórios de análises clínicas, a qual consiste em corar as células com Hematoxilina e Eosina (H&E) para diferenciar estruturas acidófilas e basófilas. O resultado revela um aumento de conteúdo acidófilo, atribuível em parte às proteínas citoplasmáticas

desnaturadas que se atraem a Eosina, identificado através da coloração rósea a alaranjada. Há também perda de RNA citoplasmático, o que diminui a basofilia. Estas células podem apresentar aparência mais homogênea e cristalina, devido principalmente a perda de partículas de glicogênio. As figuras de mielinas (massas fosfolipídicas) são mais evidentes em células necróticas do que nas viáveis. Habitualmente há presença de vacúolos citoplasmáticos, pois enzimas lisossomais que são responsáveis pela digestão celular, são recrutadas para desintegrar as organelas. Numa análise ultraestrutural, nota-se, nestas células, uma descontinuidade da membrana celular e das membranas que compõe as organelas, além do aumento significativo das mitocôndrias e rompimento dos lisossomas. (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

Devido à degradação da cromatina e do DNA verificam-se alterações nucleares como descoloração basofílica do núcleo conhecida como cariólise, provavelmente devido à atividade da desoxirribonuclease (DNase). Outro padrão observado é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e o aumento da basofilia: o DNA se condensa em uma massa sólida e encolhida. E por fim pode ocorrer a cariorrexe, onde núcleo picnótico sofre fragmentação podendo desaparecer totalmente dentro de 1 a 2 dias. As células necróticas podem persistir por algum tempo ou serem fagocitadas por outras células. Pode ocorrer também o processo de calcificação, onde tais células são impregnadas por ácidos graxos e estes se ligam a sais de cálcio. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013)

1.4.2 Apoptose celular

1.4.2.1 Apoptose e o câncer

A apoptose no câncer tem sido amplamente estudada e é bem reconhecido que a via de sinalização apoptótica é obrigatoriamente prejudicada durante o processo de transformação oncogênica. Não é de se surpreender que a atividade reduzida da caspase seja muito comum em células cancerígenas, bem como o desequilíbrio entre as proteínas anti e pró-apoptóticas BCL2 E BAX, respectivamente são importantes no resultado da resposta ao medicamento (SHEN et al. 2010).

Restaurar a apoptose é uma estratégia terapêutica para o tratamento do câncer que tem sido explorada e intensivamente estudada. Por exemplo, o Oblimersen®, que é um medicamento antisense, ou seja, impede a formação da proteína; foi o primeiro medicamento direcionado ao BCL2 a iniciar um ensaio clínico. A combinação de Oblimersen® como tratamento convencional resultou em uma quimiossensibilização (KNOX et al. 2008). A partir disso foram realizados outros estudos com o desenvolvimento de inibidores de pequenas moléculas específicas para proteínas BCL2 antiapoptóticas com a avaliação da potencialização da eficácia de medicamentos estabelecidos e capacidades em diminuir a carga de quimioterápicos ao paciente (VOUGLER, 2014).

1.4.2.2 Aspectos bioquímicos/moleculares

De acordo com Edinger e Thompson (2004) a apoptose é uma via de morte celular induzida por um programa estritamente regulado por proteínas (enzimas) que quanto ativadas degradam o DNA e proteínas nucleares e citoplasmáticas.

Há dois mecanismos conhecidamente envolvidos que são disparadores no processo apoptótico (figura 4). O primeiro é mediado por um fator receptor ligante na superfície celular externa, onde as moléculas ativadoras TNF- α e TNF- β , ligam-se ao receptor celular TNF, os ativadores FasL (Ligante Fas) aos receptores Fas ou CD95 (Ligante de receptor de morte 95) que são produzidas pelo sistema imune. Tais proteínas ativam as pró-caspases, que são a forma inativa da proteína apoptótica caspase 8, essa, quando em sua forma ativa inicia a cascata de proteases e ao final da via a CAD (DNAse ativada por caspase) entra no núcleo e cliva o DNA, produzindo fragmentos característicos das células apoptóticas. (VASCONCELOS et. al, 2016).

O segundo mecanismo, nos mostra que sinalização interna envolve uma variedade de estímulos não mediados por receptores e que produzem sinais intracelulares que agem sobre alvos dentro da célula e convergem na mitocôndria (ELMORE et. al, 2007). Nesse caso, sinais de morte são detectados pela mitocôndria que em caso de morte é permeada pelas proteínas BAX que liberam citocromo c da cadeia transportadora de elétrons no citosol. No citoplasma, o citocromo c liga-se ao fator faa-1, até então inibido pela ligação com proteínas BCL-2 na superfície externa da mitocôndria, e na presença de ATP ativam a caspase 9 na extremidade do

citocromo, esse por sua vez ativa a caspase 3, 6 e 7 que inicia a cascata de proteases, culminando na apoptose (NELSON; COX, 2013)

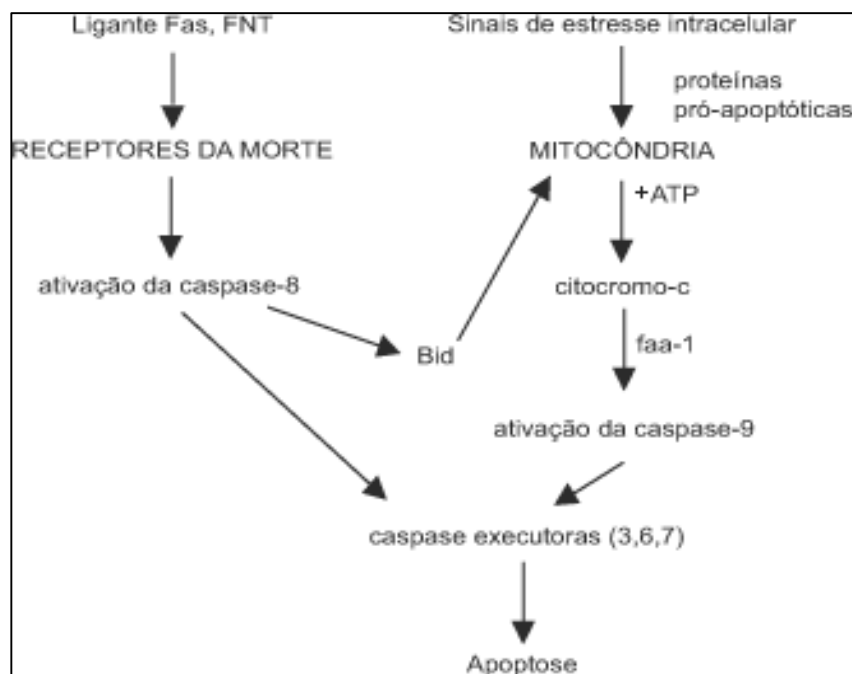


Figura 4: Indução da apoptose via receptores de morte e por disfunção mitocondrial

Fonte: Adaptado de Kaplowitz (2008)

As caspases são, portanto, responsáveis pelos eventos bioquímicos que promovem as modificações morfológicas que culminam na morte da célula, os mais importantes são: (I) a proteólise é irreversível, sendo a regulação das proteases limitada ao controle de sua atividade e da disponibilidade de substratos, posto que não há como voltar atrás após a clivagem de uma proteína; (II) as proteases são sintetizadas inativas e ativadas por catalise no momento de sua requisição, e (III) são capazes de regular sua própria ativação através de feedback negativo e positivo. Elas agem modificando as proteínas que mantem as células vivas, como: membranas biológicas, proteínas responsáveis pela organização da cromatina, proteínas ligadas ao reparo e replicação do DNA e proteínas do citoesqueleto (BENETONE, 2005).

1.4.2.3 Aspectos morfológicos

No aspecto morfológico espera-se observar fragmentos das células apoptóticas, porém com membrana plasmática intacta, conhecido como corpos apoptóticos, mas devido as mudanças significativas na membrana como a exposição da fosfatidilserina, um componente fofolipídico que normalmente localiza-se no folheto interno da membrana. Esta quando externalizada promove o recrutamento de fagócitos que eliminam rapidamente células em apoptose, não permitindo que conteúdo do seu interior extravase. A apoptose difere da necrose, pois esta última tem como característica a perda da integridade da membrana, digestão enzimática da célula e extravasamento dos conteúdos intracelulares. Entretanto a apoptose e a necrose podem coexistir, e a apoptose induzida por antígenos patológicos pode progredir para necrose. (GRIVICICH et al, 2007).

A apoptose pode ocorrer tanto em situações fisiológicas como na destruição programada de células na embriogênese, como em condições patológicas eliminando células que estão geneticamente alteradas ou lesadas de modo irreparável. Neste último caso observamos situações em que há danos ao DNA provocada por radiação, lesão citotóxica provocada por quimioterápicos ou hipóxia, devido a produção de radicais livres (GASQUEZ, 2013).

Suas características morfológicas são muito marcantes e coordenadas (figura 5). De um modo geral, é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Após esse processo a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas envoltas por uma membrana e com conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação DNA, a qual possui um padrão característico: uma endonuclease é

ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base. (GRIVICICH et al, 2007).

