

Efecto del tratamiento con hidroxiurea sobre la actividad oxidativa de neutrófilos de la leucemia mieloide crónica

Cecilia Rodríguez*, Beatriz Nuñez*, Mirtha Depiante-Depaoli**, Miguel A. Orsilles**

* Laboratorio de Oncohematología, Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba.

** Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.



ARTICULO
ESPECIAL

HEMATOLOGIA, Vol. 2 N° 2: 58-62
Mayo - Agosto

INTRODUCCION

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) se caracteriza por un aumento absoluto de neutrófilos aparentemente maduros en sangre periférica. La clonalidad de este proceso mieloproliferativo, junto a la actividad de fosfatasa alcalina granulocítica disminuida, sugieren que los neutrófilos pueden ser funcionalmente anormales. Estudios previos han informado alteraciones funcionales y bioquímicas, tales como un tiempo de circulación intravascular prolongado (1), adhesividad subnormal (2), migración al azar y quimiotaxis disminuidas (3), actividad fagocítica y lítica disminuidas (4), defectos del metabolismo oxidativo (3,5-7) y un contenido anormal de componentes granulares (8,9). Sin embargo, el efecto de las drogas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad sobre la actividad funcional de los neutrófilos ha sido poco evaluado.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del tratamiento con hidroxiurea sobre la actividad oxidativa de los neutrófilos de pacientes con LMC, para lo cual se evaluó la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes y controles: Los pacientes incluidos en este estudio fueron atendidos en el Departamento de Oncohematología del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. Fueron estudiados 14 pacientes en la primera fase crónica de la enfermedad (7 mujeres y 7 varones; edad media: 54 años) cuyo diagnóstico fue realizado por:

a) examen citológico de sangre periférica y médula ósea, b) actividad de fosfatasa alcalina granulocítica y c) estudios moleculares (rearrreglo genético bcr/abl). Seis pacientes fueron estudiados en el momento del diagnóstico y luego de iniciado el tratamiento con hidroxiurea. Ocho pacientes estuvieron tratados con hidroxiurea durante un período previo de 15 meses (rango: 9 a 21 meses) y mantuvieron este tratamiento durante todo el período de estudio. La dosis de hidroxiurea fue de 500 a 2000 mg diarios según el nivel de leucocitos. Los pacientes no presentaron procesos infecciosos asociados y permanecieron en la fase crónica de la enfermedad durante el tiempo de las evaluaciones.

Como grupo control se incluyeron 12 individuos hematológicamente sanos con edades comprendidas entre 20 y 40 años.

Hemogramas: Fueron realizados en un contador hematológico Coulter T 660 y por el examen microscópico de sangre periférica mediante coloración con May-Grünwald-Giemsa.

Fosfatasa Alcalina granulocítica (FAG): La actividad de FAG fue determinada en extendidos de sangre periférica de acuerdo al método citoquímico de Kaplow (10).

Estudios Moleculares: La detección del rearrreglo bcr/abl fue realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (11).

Obtención de neutrófilos: Los neutrófilos fueron separados a partir de sangre periférica heparinizada

utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque y posterior sedimentación con Dextrán (12). La pureza de los neutrófilos fue mayor al 95 % y la viabilidad celular mayor al 97 %. Los neutrófilos purificados fueron suspendidos en solución salina balanceada de Hanks sin rojo fenol. La producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno fue evaluada durante un período medio de 9 meses (rango:7 a 12 meses) con estudios periódicos cada 3 meses (rango:1 a 4 meses).

Producción de anión superóxido: Fue evaluada por la técnica de reducción del citocromo c (13) por el anión superóxido e inhibida por la enzima superóxido dismutasa, en condiciones basales y luego de la estimulación celular con forbol miristato acetato (PMA).

Producción de peróxido de hidrógeno: Fue determinada en condiciones basales y estimuladas por la técnica basada en la oxidación del rojo fenol mediada por el peróxido de hidrógeno y dependiente de la peroxidasa (13).

Análisis estadístico: Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de los términos medios (ESM). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test *t* de Student y una probabilidad < 0,05 fue considerada estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Características hematológicas

La Tabla I muestra las principales características hematológicas de los pacientes con LMC sin tratamiento y los pacientes con tratamiento previo en el momento de iniciar los estudios. Los pacientes sin tratamiento presentaron cifras significativamente mayores ($p < 0,05$) de leucocitos y neutrófilos con relación a los pacientes con tratamiento quimioterápico previo. El aumento de neutrófilos en los pacientes no tratados fue debido al aumento del número de leucocitos y no al aumento del valor porcentual de estas células.

