



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX NA LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA TIPO B INFANTIL:  
ANÁLISE DO MICROAMBIENTE TUMORAL E CIRCULAÇÃO  
SISTÊMICA DURANTE A FASE DE INDUÇÃO DO  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

---

Londrina  
2017

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX NA LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA TIPO B INFANTIL:  
ANÁLISE DO MICROAMBIENTE TUMORAL E CIRCULAÇÃO  
SISTÊMICA DURANTE A FASE DE INDUÇÃO DO  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa  
Co-orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

oliveira, Geise.

Avaliação do estado redox na leucemia linfocítica aguda tipo B infantil: : análise do microambiente tumoral e circulação sistêmica durante a fase de indução do tratamento quimioterápico / Geise oliveira. - Londrina, 2017.  
52 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Coorientador: Carolina Panis.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. leucemia linfóide aguda - Tese. 2. estresse oxidativo - Tese. I. Sabbatini Barbosa, Décio . II. Panis, Carolina . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX NA LEUCEMIA  
LINFOCÍTICA AGUDA TIPO B INFANTIL:  
ANÁLISE DO MICROAMBIENTE TUMORAL E CIRCULAÇÃO  
SISTÊMICA DURANTE A FASE DE INDUÇÃO DO  
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de pós graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Francis Fregonesi Brinholi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Vanessa Jacob Victorino  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de Abril de 2017.

Dedico este trabalho ao Senhor, que me dá sabedoria, confiança e esperança.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus primeiramente que tem me capacitado e derramado sua graça e benção sobre minha vida e da minha família.

Ao Lucio, meu esposo que é o meu maior incentivador, me encoraja a nunca desistir, me dá apoio e suporte nos momentos que preciso, sempre dedicado a mim e as nossas filhas.

As minhas filhas Rebeca, Victória e Cecília que sem saber, me deram forças por compreenderem a minha ausência, amo vocês muito.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Décio, não só pela constante orientação nesta dissertação, mas também por ter acreditado no meu trabalho.

A Dra. Carolina Panis, minha co-orientadora e grande amiga, sempre alegre e disposta, me fez enxergar o futuro com leveza, e entender que a ciência é necessária. Mesmo nos momentos mais difíceis se mostrou presente.

Aos colegas do laboratório que me apoiaram todo o tempo, e foram parceiros e amigos. Passaram-me todo o conhecimento e apoio de que eu precisava, me deram força nos momentos que precisei.

Gostaria de agradecer também ao Dr. Fausto Trigo, pelo apoio e ajuda, que foi essencial para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos pacientes e seus familiares que mesmo em meio a tanto sofrimento colaboraram em participar desse projeto, para a evolução da ciência e do conhecimento.

A todas pessoas que me ajudaram direto ou indiretamente, seja com uma palavra amiga, uma palavra de encorajamento, seja no cuidado com as minhas filhas, ou no processamento das amostras.

Gostaria de agradecer também a Vanessa, grande amiga que me deu uma força enorme na padronização de algumas técnicas e por compartilhar seu conhecimento comigo, a prof. Dra Francis, que aceitou fazer parte da banca, contribuindo para o meu crescimento e melhoria deste trabalho.

*“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”*

*Martin Luther King*

OLIVEIRA, Geise Ellen Broto. **Avaliação do estado redox da Leucemia Linfocítica Aguda tipo B Infantil**: análise do microambiente tumoral e circulação sistêmica durante a fase de indução do tratamento quimioterápico. 2017. 52p. Dissertação de mestrado (Pós- graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são responsáveis pela patogênese de muitas doenças, inclusive a leucemia linfocítica aguda tipo B infantil (LLA-B). O objetivo deste trabalho foi avaliar biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com LLA-B em diferentes momentos da fase de indução do tratamento. As dosagens foram feitas em 17 pacientes e as coletas ocorreram no D0, ou seja, antes do início do tratamento e nos dias D8, D15, D22 e D28 da fase de indução do protocolo do grupo brasileiro de tratamento de leucemia infantil (GBTLI, 2009). Os parâmetros pró-oxidantes avaliados foram subprodutos de óxido nítrico (NOx) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e os antioxidantes foram os grupamentos sulfidrilas (SH) e a capacidade antioxidante total plasmática (TRAP). Esses marcadores foram analisados no sangue periférico e medula óssea sendo feita uma comparação entre estes dois compartimentos. Os resultados significativos foram um aumento do estresse oxidativo (NOx e LOOH) na medula óssea em relação ao sangue periférico e diminuição do SH no D28 somente no sangue periférico. Esses achados podem indicar novas abordagens terapêuticas no futuro e abrir caminhos para outros estudos que propiciem melhor entendimento sobre essa doença.