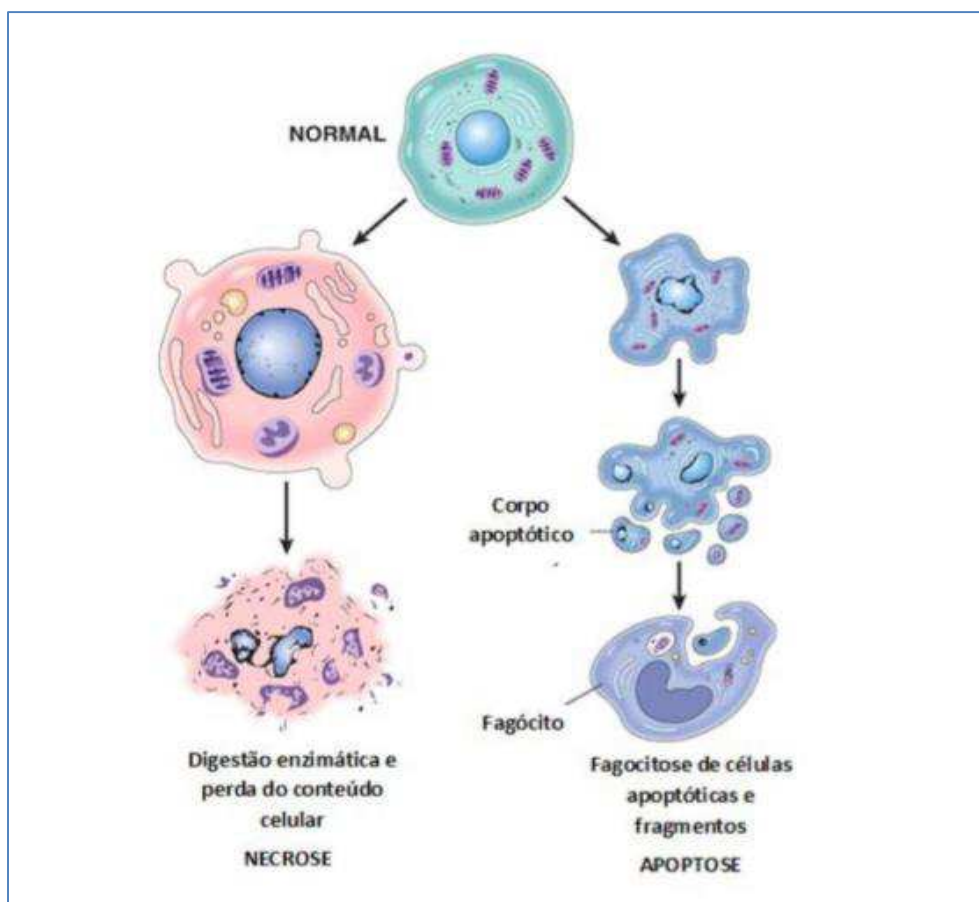


Figura 5: Características morfológicas de apoptose e necrose. Fonte: adaptação de Grivicich et al. (2007)

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, o que leva a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer. (NICHOLSON,2010)

1.5 Atuação e Importância do Laboratório de Análises Clínicas nos Centros Oncológicos.

Em vários Centros Oncológicos, incluindo o serviço oferecido pelo Hospital Federal de Bonsucesso/RJ (HFB) a rotina de exames laboratoriais sempre inclui a

avaliação do Hemograma Completo, justamente para acompanhar a depressão medular que o paciente possa vir apresentar durante a quimioterapia. Este exame avalia e quantifica hemácias, leucócitos e plaquetas. Na rotina do HFB é executado inicialmente por meio de automação e posteriormente tais células são avaliadas e qualificadas através de distensões sanguíneas devidamente coradas..

A coloração usada é o corante é o Wright, é uma variação do método Romanowsky, técnica que utiliza uma combinação de corante ácido (vermelho) usualmente a eosina e corante básico (azul de metileno) para serem observadas em microscopia de campo claro (OLIVEIRA, 2007).

Seria então plausível deduzir que a avaliação microscópica minuciosa pode-se ser uma ferramenta importante e significativa para análise de leucócitos em pacientes oncológicos, a fim de investigar possíveis alterações morfológicas sugestivas de um processo de morte celular pois estas poderiam sinalizar uma iminente leucopenia neutropênica, quadro importante para avaliação e conduta terapêutica. Sendo assim, a análise de tais alterações pode fornecer dados suficientes para uma possível intervenção médica antes que esse paciente entre no quadro de neutropenia grave, evitando que o mesmo torna-se mais suscetível a infecções bacterianas e diminuindo suas chances de cura como descrito no trabalho de Barroso et al. (2008). Sendo assim, um profissional bem treinado e capacitado deverá reconhecer alterações morfológicas sugestivas deste processo de morte celular dos diversos tipos contribuindo então de maneira preditiva para melhor diagnóstico deste paciente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.

Criar protocolo padronizado para o uso de técnica de pesquisa de morte leucocitária por microscopia óptica em pacientes quimiotratados do Hospital Federal de Bonsucesso/RJ.

2.2. Objetivos Específicos:

- Padronizar técnica de isolamento e concentração de leucócitos por gradiente de densidade.
- Verificar características morfológicas compatíveis com as que ocorrem em processo de morte leucocitária através de duas técnicas distintas: o método direto e método de isolamento de leucócitos no sangue periférico dos pacientes quimiotratados do HFB.
- Analisar e confrontar resultados obtidos na microscopia óptica com métodos de fluorescência automatizada.
- Criar Procedimento Operacional Padrão - POP para realização da pesquisa de morte leucocitária através do uso da microscopia óptica em pacientes quimiotratados do HFB.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa, com o protocolo experimental e o TCLE, foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Federal de Bonsucesso, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e complementares. O pesquisador principal foi responsável por conduzir o estudo em estrita observação ao protocolo aprovado (CAAE: 26073319.6.0000.5253. Apêndice C).

3.2 Pacientes e Amostras

Foram selecionados 7 mulheres e 8 homens com idade entre 18 e 65 anos que realizaram sessões de quimioterapia no ambulatório de oncologia do Hospital Federal de Bonsucesso/RJ., independente do tipo de câncer, do seu estadiamento, e do quimioterápico de escolha (quadro 1). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). As amostras para o estudo foram de

sangue total com anticoagulante EDTA e foram considerados critérios de exclusão para esta pesquisa amostras com volume inferior a 4 ml, material com tempo maior de 4 horas entre a coleta e a entrega ao laboratório, amostras coaguladas, hemolisadas ou lipêmicas.

PACIENTE	SEXO	IDADE	CÂNCER	QUIMIOTERÁPICO
P1	FEM	46	MAMA	Ciclofosfamida + 5-fluorouracil (5-FU)
P2	MASC	65	PRÓSTATA	Docetaxel
P3	MASC	59	PRÓSTATA	Docetaxel
P4	FEM	42	MAMA E COLO DO ÚTERO	Ciclofosfamida+5-FU
P5	FEM	60	MAMA	Cisplatina + Gemcitabina
P6	MASC	59	PRÓSTATA	Docetaxel
P7	MASC	58	ESTÔMAGO	Docetaxel
P8	FEM	51	FÍGADO	5-FU + Oxaliplatina
P9	MASC	62	COLORRETAL	5-FU
P10	MASC	44	FÍGADO	5-FU + Oxaliplatina
P11	MASC	62	PRÓSTATA	Cabazitaxel
P12	FEM	64	FÍGADO	5-FU + Oxaliplatina
P13	FEM	59	FÍGADO	5-FU + Oxaliplatina
P14	MASC	22	TESTÍCULO	Etoposido+Cisplatina
P15	FEM	18	LEUCEMIA	Citarabina

Quadro 1 – Lista de dados dos participantes do estudo.

3.3 Coleta de Amostras

Estes pacientes realizaram em sua rotina laboratorial, o exame de hemograma completo através do equipamento Coulter LH 750 (Beckman Coulter) para avaliação de hemácias, plaquetas e leucócitos a fim de obter informações importantes sobre a medula óssea: se a mesma está produzindo número suficiente de células maduras de diferentes linhagens e se os processos de diferenciação, proliferação e maturação estão reproduzindo de forma adequada (SILVA et al., 2016).

As amostras em estudo foram colhidas na fase de pré- quimioterapia (fase que o paciente é avaliado se está em condições de realizar a quimioterapia, por meio da análise do hemograma completo), em punção venosa através do sistema a vácuo ou por seringa e agulhas e preservados em tubo contendo EDTA, o volume colhido de sangue total foi de 4 mL e então encaminhado imediatamente para o laboratório de análise. Após a avaliação e liberação do hemograma completo para a equipe médica, essa mesma amostra será reutilizada para o estudo em questão, não expondo o paciente a uma nova coleta, poupando-o de intervenções e incômodos extras.