Tabla I. Datos hematológicos en pacientes con LMC sin tratamiento (ST) y con tratamiento (CT)

Parámetros hematológicos	Grupo Pacientes	
	ST (n=6)	CT (n=8)
Hematocrito (L/L)	0,42 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02
Hemoglobina (g/dL)	12,7 \pm 0,5	12,7 \pm 0,9
Leucocitos ($\times 10^9/l$)	57,1 \pm 18,2*	22,3 \pm 7,1
Neutrófilos ($\times 10^9/l$)	36,5 \pm 10,6*	12,8 \pm 4,1
Basófilos ($\times 10^9/l$)	1,5 \pm 0,5	1,8 \pm 1,1
Blastos ($\times 10^9/l$)	0,9 \pm 0,5	0,2 \pm 0,1
Plaquetas ($\times 10^9/l$)	498,2 \pm 95,1	809,3 \pm 248,1

Valores expresados como media \pm ESM

* $p < 0,05$ con respecto a pacientes CT

La actividad de FAG evidenció una disminución significativa en todos los pacientes con LMC con relación al grupo control (4 ± 2 vs 71 ± 11 , $p < 0,05$).

Cuando se comparó la actividad de FAG en los pacientes con tratamiento previo y los pacientes sin tratamiento, se observó un leve incremento en los pacientes tratados (4 ± 1) con relación a los pacientes no tratados (2 ± 1). El rearrreglo genético *bcr/abl* fue detectado en todos los pacientes.

Producción de anión superóxido

En condiciones basales, la producción de anión superóxido por neutrófilos de los pacientes sin tratamiento fue significativamente menor ($p < 0,05$) cuando se la comparó con los valores obtenidos en los controles. En los pacientes con tratamiento previo los valores fueron similares a los controles. Cuando los neutrófilos fueron estimulados con PMA, hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en los pacientes sin tratamiento respecto a los controles y pacientes con tratamiento previo (Tabla II).

Producción de peróxido de hidrógeno

En condiciones basales, la producción de peróxido de hidrógeno por neutrófilos de los pacientes no tratados y pacientes con tratamiento previo fue menor a los controles, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística. Sin embargo, luego de la estimulación celular, la producción de peróxido de hidrógeno fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los pacientes con tratamiento previo con relación a los pacientes sin tratamiento y controles (Tabla II).

La producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno no presentó correlación con las cifras de leucocitos ni con los valores porcentuales y absolutos de neutrófilos, tanto en los pacientes sin tratamiento como en los pacientes con tratamiento previo.

Estudio cinético

En los pacientes no tratados, la actividad oxidativa de los neutrófilos fue evaluada luego de iniciado el tratamiento con hidroxiurea durante un período de 9

Tabla II. Producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por neutrófilos de controles, pacientes con LMC sin tratamiento (ST) y con tratamiento (CT) previo.

Grupos	Anión Superóxido ^(a)		Peróxido de Hidrógeno ^(b)	
	- PMA	+ PMA	- PMA	+ PMA
Controles	160 \pm 40	896 \pm 95	3,8 \pm 1,5	6,1 \pm 1,4
LMC-ST	68 \pm 38*	577 \pm 80*†	1,8 \pm 1,5	5,5 \pm 1,3†
LMC-CT	126 \pm 45	903 \pm 31	2,2 \pm 1,2	8,8 \pm 1,7*

(a) nmoles/ 10^6 cél./min.

(b) umoles/ 10^6 cél.

* $p < 0,05$ con respecto a controles

† $p < 0,05$ con respecto a pacientes CT

meses término medio. Para ello, fue seleccionada la determinación de anión superóxido. Esta evaluación fue realizada, además, en los pacientes con tratamiento previo durante un período similar.

En los pacientes no tratados, hubo un incremento en la producción de anión superóxido, tanto en condiciones basales como estimuladas, a los 3 meses término medio de iniciado el tratamiento y que se mantuvo durante todo el período de evaluación (Tabla III). En los pacientes con tratamiento previo, la producción de anión superóxido se mantuvo aumentada y con valores promedios similares a los alcanzados al término del período de evaluación en los pacientes que iniciaron tratamiento.

Tabla III. Producción de anión superóxido por neutrófilos de pacientes con LMC antes y después del tratamiento con hidroxiurea.

Tiempo (meses)	Basal	Post estimulación con PMA
0	68 ± 38	577 ± 80
3	83 ± 20	710 ± 30*
6	120 ± 10*	790 ± 30*
9	140 ± 20*	960 ± 20*

Valores expresados como media ± ESM

* p < 0,05 respecto a valores pre-tratamiento

DISCUSION

Numerosos trabajos que han evaluado la actividad funcional de los neutrófilos de pacientes con LMC son difíciles de interpretar debido al estudio de pacientes en distintos estadios de la enfermedad y a la evaluación conjunta de pacientes tratados y no tratados. En el presente estudio fueron considerados estos aspectos y la actividad oxidativa de los neutrófilos fue evaluada en pacientes en la primera fase crónica de la enfermedad no tratados, con relación a pacientes tratados previamente con hidroxiurea. Además, el efecto del tratamiento con hidroxiurea fue evaluado en los pacientes sin tratamiento previo durante un período de 9 meses luego de iniciada la terapia.