**Palavras-chave:** Leucemia linfocítica aguda. Estresse oxidativo. Medula óssea

OLIVEIRA, Geise Ellen Broto. **Evaluation of the redox state of acute lymphocytic leukemia type B**: analysis of the tumor microenvironment and systemic circulation during the induction phase of the chemotherapeutic treatment. 2017. 52p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina.

### **ABSTRACT**

Reactive oxygen species are responsible for the pathogenesis of many diseases, including childhood acute lymphocytic leukemia type B (B- ALL). The objective of this study was to evaluate oxidative stress biomarkers in patients with ALL - B in different moments of induction phase of treatment. The dosages were given to 17 patients with B-ALL and the samples were collected on day 0, that is, before beginning the treatment and on the days D8, D15, D22, and D28 of the induction phase of the protocol of the Brazilian group of treatment of childhood leukemia (GBTLI, 2009). The pro-oxidative parameters evaluated were estimated from the levels of nitric oxide (NOx) and lipid hydroperoxide (LOOH) byproducts and the antioxidants parameters were sulfhydryl groups (SH) and total plasma antioxidant capacity (TRAP). These markers were analyzed in peripheral blood and bone marrow and a comparison was done between them. The results were significant with an increase of the oxidative stress (NO and LOOH) in the bone marrow (in relation to the peripheral blood and a decrease of the sulphhydryl groups-SH only in the peripheral blood on D28. These findings could lead to new therapeutic advances in the future and make in-roads for new studies leading to a better understanding of this disease.

**Key words:** Acute lymphoblastic leukemia. Oxidative stress. Bone marrow.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 – Representação esquemática global do GBTLI-2009 .....</b>	<b>18</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRM	Doença Residual Mínima
EO	Estresse Oxidativo
FDA	Food and Drug Administration
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia infantil
IT	Intratecal
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda tipo B
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LOOH	Hidroperóxidos
MTX	Metotrexato
NOx	Subprodutos do Óxido Nítrico
RNS	Espécie Reativa de Nitrogênio (do inglês Reactive Nitrogen Species)
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species)
SH	Grupamentos sulfidríla
TRAP	Potencial Antioxidante Total Plasmático
$O_2^-$	Ânion superóxido
$H_2O_2$	Péroxido de hidrogênio
Ph	Cromossomo Filadélfia
$OH^-$	Hidroxila

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	TIPOS DE LEUCEMIAS .....	12
1.1.1	Leucemia Mielóide Aguda (LMA)0.....	12
1.1.2	Leucemia Mielóide Crônica (LMC).....	12
1.1.3	Leucemia Linfóide Crônica (LLC) .....	13
1.2	LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA TIPO T E B.....	13
1.2.1	Leucemia linfocítica aguda-T (LLB-T).....	13
1.2.2	LLA-B - Mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença.....	14
1.2.3	Tratamento da LLA-B .....	15
1.2.4	Protocolo e medicamentos .....	16
1.3	CÂNCER E ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
1.4	JUSTIFICATIVA.....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	22
2.1	OBJETIVO GERAL .....	22
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	22
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	22
3.1	Desenho do estudo .....	22
3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	23
3.3	critérios de exclusão .....	23
3.4	Coleta de amostra.....	23
3.5	Determinação do perfil hematológico periférico e medular.....	23
3.6	Análises do status oxidativo .....	23
3.6.1	Grupamento sulfidrila (SH) .....	23
3.6.2	Estimativa dos níveis de subprodutos de óxido nítrico (NOx).....	24
3.6.3	Estimativa da capacidade antioxidante total da amostra (TRAP) .....	24
3.6.4	Determinação dos níveis plasmáticos de hidroperóxidos por quimiluminescência LOOH).....	25
3.7	Correlação clinicopatológica.....	25
3.8	Análise estatística .....	25

<b>Artigo</b> .....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	27
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>Anexos</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

As leucemias são doenças malignas que afetam leucócitos do sangue. Isso ocorre, pois a célula progenitora perde a capacidade de se diferenciar independentemente do seu estágio de maturação, que leva a uma expansão de células imaturas na medula óssea (BATTISTI et al., 2008). Elas são classificadas em agudas e crônicas, e de acordo com o subtipo, podem acometer crianças ou adultos. Sua classificação depende do tipo celular acometido, sendo linfocítica aguda ou crônica, e mielóide também aguda ou crônica. Dentro destes grupos ainda existe uma subclassificação de acordo com a citogenética definida (ER et al., 2007; HAMERSCHLAK, 2012).