3.4. Técnica de Coloração Direta.

Após as amostras colhidas serem processadas para realização do Hemograma Completo, foram confeccionadas distensões sanguíneas e coradas com o corante Wright (Bioclin, Quibas. Química Básica Ltda. Ref:006)

De acordo com Oliveira et al. (2007) conforme citado por Vale (2014), o corante Wright segue a metodologia de coloração Romanowsky, este foi constituído por diferentes misturas de corantes básicos e ácidos, as tiazinas (o azul-de-metileno e seus derivados) e as eosinas, respectivamente. Baseando-se no princípio que estruturas ácidas se deixam corar pelos corantes básicos (cor azul), e que estruturas celulares básicas se deixam corar pelos corantes ácidos (eosina – cor alaranjada a avermelhada), entendem-se as variações das colorações das células sanguíneas, adquirindo como exemplo prático, a coloração azulada dos núcleos devido a alta concentração de DNA e a coloração levemente avermelhada das hemácias em virtude da hemoglobina ali presente.

Foi realizada a técnica de coloração Wright (Bioclin, Quibas. Química Básica Ltda. Ref:006) que consistiu em cobrir o esfregaço com 20 gotas do corante. Após, 5 a 7 minutos, foi adicionado 20 gotas de água e homogeneizado. Após 3 a 5 minutos, a lâmina foi lavada em água corrente. E por fim, deixada para secar em posição vertical.

As lâminas coradas foram visualizadas em microscópio ótico de campo claro, lidas em lentes objetivas de aumento de 100x em óleo de imersão (óleo mineral). Os resultados obtidos foram descritos pelo número de células com características de

morte celular em uma população de 200 leucócitos, e expressos em valores percentuais.

As análises microscópicas foram feitas em duplicatas, e seus resultados somados e dividido por 2 para obtenção de uma média para cada amostra estudada.

3.5. Técnica de Isolamento de Leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares.

Essa técnica fundamentou-se no isolamento simultâneo de células mononucleares e polimorfonucleares de sangue periférico, utilizando gradiente descontínuo de Ficoll-Histopaque $d=1,077$ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Ref:63/10-3) e $d=1,119$ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Ref:02/11-1).

Utilizou-se um tubo cônico graduado de 10 ml onde foi vertido primeiramente 2 ml de Histopaque densidade 1,119. Em seguida, acrescentados 2 ml de Histopaque 1,077 vagarosamente. Por fim, adicionou-se 4 ml de sangue total seguido por centrifugação por 30 minutos a 700 x G, sem aplicação de freio no final do processo. Os reativos foram conservados em temperatura de 2 a 8°C, porém foi necessário que a alíquota dos mesmos estivesse em temperatura ambiente no momento do uso (SAITO, 2007).

Após a centrifugação foram observadas 2 camadas distintas: uma superior de mononucleares e inferior de polimorfonucleares, com ajuda de uma pipeta, foram recolhidas as duas camadas e foram realizadas 2 lavagens com solução tampão fosfato-salino ou também conhecida como PBS (tampão fosfato salina, do inglês, *phosphate buffered salin*).

A lavagem foi feita com PBS diluído 1:10, adicionou-se 10 ml desse material no concentrado de mononucleares e polimorfonucleares e o submeteu a uma centrifugação de 200 x G por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi corado com corante Wright seguindo a técnica descrita no item 3.3.

Foi deixado a lâmina secar na estufa por 30 minutos, em seguida seguiu-se com a técnica de coloração Wright (Bioclin, Quibas, Química Básica Ltda. Ref:006) conforme o método descrito acima.

Em seguida investigou-se em microscópio de campo claro com objetiva de 100x (imersão) a presença de células com características de morte celular. Resultado

obtido foi descrito pelo número de células com características de morte celular em uma população de 200 leucócitos, e expressados em valores percentuais.

3.6. Técnica de Triagem Celular em Microscopia de Fluorescência Automatizado – Técnica Confirmatória.

Para confirmar o resultado das amostras positivas, foi lançado mão do método com corantes fluorescentes: Hoechst e o Iodeto de Propídeo (PI). Essa técnica foi baseada na propriedade que Hoechst tem de ligar-se ao DNA, preferencialmente as áreas de Adenina-Timina, revelando assim todas células das amostras as vivas e mortas. Ele foi excitado em um comprimento de onda próximo ao 350nm (luz ultravioleta) e emitiu fluorescência verde/azul próximo aos 460nm. (DUARTE et al., 2017).

Há também a utilização do marcador nuclear fluorescente PI, ele foi excitado no comprimento de onda de 488nm e emitiu uma cor vermelha (617nm) (Bertho, 2015) tornando-se possível verificar células necróticas. Tal propriedade deve-se ao fato que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, ao menos que tais células apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre na necrose. Desse modo, utilizando Hoechst combinado com PI visualizou-se número total de células simultaneamente. (VERMES et al., 1995).

A análise foi realizada no equipamento High Content Analysis - HCA, este é método de triagem de alto conteúdo, onde uma combinação da biologia celular, com todas as suas ferramentas moleculares, com microscopia automatizada de alta resolução e manipulação robótica, proporcionando uma resposta eficiente até mesmo quando necessita de uma avaliação em grande escala. As células foram expostas primeiro a produtos químicos, nesse trabalho a corantes fluorescente especificamente onde as alterações na morfologia celular foram detectadas, analisadas e quantificadas usando estudo de imagens.

3.6.1 Preparo das amostras para análise no HCA

3.6.1.1 Protocolo 1 – placa com poli-L-lisina

Neste protocolo utilizamos placas com 24 poços e poli-L-lisina. A solução de Poli-L-lisina é comumente usada na aderência de seções de tecidos a superfícies de plásticos e vidro para imuno-histoquímica. Este protocolo foi baseado na característica eletrostática onde o polímero de poli-L-lisina que é carregado positivamente é capaz de atrair as células, estas com carga negativa, permitindo a adesão delas ao fundo da placa (BARTH, 2008)

A técnica consistiu em:

- Foi diluído 1 µl de Hoechst concentrado em 5 ml de PBS.
- Foi aplicado 50 µl de Hoechst diluído em 50 µl de isolado de leucócito.
- Na amostra de sangue total realizou-se uma diluição prévia de 1:10 com PBS.
- Aguardou-se 15 minutos.

- Preparou-se a placa com poli-L-lisina colocando 30 µl em cada poço, foi aguardado 15 minutos. Após esse tempo retirou-se o excesso de poli-L-lisina.

Posteriormente, foi adicionado 1 µl de Iodeto de Propídeo nas soluções descritas acima. Para melhor visualização dos leucócitos em microscopia óptica, foi necessário lavar solução de sangue total com PBS, para retirar o excesso de hemácias, pois estas prejudicariam a análise devido a possibilidade de múltiplas camadas formadas ao fundo. Este processo consistiu em

- Após o preparo da placa tratada com poli-L-lisina, foi preenchido o fundo do poço completamente com a amostra tratada com Hoechst (cerca de 30 µl)

- Acrescentou-se 30 µl de PBS para homogeneizar
- Foi desprezada toda solução contida na placa
- Repetiram-se os itens anteriores 2x, porém na última não foi desprezado a solução.

- Foram aguardados 30 minutos para leitura

Vale lembrar que a solução de isolados de leucócitos era pobre em hemácias, não sendo necessário o processo de lavagem.

3.6.1.2 Protocolo 2 – lâmina e lamínula

A técnica consistiu primeiramente em:

- Foi diluído 1 µl de Hoechst concentrado em 5 ml de PBS.
- Foi aplicado 50 µl de Hoechst diluído em 50 µl de isolado de leucócito.
- Na amostra de sangue total realizou-se uma diluição prévia de 1:5 com PBS, esta diluição contribuiu na visualização de leucócitos nas imagens, em seguida foram adicionados 50 µl de Hoechst diluído.
- Aguardou-se 15 minutos para marcação.
- Posteriormente, foi adicionado 1 µl de Iodeto de Propídeo nas soluções descritas acima. Aguardou-se 10 minutos e foi preparado a solução em lâmina e lamínula para leitura no equipamento. Foi recomendado que a leitura seja concluída entre 15 a 30 minutos pois é o tempo de exposição ao iodeto de maior precisão nos resultados, conforme Pio (2019).

Resultados obtidos para avaliação de morte celular foram expressos em porcentagem e calculados da seguinte forma: números de núcleos corados com IP / número de núcleos corados com Hoechst x 100. (DUARTE et al., 2017)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da Técnica de Isolamento de Leucócitos

Conforme Siemsen et al. (2019), é importante isolar os leucócitos para uma análise mais precisa de suas propriedades com intuito de melhor contribuir nos estudos sobre tudo que se propõe a resposta imune. Assim como trabalho de Siemsen este trabalho recorre a técnica de isolamento de leucócitos a fim de otimizar a avaliação de morte leucocitária, ao intencionar a concentração destas no campo de microscopia ótica, possibilitando a visualização e análise de maior número de células.

Está demonstrado na figura 6 o concentrado de leucócitos obtidos através do uso da técnica de isolamento de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, em microscopia ótica de campo claro, com uso de lentes objetivas de aumento de 100x. Na figura 6B, com mesma microscopia e lentes objetivas citadas anteriormente, visualiza-se um campo de distensão sanguínea corada pela técnica de coloração

direta e sem concentração de leucócitos. Foi observado um maior número de leucócitos (figura 6A) na amostra onde houve a concentração pro gradiente de densidade, comparado a amostra que não passou por esse processo (figura 6B) como já esperado. A figura 6C mostra a análise quantitativa desses leucócitos.