Los resultados de este estudio indican un defecto en la actividad oxidativa de neutrófilos de los pacientes con LMC no tratados. Esta conclusión surge al considerar la producción subnormal de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. La producción de anión superóxido evidenció una disminución significativa respecto a controles, tanto en condiciones basales como estimuladas, mientras que la producción de peróxido de hidrógeno fue deficiente en condiciones basales pero conservada luego de la estimulación celular.

El defecto en la actividad oxidativa de los neutrófilos de la LMC observado en este estudio podría ser consecuencia de una alteración en todas las células

del clon leucémico o defectos metabólicos parciales. En células fagocíticas, los intermediarios reactivos del oxígeno son producidos a través de la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática (14). Esta enzima cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular con generación de anión superóxido y su posterior dismutación a peróxido de hidrógeno (15). Por lo tanto, la menor producción de estos metabolitos tóxicos del oxígeno por neutrófilos de pacientes con LMC no tratados, podría reflejar una actividad enzimática disminuida como consecuencia de la maduración incompleta que caracteriza a estas células (16). A este respecto, se ha determinado que las actividades de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzimas pertenecientes al shunt de la hexosa monofosfato, manifiestan una disminución del 40 % en neutrófilos de la LMC respecto a neutrófilos normales (17). Por otro lado, en la leucemia granulocítica crónica se ha observado que la producción de anión superóxido es deficiente luego de la estimulación con PMA, mientras que en respuesta a péptidos quimiotácticos es normal (18). Sin embargo, en la Policitemia Vera se ha demostrado una disminución en la producción intracelular de peróxido de hidrógeno y la liberación extracelular de anión superóxido por neutrófilos estimulados con péptidos quimiotácticos, pero normal luego de la estimulación con PMA (19). Estos hallazgos sugieren defectos metabólicos parciales asociados a los distintos síndromes mieloproliferativos crónicos y dependientes de los estímulos utilizados para inducir el estallido respiratorio.

Con el objeto de determinar cambios en el metabolismo oxidativo de los neutrófilos de pacientes tratados con hidroxiurea, evaluamos la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en pacientes con tratamiento previo. La producción de estos metabolitos tóxicos del oxígeno evidenció un aumento en células estimuladas con PMA respecto a los pacientes sin tratamiento. Esta mayor actividad oxidativa podría ser consecuencia de la aparición de células con una mayor capacidad funcional por efecto de la medicación sobre la maduración de células del clon leucémico o por aumento de las células provenientes de clones normales. A este respecto, en leucemias agudas se ha informado la presencia de una subpoblación de neutrófilos con mayor capacidad para producir peróxido de hidrógeno luego del tratamiento quimioterápico (20). De igual modo, la mayor actividad oxidativa de neutrófilos de la LMC luego del tratamiento con hidroxiurea podría reflejar la aparición de poblaciones de neutrófilos con una mayor respuesta oxidativa.

En los pacientes que iniciaron el tratamiento con hidroxiurea se observó un incremento en la producción de metabolitos tóxicos del oxígeno que alcanzó valores similares a los observados en los pacientes tratados previamente. En trabajos previos (21) se determinó una

normalización de la actividad oxidativa de los neutrófilos en pacientes con LMC luego de iniciado el tratamiento con busulfan. Sin embargo, actualmente existen otras modalidades terapéuticas para el tratamiento de la LMC. En nuestro estudio todos los pacientes fueron tratados con hidroxurea y por lo tanto, nuestros resultados indican que este agente quimioterápico, al igual que el busulfan, produce una normalización de la función oxidativa de los neutrófilos. Una respuesta similar se ha informado en pacientes con distintos procesos neoplásicos tratados con doxorubicina, vincristina, bleomicina, 5-fluorouracilo, mitomicina y dactinomicina (22).

Podemos concluir de nuestro estudio que los neutrófilos de pacientes con LMC no tratados manifiestan una actividad oxidativa disminuida, similar a lo publicado por otros autores (3,5-7). Sin embargo, esta actividad evidencia una normalización luego del tratamiento con hidroxurea. Finalmente, según nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que evalúa el efecto del tratamiento con hidroxurea sobre la actividad oxidativa de los neutrófilos de pacientes con LMC.