### 1.1 TIPOS DE LEUCEMIAS

#### 1.1.1 Leucemia mielóide aguda (LMA)

Ocorre pela presença de blastos de origem mielóide, devido a eventos moleculares e celulares como dano ao DNA, aumento da proliferação celular, instabilidade genética e falha na apoptose. É mais comum em adultos, e pode estar relacionada a fatores externos como radiação, exposição ao benzeno e doenças como síndrome de Down (ZHOU et al., 2010).

A LMA, pode ser também subclassificada, sendo possível fazer definições prognósticas e tratamento diferenciado. O diagnóstico é realizado através da citogenética e imunofenotipagem, que são exames capazes de analisar a morfologia celular, definindo tipo celular e condições cromossômicas. Em geral, a resposta ao tratamento é satisfatória, objetivando o desaparecimento completo das células blásticas e o restabelecimento das células normais. Há casos em que o transplante de medula óssea é necessário, devido ao prognóstico desfavorável (HAMERSCHLAK, 2008).

#### 1.1.2 Leucemia mielóide crônica (LMC)

A LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Filadélfia (Ph) com ou sem o rearranjo BCR-ABL, que é a translocação cromossômica que dá origem a esse gene quimérico (VENDRAMI-GOLONI, 2006). Seu diagnóstico é realizado pela presença da leucocitose, de granulócitos imaturos. Tipicamente a

LMC apresenta diferentes fases que a sucedem: crônica, acelerada e blástica (SOUZA et al., 2013). Acomete mais adultos e se inicia de forma insidiosa, podendo ser descoberta com exames de rotina. Tem como tratamento de primeira linha o mesilato de imatinibe, que é um inibidor da tirosina quinase, proteína envolvida no controle intracelular, que oferece resultados surpreendentes, melhorando a qualidade de vida dos portadores dessa doença (SILVA et al., 2009; HAMERSCHLAK, 2012).

### 1.1.3 Leucemia linfóide crônica (LLC)

É uma doença do sistema linfo-hematopoiético conhecida como a “doença do idoso”. É mais rara nos países orientais, e dentre as leucemias é a que apresenta maior tempo de sobrevivência. Em geral não necessita de internações, sendo o tratamento feito em nível ambulatorial. Etiologicamente parece estar associada à hereditariedade genética, uma vez que há poucos estudos referindo fatores ambientais como causa de LLC (YAMAMOTO; FIGUEIREDO, 2005).

## 1.2 Leucemia linfóide aguda (LLA)

É a leucemia mais comum na infância, e resulta de múltiplos processos que envolvem o hospedeiro tais como alterações cromossômicas e fatores ambientais. A LLA se caracteriza pelo acúmulo de células imaturas (linfoblastos) na medula, o que leva à anemia, trombocitopenia e neutropenia (LEITE et al, 2007).

A LLA pode ocorrer nas células tipo B ou T, sendo seu tratamento diferenciado de acordo com o subtipo. Além disso, classifica o paciente em baixo ou alto risco de recaída, a fim de ajustar o tratamento. Os critérios dessa classificação são definidos pelo protocolo de tratamento sendo consideradas de baixo risco crianças com idade entre 1 e 9 anos e glóbulos brancos  $< 50000/ \text{mm}^3$ . Os demais são classificados como de alto risco, e precisam ter um tratamento mais intensificado (GBTLI, 2009).

### 1.2.1 Leucemia linfocítica aguda-T (LLA-T)

A LLA-T se origina do precursor linfóide cujo progenitor são os linfócitos T. É uma doença agressiva e com prognóstico ruim. Pacientes com LLA-T

apresentam características clínicas desfavoráveis como elevada leucometria, doença extramedular, além do comprometimento do sistema nervoso central. É mais comum no sexo masculino (FARIAS; CASTRO, 2003; HAYDU; FERRANDO, 2013; MATLOUB et al., 2015).

### 1.2.2 Mecanismos que levam ao desenvolvimento da leucemia linfocítica aguda -B

A LLA-B é o tipo mais frequente na infância, cujo progenitor é o linfócito B. Representa 75% dos casos de leucemia linfocítica infantil (HAYDU; FERRANDO, 2013).