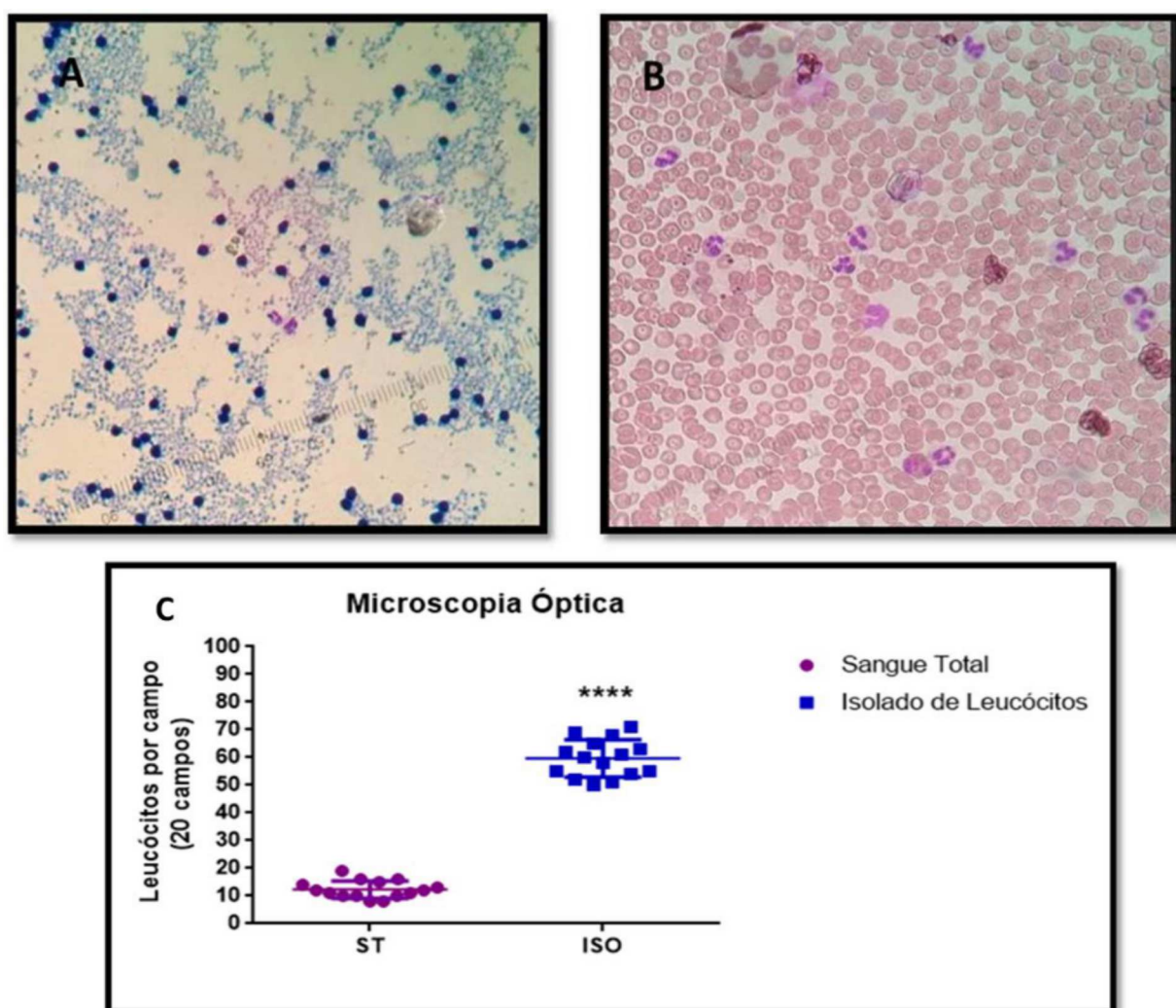


Figura 6. Comparação de concentrado de leucócitos x sangue total. 6A-concentrado de leucócitos. 6B-Distensão sanguínea. 6C- Análise quantitativa de leucócitos em 20 diferentes campos

4.2 Análise de Viabilidade Comparativa de Microscopia Óptica x Fluorescência Automatizada em Sangue Total

Esta análise comparou os resultados das amostras submetidas a Técnica de Coloração Direta com a Técnica Confirmatória e seus resultados foram expostos na figura 7 representada através do gráfico abaixo onde observa-se número de leucócitos com características de morte celular observados em Microscopia Óptica (MO), e o número de leucócitos mortos observados em FA.

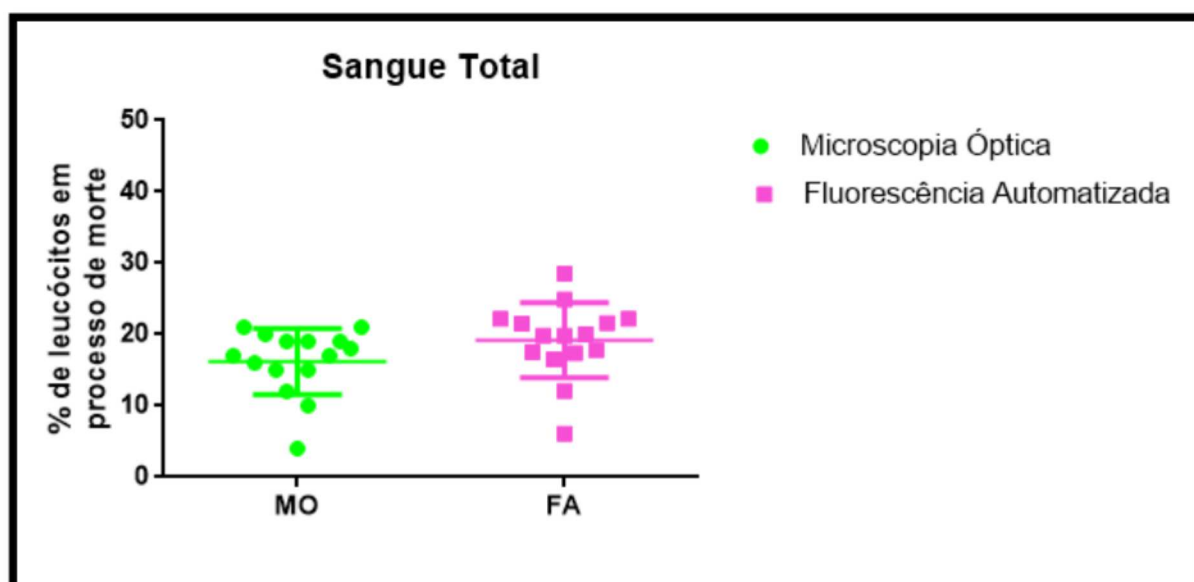


Figura 7: Comparação da Técnica de Coloração Direta (verde) com Técnica Confirmatória (rosa) de número de células mortas encontradas no sangue total expressos em valores percentuais.

Lembrando que enquanto na FA, foi realizado uma avaliação por fluorescência, investigou-se integridade da membrana devido a característica observada no Iodeto de Propídeo, já na MO, foram observados aspectos morfológicos, característicos de morte celular (figura 8) onde pode-se visualizar grandes vacúolos citoplasmático (setas vermelhas), sugerindo um processo de morte celular naquelas células características marcante ao processo de necrose pois as enzimas lisossomais, responsáveis pela digestão intracelular são recrutadas a desintegrar as organelas. (EDINGER; THOMPSON, 2004)