Agradecimiento: Se agradece el apoyo económico del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR).

RESUMEN

El efecto del tratamiento con hidroxurea sobre la actividad oxidativa de neutrófilos fue evaluado en 14 pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) mediante la determinación de la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Seis pacientes fueron estudiados en el momento del diagnóstico y luego de iniciado el tratamiento y ocho pacientes estuvieron tratados previamente. En pacientes con LMC no tratados, la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno por células no estimuladas fue menor respecto a controles normales. Luego de la estimulación celular, hubo menor producción de anión superóxido sin variación en la producción de peróxido de hidrógeno respecto a controles. Luego del tratamiento quimioterápico hubo un incremento de la liberación de anión superóxido -en condiciones basales y estimuladas- que fue mantenido durante un período medio de 9 meses. En pacientes con tratamiento previo, la actividad oxidativa fue mayor y se mantuvo por un período de seguimiento similar, con relación a los pacientes no tratados. Estos resultados indican que los neutrófilos de pacientes con LMC no tratados evidencian una actividad oxidativa disminuida, que luego del tratamiento con hidroxurea manifiesta una normalización. Este efecto podría ser consecuencia de la aparición de células con una mayor capacidad funcional por efecto de la medicación sobre la maduración de células del clon leucémico o por aumento de las células provenientes de clones normales.

BIBLIOGRAFIA

1. Athens JW, Raab SO, Haab OP y col. Leukokinetic studies. X. Blood granulocyte kinetics in chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest* 1965;44:765-777.
2. Taub RN, Baker MA, Madvastha KR. Masking of neutrophil surface lectin-binding sites in chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood* 1980;55:294-298.
3. Wysocki H, Wierusz-Wysocka B, Sierkeirka H y col. Polymorphonuclear neutrophils function in untreated patients with chronic myeloid leukemia. *Oncology* 1988;45:79-83.
4. El-Maalem H, Fletcher J. Defective neutrophil function in chronic granulocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1976;34:95-103.
5. El-Maalem H, Fletcher J. Defective hydrogen peroxide production in chronic granulocytic leukaemia neutrophils. *Br J Haematol* 1979; 41:49-55.
6. Olofsson T, Odeberg H, Olsson I. Granulocyte function in chronic granulocytic leukemia. II. Bactericidal capacity, phagocytic rate, oxygen consumption, and granule protein composition in isolated granulocytes. *Blood* 1976;48:581-593.
7. Anklesaria PN, Advani SH, Bhisey AN. Studies on granulocyte function in patients with chronic myeloid leukemia. *Tumori* 1985;71:317-324.
8. Broxmeyer HE, Mendelsohn N, Moore MAS. Abnormal granulocyte feedback regulation of colony forming and colony stimulating activity-producing cells from patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia Res* 1977;1:3-12.
9. Odeberg H, Olofsson T, Olsson I. Granulocyte function in chronic granulocytic leukaemia. I. Bactericidal and metabolic capabilities during phagocytosis in isolated granulocytes. *Br J Haematol* 1975;29:427-441.
10. Kaplow LS. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* 1955;10:1023-1030.
11. Radich JP, Gehly G, Gooley T y col. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood* 1995; 85:2632-2638.
12. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 G. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21 (suppl. 97):77-89.
13. Pick E, Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages -induction by multiple nonphagocytic stimuli. *Cell Immunol* 1981; 59:301-318.

14. Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **TIBS** 1993; 18:43-47.
15. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. **Blood** 1984;64:959-966.
16. Pedersen B, Hayhoe FGJ. Cellular changes in chronic myeloid leukaemia. **Br J Haematol** 1971;21:251-255.
17. Silber R and Bertino JR. Metabolism of granulocytes. **Hematology**. 1972, p 578-602. McGraw-Hill. New York.
18. Kaplan SS, Berkow RL, Joyce RA, Basford RE, Barton JC. Neutrophil function in chronic neutrophilic leukemia: defective respiratory burst in response to phorbol esters. **Acta Haematol** 1992;87:16-21.
19. Samuelsson J, Forslid J, Hed J, Palmblad J. Studies of neutrophil and monocyte oxidative responses in polycythaemia vera and related myeloproliferative disorders. **Br J Haematol** 1994;87:464-470.
20. Powell BL, Olbrantz P, Bicket D, Bass DA. Altered oxidative product formation in neutrophils of patients recovering from therapy for acute leukemia. **Blood** 1986;67:1624-1630.
21. Whittaker JA, Khurshid M, Hughes HR. Neutrophil function in chronic granulocytic leukaemia before and after busulphan treatment. **Br J Haematol** 1974;28:541-549.
22. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suryaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. **Free Rad Biol Med** 1990;8:15-19.