Acredita-se que a LLA-B se origina de uma parada de maturação no desenvolvimento normal da célula tronco hematopoiética, podendo ocorrer em diferentes estágios de diferenciação. A célula neoplásica apresenta, então, capacidade ilimitada de proliferação e/ou resistência à apoptose. Na LLA, a leucemogênese é multifatorial, não se conhecendo por completo todos os mecanismos envolvidos. Fatores externos parecem estar envolvidos, como radiação ionizante e não-ionizante, agentes químicos como benzeno, pesticidas, tabaco, quimioterápicos, bem como agentes infecciosos (Epstein-Barr Vírus, Hepatite-B Vírus), além dos fatores intrínsecos genéticos (BATTISTI et al., 2008).

A grande heterogeneidade da LLA-B é explicada em parte pela complexidade do processo de desenvolvimento fisiológico da célula tronco hematopoiética até o linfócito B maduro. Tal processo é resultado de variadas sinalizações celulares originárias de citocinas exógenas e receptores de Imunoglobulinas de células B, bem como da programação genética e transcricional intrínsecas. A desregulação do ciclo celular pode ocorrer em qualquer passo de tal processo, aparentemente por vias celulares fisiológicas anormalmente expressas em determinado momento (PEI, S.; JORDAN, C.T., 2012). O perfil desta sinalização, bem como seu papel na evolução clínica da doença, ainda permanece pouco conhecido.

Para Mel Greaves (2006), os fatores que levam à leucemia infantil merece atenção especial, uma vez que para alguns grupos específicos as taxas de cura ainda são muito pobres. Mesmo com muitos avanços já conquistados, há muito a ser estudado e compreendido. Ainda segundo Greaves (2006), as leucemias, como a

maioria das doenças humanas, são resultantes do impacto causado das exposições cruciais, das influências, do acaso e da susceptibilidade herdada.

As células tronco possuem papel importante na propagação da doença e são o maior objetivo das pesquisas com câncer. Suas propriedades são fundamentais para a compreensão das leucemias, devido ao seu papel na iniciação e manutenção do clone leucêmico. Uma estratégia pensada para se conseguir a cura das leucemias seria erradicar as células tronco anômalas nos pacientes doentes, poupando as células tronco normais, ou seja, evitar a toxicidade celular. Entretanto, seria uma estratégia nada fácil, devido as semelhanças entre os marcadores de superfície das células normais e doentes. Estudos sugerem que doenças com origem da linhagem mieloide podem ser propagadas através de um progenitor linfoide com características transformadas pelos antígenos de superfície e isso pode ser uma estratégia inovadora no tratamento das leucemias (DESHPANDE et al., 2006).

Há estudos que defendem a teoria de que existem dois momentos (“hits”), para o processo da leucemogênese. O primeiro se daria por uma mutação ainda no ambiente intra-uterino, e o segundo acontece já após o nascimento, por alterações genéticas secundárias. Esses fatos “explicam” porque gêmeos idênticos podem desenvolver a doença apenas em um dos irmãos (GREAVES, 2003; HONG et al, 2008).

### 1.2.3 TRATAMENTO DA LLA

O tratamento da LLA baseia-se no princípio da poliquimioterapia, empregando-se variados agentes quimioterápicos que atuam em fases diferentes do ciclo celular. A célula leucêmica em replicação é o principal alvo da terapêutica. O tratamento da LLA é dividido em fases e de acordo com o subtipo de leucemia, sendo divididos em indução, consolidação/ intensificação e manutenção.

Esses regimes terapêuticos têm melhorado a sobrevida dos pacientes, e são para cada caso, um protocolo específico. No caso das leucemias segue-se o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil (GBTLI) de 2009 que é o mais recente (KANTARJIAN et al., 2004). Essa combinação de quimioterápicos é uma estratégia para evitar que ocorra uma resistência aos quimioterápicos bem como o ressurgimento das células malignas, fato frequente na terapia contra o câncer (CHAO et al., 2015).

#### 1.2.4 Protocolo e medicamentos

O GBTLI é o protocolo utilizado no Brasil para tratar as leucemias infantis (figura 1). Ele se divide nas fases de indução, consolidação-intensificação e manutenção, sendo que em cada fase emprega-se diferentes medicamentos e dosagens, levando em consideração os fatores prognósticos. Dessa forma, é possível obter um tratamento individualizado e adequado a cada situação.