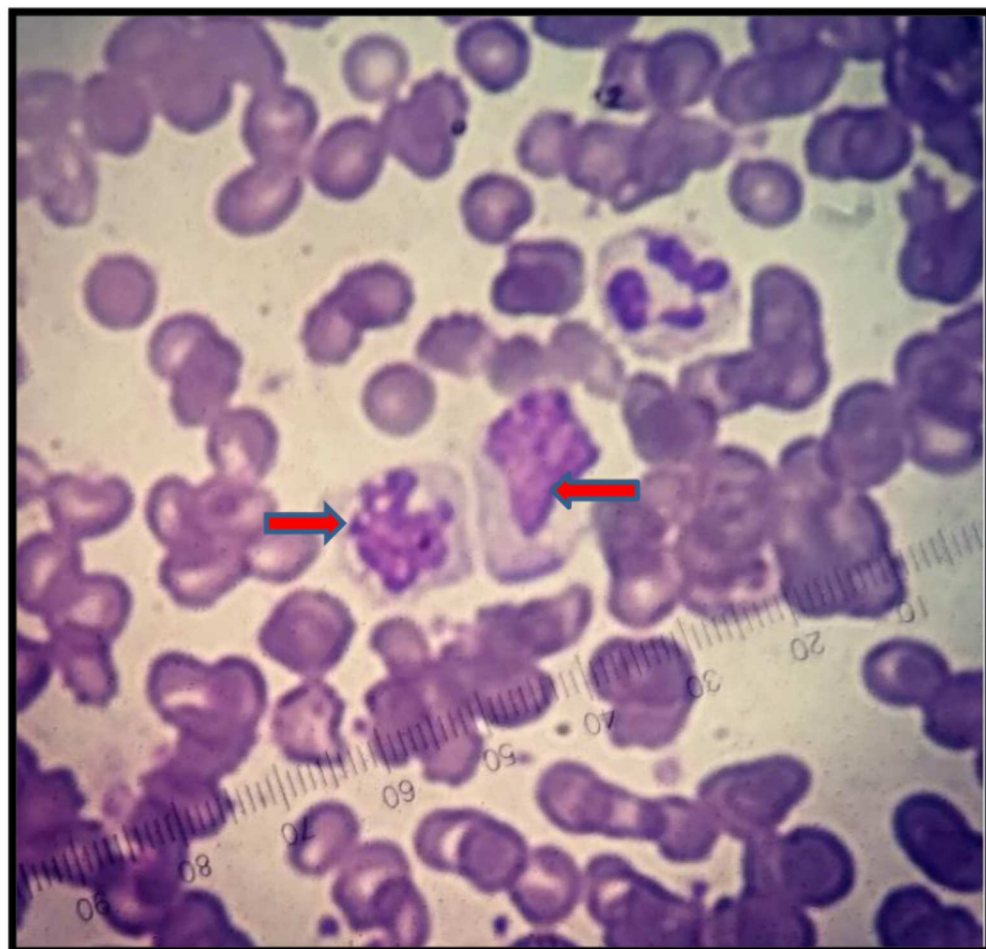


Figura 8: Neutr3f3filo e Mon3f3cito com vacuoliza3f3o citoplasm3f3tica. Setas vermelhas indicam os vac3f3olos citoplasm3f3ticos.

Este trabalho teve intuito de avaliar a confiabilidade nos resultados de an3f3lise exclusivamente morfol3f3gica de caracter3f3sticas de morte celular encontradas em leuc3f3citos visualizadas em MO de campo claro, sendo assim, buscamos a especificidade e sensibilidade dos corantes Hoechst e PI que foram interpretados a fim de oferecer maior confiabilidade a T3f3cnica.

Anteriormente, um estudo com prop3f3sito de padroniza3f3o de m3f3todo para avalia3f3o de novos quimioter3f3picos capazes de provocar a morte celular no protoz3f3rio *Trypanossoma cruzi* a fim de combater a doen3f3a de Chagas em sua fase aguda e cr3f3nica recorreu ao m3f3todo de microscopia de fluoresc3f3ncia automatizado atrav3f3s do HCA como forma de valida3f3o e avalia3f3o do m3f3todo de contagem manual de c3f3lulas plaqueadas sens3f3veis ou n3f3o aos novos f3f3rmacos, pois esta t3f3cnica permite avaliar alto conte3f3do celular com imageamento e atrav3f3s dele uma

excelente aquisição de dados, demonstrando assim eficiente para fim de validação e padronização do método manual por meio de correlação de dados.(FARIA, 2016).

Também já foi descrito que a quantificação de apoptose e necrose em cultivo de células de *Drosophila melanogaster* através de análises de imagens, utilizou o corante PI, pois este tem apresentado vantagens como por exemplo, melhor preservação das células cultivadas em meio de cultura sobre outros corantes ao evidenciar a morte necrótica (SILVA et al., 2007). Já estudos sobre viabilidade celular em células-tronco mesenquimais tratadas com nanopartículas de dióxido de titânio utilizou o *Hoechst* conjugado ao PI, por sua característica de corar o núcleo de células viáveis, devido a sua capacidade de se ligar preferencialmente em sequências ricas em adenina e timina, enquanto o PI cora o núcleo de células mortas. Neste trabalho as imagens fluorescentes também foram adquiridas pelo HCA. (Duarte et al, 2017).

Há relatos que a apoptose espontânea *in vitro* em Leucemia Linfóide Crônica (LLC) descrito por Oliveira (2002) pode indicar que ocorre maior evidência de apoptose em linfócitos B nas fases iniciais da doença, e o mesmo não ocorre nos estágios mais avançados, pois esse processo encontra-se bloqueado, sendo assim o estudo de apoptose pode ser um dado importante para avaliação do estágio da doença ou sua malignidade (SARTOR et al., 2012)

4.3 Análise de Viabilidade Comparativa de Microscopia Óptica x Fluorescência Automatizada em Isolado de Leucócitos.

Esta análise comparou os resultados das amostras submetidas a técnica de isolamento de leucócitos, e analisadas em MO e FA, seus resultados devidamente comparados. A figura 9 que é uma imagem retirada em MO onde pode-se verificar a presença sugestiva de processo de apoptose, devido a presença de cariólise (círculo vermelho), fenômeno de descoloração basofílica do núcleo devido a ação da DNase. (KUMAR et al. 2013)

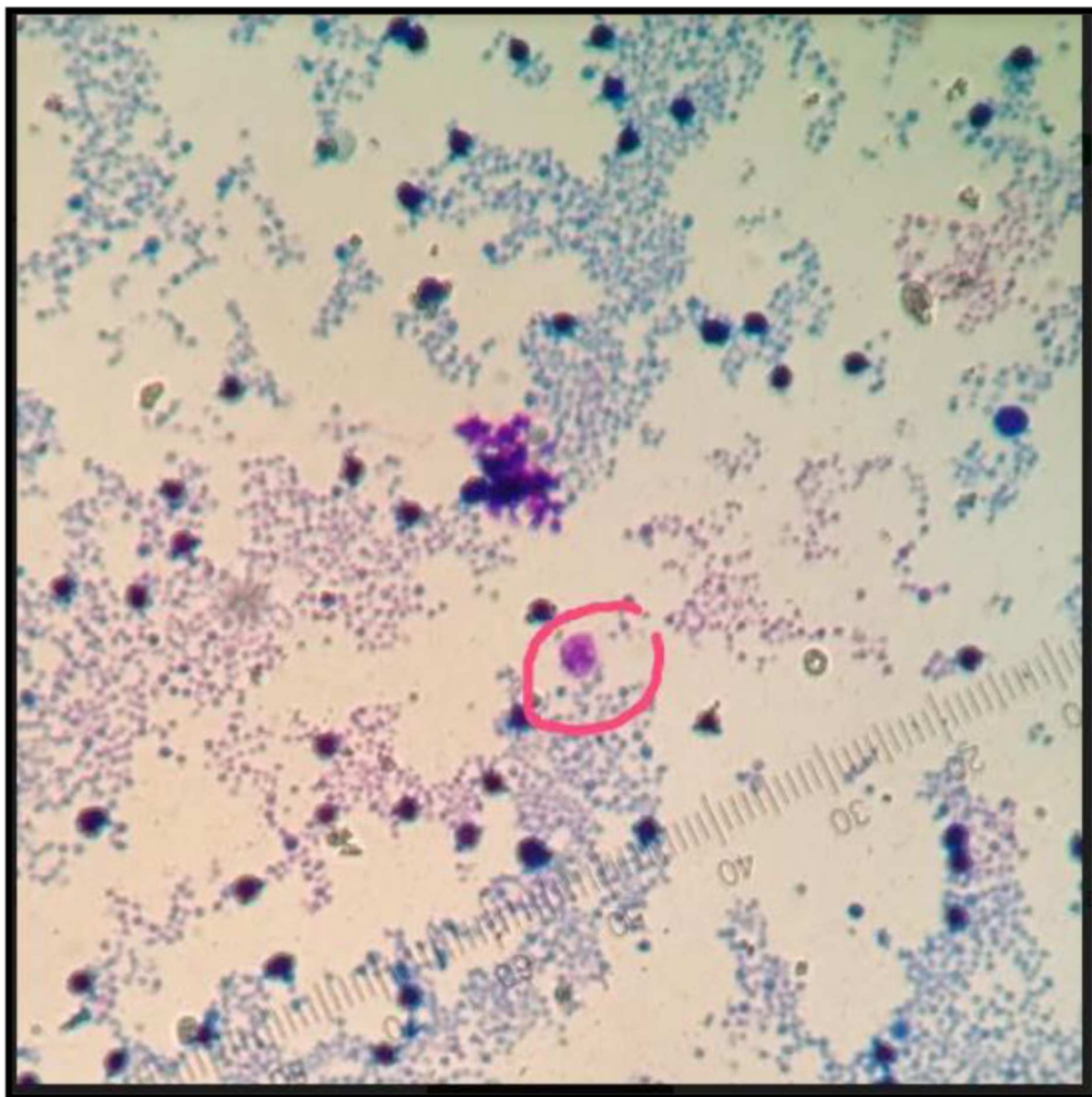


Figura 9: Foto de isolado de leucócitos visualizado em microscopia de campo claro. A célula circundada de rosa sugere a presença de cariólise, processo observado na necrose celular.

A figura 10 exhibe resultados de células com características de morte celular em isolados de leucócitos observados na MO, comparado com resultados de células mortas fornecidas pela FA.

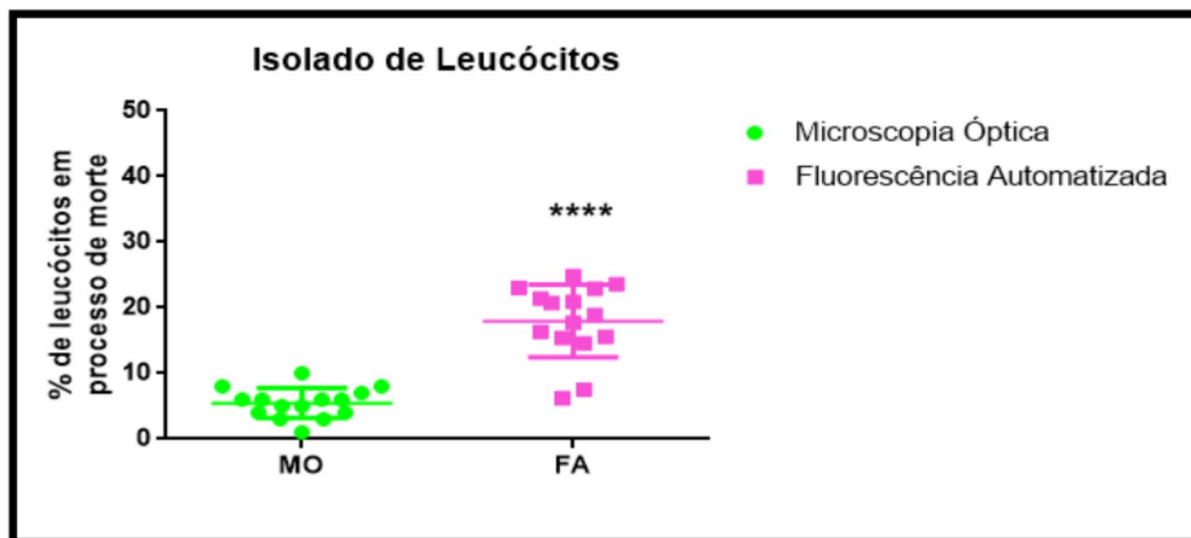


Figura 10: Comparação de número de células mortas analisadas em MO (verde) e analisadas em FA (rosa) somente com material submetido a Técnica de Isolado de Leucócitos.

Estudo feito por Barroso et al. (2008) acredita que a melhor forma de evitar a neutropenia grave é através do uso de fatores de crescimento hematopoiético como opção de profilaxia, e não aborda a identificação de apoptose ou necrose como informação útil preditiva para esse quadro.

4.4 Análise de Viabilidade Comparativa de Sangue Total e Isolado de Leucócitos em Microscopia Óptica.

Nesta análise as amostras foram visualizadas somente na MO, parte dessa amostra foi submetida a Técnica de Coloração Direto e outra parte foi submetida ao Técnica de Isolamento de Leucócitos. Os resultados foram apresentados na figura 11.

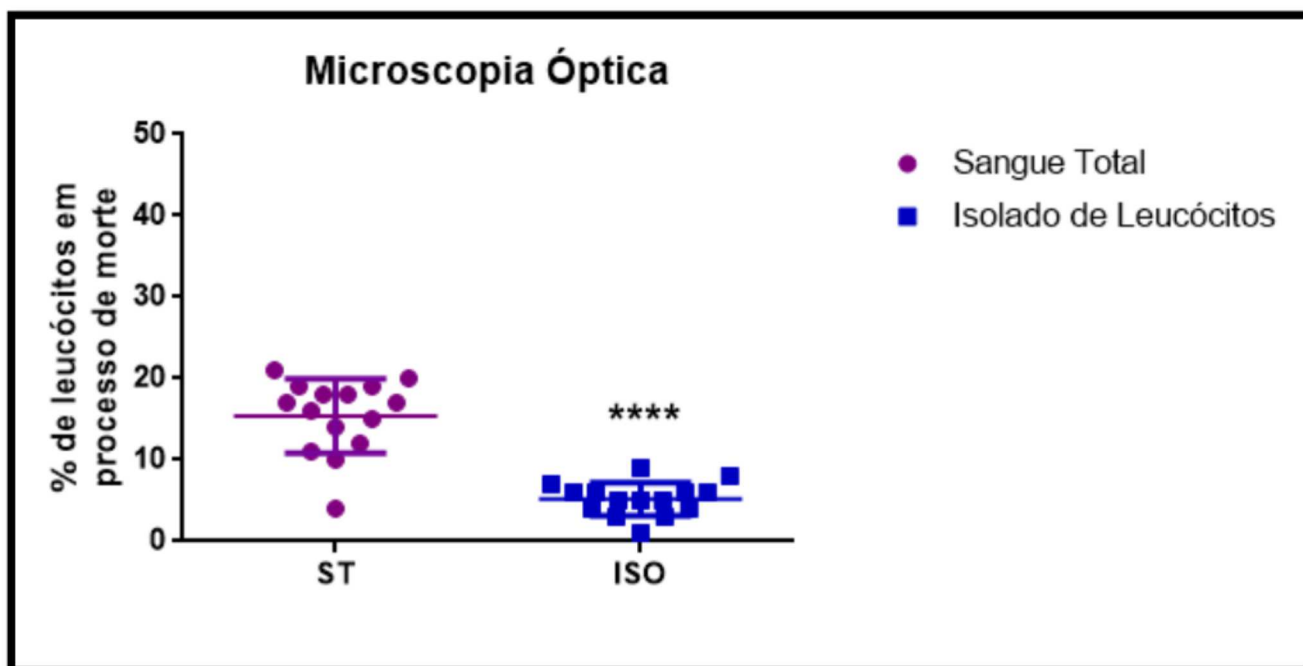


Figura 11 Comparação de células mortas visualizadas somente em MO. Parte do material foi submetido a Técnica de Coloração Direta (roxo) e outra parte foi submetida a Técnica de Isolamento de Leucócitos (azul).

De acordo com estudo de Slifkin e Cumbie (1992), o Histopaque-1,119 junto com Histopaque 1077 são usados para promover o isolamento de leucócitos, baseado-se na centrifugo-separação das células devido a um diferente gradiente de densidade desses líquidos, logo criando camadas diversas de células devido aos seus diferentes pesos moleculares. Somado a isso, o estudo de Anazetti e Melo (2007) sobre um apanhado bibliográfico das características morfológicas e bioquímicas no processo necrótico e apoptótico relata características como: inchaço citoplasmático e mitocondrial, tumefação celular devido ao aumento de Na^+ citosólico (necrose) e retração celular e formação de corpos apoptóticos (apoptose). Esse combinado de informações mais a análise das figuras 10 e 11 sugerem que possivelmente tais células podem (já que possivelmente estão com sua estrutura comprometida devido ao processo de morte celular) apresentar prejuízo morfológico após a ação de força física promovida pela centrifugação.

Diante das análises observadas, evidenciou-se que a técnica de coloração direta foi o método que apresentou resultados mais aproximados a técnica confirmatória, indicando que as características sugeridas de morte leucocitária

observadas na microscopia óptica realmente são compatíveis e confiáveis e que esta técnica conseguiu preservar melhor a morfologia das células em estudo, quando comparada a técnica de isolamento de leucócitos. A partir dessa informação, foi criado um POP (apêndice A) da técnica de escolha explicitando passo a passo do método e quais características celulares devem ser investigadas.

5. CONCLUSÃO

O isolamento e concentração dos leucócitos por gradiente de densidade foi executado de forma satisfatória.

As características morfológicas compatíveis com as que ocorrem em processo de apoptose e necrose celular em leucócitos no sangue periférico dos pacientes quimiotratados foram analisadas de maneira satisfatória pelas duas técnicas avaliadas, a coloração direta e a concentração/isolamento de leucócitos.

A técnica de isolamento de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares mostrou-se satisfatória em possibilitar a concentração e isolamento destas células a partir de amostras de sangue total, de modo que pudessem ser visualizadas em maior número por campo quando analisadas em microscopia óptica de campo claro. Porém, esta técnica ao ser submetida à microscopia óptica de campo claro para a análise e avaliação de características de morte celular, revelou resultados insatisfatórios quando estes foram comparados ao método de fluorescência automatizada, demonstrando não ser a melhor técnica a ser implementada no Hospital Federal de Bonsucesso para estudo de morte de leucócitos em pacientes quimiotratados.

Foi criado um Procedimento Operacional Padrão para realização da pesquisa de morte de leucócitos em pacientes quimiotratados do HFB.

6. EXPECTATIVAS FUTURAS

Esperamos que o POP criado neste trabalho possa ser implementado no laboratório de análises clínicas do HFB para que a partir dele os profissionais envolvidos na análise, sejam treinados e capacitados para avaliar e discutir os resultados. E assim, ajudar a equipe médica a identificar um possível paciente com neutropenia grave.

Além disso, pretendemos continuar o estudo, realizando uma avaliação contínua e prolongada dos pacientes que forem detectados com alterações expressivas de morte leucocitária, para confirmação se os mesmos irão evoluir para o quadro de neutropenia grave, contribuindo assim com um diagnóstico precoce e eficaz para esses pacientes.