A fase da indução é bastante importante, pois se objetiva a remissão total da doença, e é desenhada para reduzir a carga tumoral a um nível indetectável tanto no hemograma como mielograma, sendo crucial para determinar o prognóstico e evolução clínica da doença. Os medicamentos usados são de alta intensidade a fim de que as células leucêmicas sejam destruídas. São utilizados drogas que afetam diretamente o processo mitótico celular, inibindo a dinâmica dos microtubulos que estão diretamente ligados a fase M do ciclo celular levando essa célula à apoptose (CHAO et al, 2015). Sendo assim, faz-se necessário o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta etapa - ainda desconhecidos - e que estão envolvidos na determinação do sucesso ou falha terapêutica (Protocolo GBTLI LLA-1999; Protocolo GBTLI LLA-2009).

A consolidação-intensificação é programada para que as células leucêmicas remanescentes não se tornem resistentes, por isso o regime terapêutico é mais intenso. A fase da manutenção objetiva manter a célula leucêmica em remissão, portanto pode ser necessário repetir alguns ciclos como na indução, principalmente para pacientes com alto risco de recidiva (CAZÉ, BUENO, SANTOS, 2010).

Segundo o protocolo (2009), a morte na fase de indução devido a toxicidade é considerado uma falha do tratamento, assim como a presença de resultados positivos da doença residual mínima (presença de células leucêmicas sem evidência clínica da doença) ao término da indução é indício de mau prognóstico.

A indução tem duração de quatro semanas, sendo que na primeira inicia com o uso de corticoide (prednisona) e metotrexato de sódio (MTX) por via intratecal (IT). Pacientes classificados de baixo risco e que ao final da primeira semana de tratamento obtiverem ainda  $> 1000/\text{mm}^3$  de blastos medular entram no esquema terapêutico do grupo de alto risco. Além da classificação de baixo/alto risco os pacientes são também divididos em grupos de respondedor rápido ou lento, sendo

os critérios para tal, <5% de blastos no oitavo dia de tratamento (D8), e doença residual mínima (DRM) negativa no décimo quinto dia de tratamento (D15), a diferença se dá pela redução da dose de antracíclicos, uma vez que causam toxicidade cardíaca. Os antineoplásicos usados nessa primeira fase são corticóides, antracíclicos e asparaginase, adicionada posteriormente devido à reações alérgicas. Esses medicamentos vêm sendo utilizados há anos com resultados promissores. Embora a asparaginase cause alergia em determinados pacientes, o risco é baixo (ORTEGA et al., 1977; GBTLI, 2009; HENRIKSEN et al., 2015).