7. REFERÊNCIAS

AÇÕES DE ENFERMAGEM PARA O CONTROLE DO CÂNCER: uma proposta de integração ensino-serviço.. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer (inca) . Rio de Janeiro: Coordenação de Ensino e Divulgação Científica (cedc), 2010.

COLETA DE SANGUE VENOSO: Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica e medicina laboratorial. São Paulo: Manole Ltda, 2010.

AL-ALI, Ruslan Ibrahim. **Analysis of Autophagy in Lung Cancer.** 2016. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade de Salamanca, [s.i], 2016.

ALMEIDA, Vera Lúcia de; LEITÃO, Andrei; LOPES, Míriam Teresa Paz. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 28, n. 1, p.118-129, 9 set. 2004.

ÁLVAREZ, Antonia; LACALLE, Jaione; ÁLVAREZ, Francisco José. Cell death. A comprehensive approximation. Necrosis. **Microscopy: Science, Technology, Applications And Education.** [s.i.], p. 1017-1024. out. 2010.

ALVES, Maria Júlia Manso. **Isolamento e purificação de glicoproteínas de Trypanosoma cruzi.** 1994. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

BARROSO, Sérgio; DAMASCENO, Margarida; DINIZ, José. Orientações para prevenção da neutropenia febril. **Acta Médica Portuguesa**, Coimbra, v. 21, n. 1, p.7-20, fev. 2008.

BOXER, Laurence; DALE, David C.. Neutropenia: Causes and consequences. **Seminars In Hematology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.75-81, abr. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/shem.2002.31911>.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer - Inca. Ministério da Saúde. **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 05 jan. 2018.

BRUCE, Chabner A. et al. **BASES FARMACOLÓGICAS DA TERAPÊUTICA DE GOODMAN E GILMAN**. 12. ed. São Paulo: Mcgraw-hill Brasil Extra, 2012

BUCEVICUS, Jonas; LUKINAVIČIUS, Gražvydas; GERASIMAITIS, Rta. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. **Chemosensors**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.18-24, 18 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/chemosensors6020018>.

CAMPOS, Antonio Hugo Jose Froes Marques et al. The Value of a Tumor Bank in the Development of Cancer Research in Brazil: 13 Years of Experience at the A C Camargo Hospital. **Biopreservation And Biobanking**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.168-173, abr. 2012. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/bio.2011.0032>

CARVALHO, Amanda Torrentes de; RIBEIRO, Grazielle Alves; NOGUEIRA, Raquel Ferraz. **Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. Disponível em: http://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2010.pdf. Acesso em: 06 set. 2019.

CHIELA, Eduardo Cremonese Filippi. **Papel da Autofagia na Senescência Celular**. 2014. 196 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DANTAS, Élide Livia Rafael et al. Genética do Câncer Hereditário. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Juazeiro do Norte, v. 55, n. 3, p.263-269, maio 2009.

DELOU, João M.a.; BIASOLI, Deborah; BORGES, Helena L.. The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.2257-2275, dez. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620160127>.

DUARTE, Cristiane A. et al. Análise do Ensaio de Viabilidade Celular Utilizando Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (IP) após o tratamento das Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano com Nanopartículas de Dióxido de Titânio. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE BIOMATERIAIS, ORGÃOS ARTIFICIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS - SLABO, 14., 2017, Maresias. **Proceedings...** [s.l.]: Slabo, 2017. p. 669 - 675. Disponível em: <http://www.metallum.com.br/obi2017/anais/PDF/02-230.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2019.

EDINGER, Aimee L; THOMPSON, Craig B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion In Cell Biology**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.663-669, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>.

FARIA, Thayane Rita Borges de. **QUIMIOTERAPIA CONTRA DOENÇA DE CHAGAS: PROPOSIÇÃO DE MODELO NÃO PATOGÊNICO, TESTE DE NOVOS COMPOSTOS, OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE NOVA METODOLOGIA**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias, 2016.

Disponível em:
http://repositorio.bom.org.br:8080/jspui/bitstream/205001876/1029/1/2016_FARIA.pdf
 >. Acesso em: 25 nov. 2019.

FESTJENS, Nele; BERGHE, Tom Vanden; VANDENABEELE, Peter. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1757, n. 9-10, p.1371-1387, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014>.

FREITAS, Marisa et al. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 7-8, p.570-575, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.12.021>.

GASQUES, Luciano Seraphim et al. INDEPENDÊNCIA OU MORTE: A APOPTOSE COMO MECANISMO DE DEFESA. **Arquivos de Ciência da Saúde da Unipar**. Umuarama, p. 49-53. jun. 2013.

GELESSON, Débora Duarte et al. SIGNIFICADO DA NEUTROPENIA E NECESSIDADES DE CUIDADO EM DOMICÍLIO PARA OS CUIDADORES DE CRIANÇAS COM CÂNCER. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, [s.i.], v. 17, n. 6, p.21-30, dez. 2009.

GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; ROCHA, Adriana Brondani da. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Canoas, v. 53, n. 3, p.335-343, 25 jan. 2007.

GROTTO, Helena Z. W.. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.178-182, 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842009005000045>.

Instituto Nacional do Câncer - INCA (Org.). **Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 05 jan. 2018.

KIMMELMAN, Alec C.; WHITE, Eileen. Autophagy and Tumor Metabolism. **Cell Metabolism**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1037-1043, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>.

Knox, J.J., Chen, X.E., Feld, R. *et al.* A phase I-II study of oblimersen sodium (G3139, Genasense) in combination with doxorubicin in advanced hepatocellular carcinoma (NCI # 5798). *Invest New Drugs* **26**, 193-194 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9104-1>

KUMAR, Vinay. Respostas celulares ao Estresse e às Agressões Tóxicas: Adaptação, Lesão e Morte. In: KUMAR, Vinay. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2016. Cap. 2. p. 31-48.

LEOPOLDINO, Denise de Deus et al. Aspectos técnicos da ressonância magnética de mama com meio de contraste: revisão da literatura. **Radiologia Brasileira**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.287-294, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842005000400011>.

LIMA, Marina Camerini; PEREIRA, Guilherme Rosa. NEUTROPENIA FEBRIL: REVISÃO DA LITERATURA EM PACIENTES ONCOLÓGICOS. **Reinpec**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.116-123, 20 jun. 2017. Faculdade Redentor. <http://dx.doi.org/10.20951/2446-6778/v3n1a9>.

LIU, Emma y; RYAN, Kevin M.. Autophagy and cancer – issues we need to digest. **Journal Of Cell Science**. [s.i.], p. 2349-2358. jun. 2012. Disponível em: <<https://jcs.biologists.org/content/joces/125/10/2349.full.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2019.

Ministério da Saúde. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2017.

NASSER, Moustafa Abdel. Effect of Dermatophytes on Neutrophils and Monocytes Chemotaxis. **Moj Immunology**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.3-15, 13 maio 2016. MedCrave Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.15406/moji.2016.03.00089>.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. ed. New York: Artmed, 2013.

NEWBURGER, Peter E.; DALE, David C.. Evaluation and Management of Patients With Isolated Neutropenia. **Seminars In Hematology**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.198-206, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.06.010>.

OLIVEIRA, Gislaine Borba. **Estudo da apoptose espontanea na leucemia linfoide cronica (LLC) e suas relações com os parametros clínicos e citocinéticos**. 2002. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

OLIVEIRA, Raimundo Antônio Gomes de et al. **Hemograma: Como fazer e interpretar**. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.

PAVONI, J.f. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.2-11, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-11172014000400018>.

PIO, Leila Aparecida Salles. **CITOMETRIA DE FLUXO EM BANANEIRA: DOSES E TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO IODETO DE PROPÍDEO**. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/72889867-Citometria-de-fluxo-em-bananeira-doses-e-tempo-de-exposicao-ao-iodeto-de-propideo.html>>. Acesso em: 06 set. 2019.

PROVENZANO, José Claudio. **METAPROTEOMA DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS**. 2013. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

RAMÍREZ-SAGREDO, Andrea et al. Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. **Revista Chilena de Cardiología**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.228-241, 2016. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT). <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-85602016000300004>.

RICCARDI, Carlo; NICOLETTI, Ildo. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature: Protocols**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.1458-1461, nov. 2011.

SARTOR, Oliver et al. Serum Glutamate Levels Correlate with Gleason Score and Glutamate Blockade Decreases Proliferation, Migration, and Invasion and Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **Clinical Cancer Research**, Boston, v. 18, n. 21, p.5831-5888, ago. 2012.

SASAKI, Kazuhito et al. Resistance of colon cancer to 5-fluorouracil may be overcome by combination with chloroquine, an in vivo study. **Anti-cancer Drugs**, [s.i.], v. 23, n. 7, p.675-682, ago. 2012.

SCHULZE, Marília Martins. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, [s.i.], v. 4, n. 12, p.17-23, ! 2007.

SHEN, Fang et al. Apoptotic Caspases Regulate Induction of iPSCs from Human Fibroblasts. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.508-520, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.09.003>

SIEMSEN, Daniel W. et al. Isolation of Neutrophils from Nonhuman Species. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.43-59, 15 nov. 2019. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-0154-9_4.

SILVA, Bruna Gabriel. **Quantificação de apoptose e necrose mediante a corantes fluorescente e análise de imagens no cultivo**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/3981/1471.pdf?sequence=1&isAll owed=y>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

SILVA, Laiane Crisley Barbosa da. **Nano Partículas de Ouro: Aplicações no Diagnóstico e Tratamento do Câncer**. 2015. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

SILVA, Paulo Henrique da et al. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SUI, X et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 4, n. 10, p.838-849, out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.350>.

VALE, Alessandra Mendes Pacheco Guerra. **Técnica para Segmentação Automática de Imagens Microscópicas de Componentes Sanguíneos**: Classificação Diferencial de Leucócitos Baseada na Lógica Fuzzy. 2014. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

VALENTE, Susana Catarina Monteiro. **Marcação da Anexina V para imagem funcional da apoptose celular**. 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011. Disponível em: <https://run.unl.pt/bitstream/10362/6586/1/Valente_2011.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2017.

VALEUR, Bernad. **MOLECULAR FLUORESCENCE: Principles and Applications**. [s.i]: Wiley-vch, 2005.

VASCONCELOS, Bruna de Oliveira. **Apoptose em placetônicos bovinos de gestações de conceitos naturais e transgênicos clonados**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2016.

VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal Of Immunological Methods**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.39-51, jul. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i).

VOGLER, Meike. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. **Advances In Medicine**, [s.l.], v. 2014, p.1-14, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/943648>

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO : MÉTODO DIRETO

APÊNDICE A - POP		
POP – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
OPERADOR: _____		
+		
POP Nº 001	USO DA TÉCNICA EM PESQUISA DE MORTE LEUCOCITÁRIA – MÉTODO DIRETO	
OBJETIVO:	PESQUISAR LEUCÓCITOS COM CARACTERÍSTICAS DE MORTE CELULAR	
Campo de Aplicação: LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS		
PROCEDIMENTOS:		
<ol style="list-style-type: none"> 1. PREPARAR ESFREGAÇO SANGÜÍNEO COM UMA GOTAS DE SANGUE TOTAL 2. COBRIR O ESFREGAÇO COM 20 GOTAS DO CORANTE WRIGHT 3. AGUARDAR DE 5 A 7 MINUTOS 4. EM SEGUIDA, ADICIONAR 20 GOTAS DE ÁGUA. 5. HOMOGENEIZAR A MISTURA CORANTE E ÁGUA 6. AGUARDAR DE 3 A 5 MINUTOS. 7. LAVAR A LÂMINA EM ÁGUA CORRENTE 8. DEIXAR SECAR A LÂMINA EM POSIÇÃO VERTICAL. 9. VISUALIZAR O EM MICROSCÓPIO ÓTICO DE CAMPO CLARO, EM LENTES OBJETIVAS DE AUMENTO DE 100X EM ÓLEO DE IMERSÃO. 10. CONTAR 200 LEUCÓCITOS E QUANTIFICAR AS CÉLULAS COM CARACTERÍSTICAS DE MORTE CELULAR: VACÚLOS CITOPLASMÁTICOS, PRESENÇA DE NÚCLEO PICNÓTICO, PRESENÇA DE CARIÓLISE E PRESENÇA DE CÉLULAS "ESTOURADAS". 11. LIBERAR O RESULTADO EM VALORES PERCENTUAIS 		
Elaborado por:	Autorizado por:	Datar:
_____	_____	_____
<small>Rua: Endereço – completo no rodapé com contato</small>		

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do projeto de pesquisa: Padronização de Estudo de Morte de Leucócitos por Microscopia Óptica em pacientes Quimiotratados.

Prezado(a); Senhor(a) está sendo convidada a participar de uma pesquisa sobre a utilização de uma técnica que consiste em isolar os leucócitos a fim de verificar se a mesma é eficaz para estudo de morte celular nos glóbulos brancos de pacientes que estão submetidos a tratamentos com quimioterápicos do Hospital Federal de Bonsucesso. Os pesquisadores Allan Martins, Isalira Ramos e Karina Duarte pretendem realizar um estudo com as seguintes características:

Objetivo do estudo: Padronizar o uso do método direto a fim de otimizar a pesquisa de leucócitos em processo de morte celular em pacientes do Hospital Federal de Bonsucesso/RJ que estejam submetidos a tratamento com quimioterápicos.

Descrição dos procedimentos para coleta de dados: a coleta de sangue será feita pelo profissional de enfermagem com a finalidade de realizar o exame de hemograma completo, exame solicitado na pré-quimioterapia. Este material será encaminhado para laboratório e utilizado para estudo somente após a conclusão do exame solicitado. Em seguida realiza-se a técnica de isolamento de leucócitos na amostra verificando o resultado em microscopia, após a avaliação o material será descartado conforme as regras de biossegurança exigida pelo Ministério da Saúde.

Riscos: os riscos são os mesmo que ocorrem quando se tem uma coleta de sangue, tais quais: ansiedade, medo, tonteira, dor local ou surgimento de hematoma, mas vale ressaltar que não será feito coletas extras com finalidade exclusiva para pesquisa, o material usado sempre será aquele que previamente foi utilizado para análise do

hemograma completo. Ainda assim, pode-se recusar a utilização da sua amostra para outros fins que não para análise do exame solicitado que sua decisão será integralmente respeitada.

Benefícios às participantes e para a sociedade: o estudo de morte celular em leucócitos em pacientes que realizam quimioterapia pode sinalizar ao médico, com antecipação, que o paciente poderá entrar em um quadro de neutropenia grave. Esse quadro consiste em uma queda significativa das principais células de defesa do organismo, quando ocorre é necessário interromper ou alterar o tratamento, deixando o paciente mais susceptível.

O intuito desse estudo é verificar se a técnica proposta é eficaz para investigação na morte de leucócitos, sendo esta satisfatória, sugerir estudos posteriores para correlacionar os resultados obtidos com a técnica com o quadro de neutropenia grave, a fim de possibilitar uma intercorrência médica antecipada e decisiva em prol a melhor resposta terapêutica.

Garantia de acesso aos pesquisadores: Em qualquer fase do estudo você terá pleno acesso ao pesquisador responsável pelo estudo, Karina Duarte, de terça a sexta no Hospital Federal de Bonsucesso, situado na Av. Londres, 616, Prédio 5 - 2º andar, Rio de Janeiro, RJ, ou pelo telefone 3977-9857. Havendo necessidade, será possível, ainda, entrar em contato com o Comitê de Ética do Hospital Federal de Bonsucesso, ou pelo telefone 3977-9833, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou através do e-mail: cepghbrj@gmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão que controla as questões éticas das pesquisas na instituição (HFB) e tem como uma das principais funções proteger os participantes da pesquisa de qualquer problema.

Garantia de liberdade: a sua participação neste estudo é absolutamente voluntária. Dentro deste raciocínio, todos os participantes estão integralmente livres para, a qualquer momento, negar o consentimento ou desistir de participar e retirar o consentimento, sem que isto provoque qualquer tipo de penalização. Lembramos, assim, que sua recusa não trará nenhum prejuízo à relação com o pesquisador ou com a instituição e sua participação não é obrigatória.Direito de confidencialidade e acessibilidade: os dados colhidos na presente investigação serão utilizados para

elaborar artigos científicos. Porém, todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o absoluto sigilo de sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do participante e ninguém, com exceção dos próprios pesquisadores, poderá ter acesso aos resultados da pesquisa. Por outro lado, você poderá ter acesso aos seus próprios resultados a qualquer momento, durante ou após o término da pesquisa.

Despesas e compensações: você não terá, em momento algum, despesas financeiras pessoais. As despesas, assim, se porventura ocorrerem, serão de responsabilidade dos próprios pesquisadores. Também, não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Em caso de dúvidas ou questionamentos, você pode se manifestar agora ou em qualquer momento do estudo para explicações adicionais.

Consentimento Li e concordo em participar da pesquisa Eu receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Rio de Janeiro,

Nome do participante _____

Data: ___ / ___ / _____

Assinatura do participante _____

Nome do pesquisador _____

Data: ___ / ___ / ___

Assinatura do pesquisador _____

|

APÊNDICE C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



HOSPITAL FEDERAL DE
BONSUCESSO - RJ

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Utilização da técnica de isolamento de leucócitos para estudo de morte celular em pacientes oncológicos.

Pesquisador: Karina de Araujo Duarte

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26073319.6.0000.5253

Instituição Proponente: Hospital Federal de Bonsucesso - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.789.652



HOSPITAL FEDERAL DE
BONSUCESSO - RJ



Continuação do Parecer: 3.789.652

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação, o CEP-HFB considerou o projeto aprovado.

Solicitamos que, ao término da pesquisa, seja encaminhada a esta Comissão uma cópia do Relatório Final.

"Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final" (Item XI.2.d da Resolução 466/12)

|