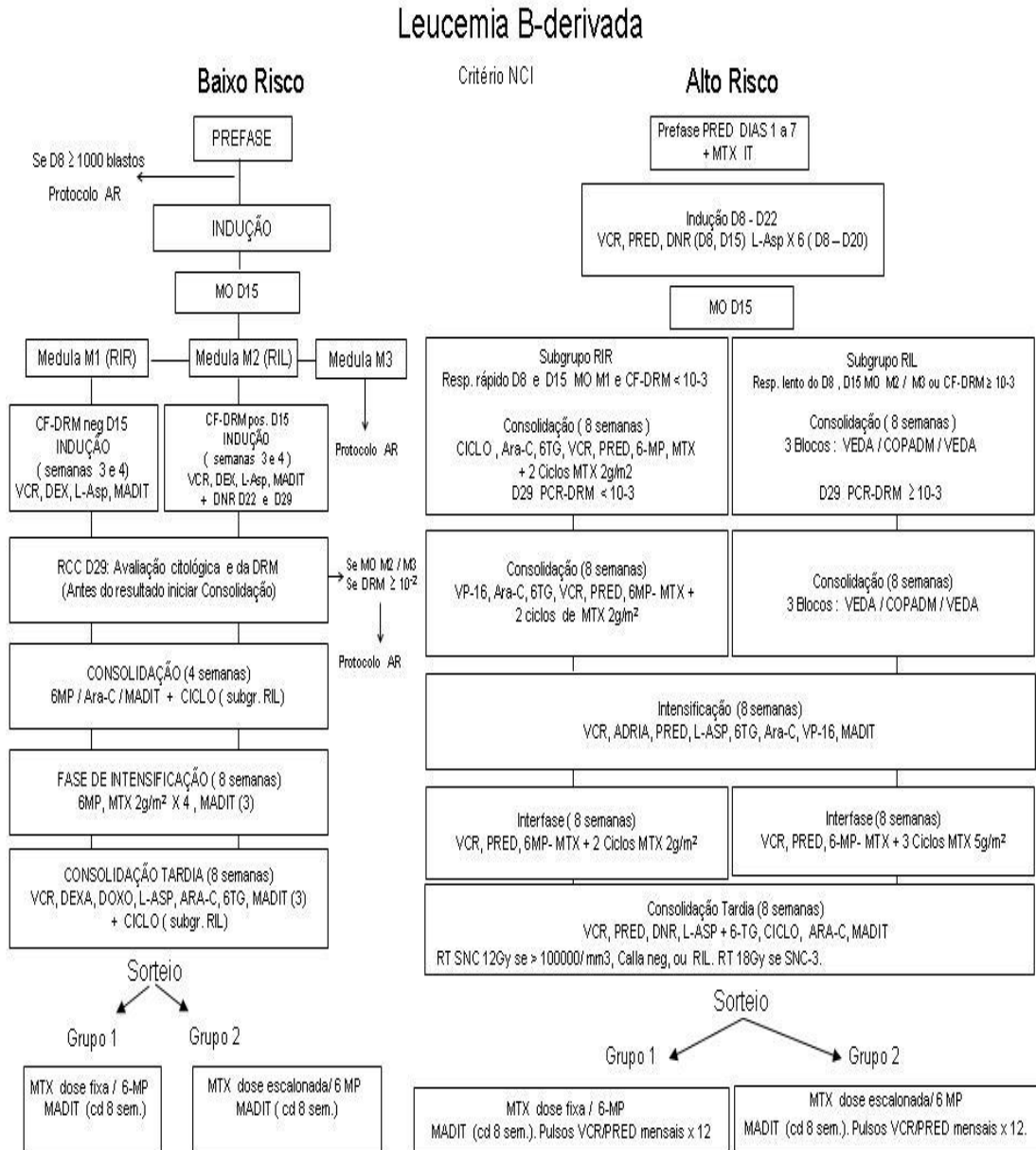
Ao todo o tratamento da LLA tem duração de aproximadamente 30 meses. Em cada fase, objetiva-se manter o paciente em remissão completa e com a sobrevida livre de eventos. Além do mais, busca-se a diminuição da resistência aos medicamentos, imunodepressão e neuropatias entre outros (CHAO et al., 2015; GBTLI, 2009).

O sulfato de vincristina é um quimioterápico que, embora extremamente citotóxico, é frequentemente utilizado na terapêutica das oncologias hematológicas há aproximadamente 40 anos. É uma amina lipofílica, que causa necrose tumoral, pois impede o fluxo sanguíneo nesse local. Seu uso é limitado na dose máxima de 2 mg, devido à neurotoxicidade. Farmacocineticamente a vincristina é bem caracterizada por sua concentração exponencial no organismo, onde apresenta uma rápida fase de distribuição e com longa fase de eliminação. O encapsulamento lipossomal da vincristina, recém aprovado pelo FDA, tem sido utilizado como forma alternativa a essa neurotoxicidade, pois protege a droga da degradação enzimática e do próprio sistema imunológico, reduzindo sua toxicidade e aumentando sua concentração plasmática. Estudos têm sugerido que a encapsulação é segura e bem tolerada mesmo em doses maiores. Outra vantagem, é uma maior segurança em casos de extravasamento, pois causa menos necrose tecidual que a forma convencional, o que torna seu uso clinicamente relevante (SOOSAY RAJ; SMITH; MOORE, 2013; SILVERMAN; REYNOLDS; DEITCHER, 2013).

Os glicocorticóides possuem grande importância nos protocolos de tratamento e a resposta do paciente a esta classe de medicamentos serve como indicador de bom ou mau prognóstico. A resistência ao tratamento com esses medicamentos pode indicar recidiva da doença. Além disso, o uso de tais medicamentos pode levar à imunossupressão, que é um problema relevante, uma

vez que o paciente fica mais susceptível a microorganismos oportunistas (SILVEIRA et al., 2015).

Figura 1- Representação esquemática global do GBTLI LLA-2009



### 1.3 CÂNCER E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo (EO) ocorre quando há um desequilíbrio entre pró-oxidantes (como espécies radicalares de oxigênio e nitrogênio – ROS/RNS) e antioxidantes. Isso faz com que haja um dano celular e molecular que pode impactar em todo o organismo. ROS são produzidas durante o metabolismo normal celular

quando do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. As espécies mais conhecidas são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Em condições de hipóxia, a cadeia respiratória também produz espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) que podem gerar aldeídos, malondialdeídos e peróxidos de lipídeos que, em excesso no organismo, podem aumentar o risco de mutagênese (REUTER et al., 2010).

Sabe-se que o câncer é uma doença inflamatória crônica que leva ao desequilíbrio do status redox da célula, pois em processos inflamatórios há a produção de espécies radicalares pelas células de defesa (CAVALCANTE, BRUIM, 2009). Desta forma, alterações no perfil inflamatório são capazes de induzir mudança no perfil redox celular, e vice-versa. Como consequência, ocorre o EO. Como a LLA é uma neoplasia hematológica de origem medular com extravasamento na circulação sanguínea periférica, tal condição impacta potencialmente, tanto o microambiente tumoral, como no ambiente sistêmico. Portanto, torna-se imprescindível entender os mecanismos sinalizadores envolvidos nesta dinâmica.

O desbalanço redox, representado pelas espécies radicalares (ROS/RNS) parece ser uma das vias que contribuem para a leucemogênese através da indução e instabilidade genômica, levando à transformações malignas e carcinogênese (SANTOS et al., 2014; COLLADO et al., 2011). Assim, o EO pode ter papel importante como mecanismo efetor nas neoplasias hematológicas. A participação do EO nos diferentes aspectos das neoplasias hematológicas tem sido demonstrada através do mapeamento do status oxidativo sistêmico dos pacientes, particularmente nas leucemias (ER et al., 2007); ZHOU, FL. et al., 2010).

O EO pode interagir com os três estágios do câncer: a iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, espécies radicalares induzem mutações gênicas pelo dano causado ao DNA. Na fase de promoção, interfere na expressão gênica bloqueando a comunicação celular, aumentando a proliferação e diminuindo a apoptose. No estágio da propagação, estas espécies radicalares causam mais dano no DNA, contribuindo assim com os três estágios da carcinogênese (REUTER et al., 2010).

Os efeitos do ROS/RNS dependem também da magnitude e local dos níveis no organismo, da duração e localização da exposição. Dependendo da quantidades de ROS/RNS pode ocorrer mutagenicidade, proliferação celular, alteração da permeabilidade da membrana com consequente instabilidade genômica

e isso leva à apoptose ou necrose celular. Em um estudo, puderam observar que o peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ), causou redução da progressão do ciclo celular, e isso levou a um aumento da P53, que é a proteína responsável pela supressão tumoral (BARRERA, 2012; NATHAN; BUSSEL, 2013).

Alterações redox parecem estar associadas não somente à gênese da LLA, mas também ao desenvolvimento de quimiorresistência. Estudos *in vitro* sugerem que o mecanismo de resistência da LLA esteja associado à perda da capacidade das células leucêmicas em responder aos sinais de morte ativados por mecanismos redox na mitocôndria, e que variações no conteúdo antioxidante das células cancerosas parecem estar associadas a esta resistência aumentada, pois a célula consegue se adaptar a esse aumento de ROS/RNS intracelular, ficando resistente ao tratamento tanto medicamentoso como radioterápico. Esse é um dos maiores obstáculos do sucesso terapêutico para o câncer (GOTO H. et al., 2007; BARRERA, 2012).

Além da doença, sabe-se ainda que o tratamento quimioterápico também é uma importante fonte de mediadores de estresse oxidativo no paciente com câncer, o que por um lado danifica as células tumorais pela produção de espécies reativas e por outro, pode gerar o estresse sistêmico, levando à falência e toxicidade de outros tecidos (PANIS et al., 2012; GAROFOLO A., 2003).

Estudos sugerem que o aumento de ROS/RNS está relacionado à indução da apoptose por agentes quimioterápicos usados para tratar o câncer. Alguns agentes terapêuticos utilizados para tratar o câncer têm sua ação dependente de ROS/RNS, o que sugeriu a “terapia da oxidação”, utilizando o ROS/RNS como agente antitumor. Uma característica comum dentre os antineoplásicos é a geração de ROS/RNS intracelularmente. Uma possibilidade estratégica para a terapia antineoplásica é eliminar a célula tumoral sem afetar células normais. Para isso são necessários novos estudos para compreender a sinalização redox dentro da célula tumoral (BARRERA, 2012).

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

O envolvimento do EO nas neoplasias hematológicas, de um modo geral, encontra-se estabelecido. Entretanto, a maior parte dos estudos está relacionada a outros tipos de leucemia. Além de poucos dados, o conhecimento atual sobre os

mecanismos moleculares da LLA aponta para resultados controversos e conflitantes. Além disso, a participação da sinalização redox nas diferentes etapas da quimioterapia que determinam o prognóstico dos pacientes com LLA ainda é pouco conhecida, bem como seu papel no microambiente tumoral leucêmico. Neste sentido, estudos moleculares podem fornecer informações novas e fundamentais para o entendimento da fisiopatologia da doença, bem como auxiliar na identificação de um painel de marcadores com potencial preditivo de pior prognóstico em LLA. Assim, a proposta deste projeto foi avaliar o status redox de pacientes portadores de LLA-B nas diferentes etapas da fase de indução da quimioterapia (início, meio e final) através do mapeamento do estresse oxidativo sistêmico.

Acredita-se que o sucesso do tratamento dependa do desequilíbrio na geração de tais mediadores, uma vez que a farmacoterapia na fase de indução é baseada no uso de corticóides em doses anti-inflamatórias e imunossupressoras.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste projeto foi avaliar biomarcadores de EO em pacientes com LLA-B nas etapas da fase de indução do tratamento.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Caracterizar e comparar o perfil oxidante/antioxidante do plasma periférico e medular de pacientes portadores de LLA submetidos á quimioterapia com o protocolo GBTLI 2009, no início, meio e final da fase de indução do tratamento,

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Desenho do estudo**

Este é um estudo delineado longitudinal observacional. Este projeto teve como proposta avaliar o perfil redox do microambiente tumoral e da circulação sistêmica em pacientes portadores de leucemia linfocítica aguda (LLA) tipo B na infância. Para tanto, recrutou-se todos pacientes com idade entre 0 e 18 anos atendidos no período de Janeiro de 2015 a Janeiro de 2016, no Instituto do Câncer de Londrina-Paraná, submetidos ao protocolo de tratamento antineoplásico padrão baseado nos esquemas GBTLI 2009 ( Protocolo LLA GBTLI, 2009). Esta proposta foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e recebeu parecer favorável (24498213.0.0000.5231- anexo). De acordo com o protocolo GBTLI 2009, as drogas utilizadas nessa fase foram prednisona, metotrexato, daunorrubicina, vincristina e asparaginase.

Todos os responsáveis pelos participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo). Este estudo foi dividido em 2 partes:

- Estudo da fase de indução do tratamento: Os pacientes foram avaliados no D0, D8, D15, D22 e D28 da fase de indução do tratamento, em relação ao sangue periférico, e D0, D15 e D28 em relação ao sangue da medula óssea.
- Comparação entre o estado redox sistêmico e microambiente tumoral medular: Foi realizada a análise pareada entre plasma do sangue periférico e da medula óssea.

### **3.2 Critérios de inclusão:**

Foram incluídos no estudo pacientes cujos responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, portadores da LLA-B, que foram submetidos ao protocolo de tratamento GBTLI-2009 e que estavam na fase de indução.

### **3.3 Critérios de exclusão:**

Foram excluídos do estudo os pacientes que não foram submetidos ao protocolo de tratamento, aqueles que não estavam na fase de indução da quimioterapia e pacientes portadores de outro tipo de leucemia.

### **3.4 Coleta de amostras**

Nos tempos do tratamento previamente determinados foi coletado sangue periférico e aspirado de medula óssea em tubos de EDTA para determinação do status oxidativo. Estas amostras foram centrifugadas (3500 x g, 5 minutos) para obtenção de plasma. Todas as amostras foram armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

### **3.5 Determinação do perfil hematológico periférico e medular**

Foi realizado em todos os pacientes deste estudo um acompanhamento clínico e laboratorial através da realização de hemogramas e mielograma (% blastos) para imunofenotipagem e estudo do perfil de evolução da doença.

### **3.6 Análises do status oxidativo**

As amostras de plasma periférico e de medula óssea foram utilizadas para determinação do status oxidativo através da medida de:

**3.6.1 Grupamento sulfidril (SH):** Para a dosagem do grupamento sulfidril foi utilizado o plasma medular e periférico. O método utilizado foi descrito previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). A análise é baseada na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas. A leitura é feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo

EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados são expressos em  $\mu\text{M}$  de sulfidrina.

**3.6.2 Estimativa dos níveis de subprodutos de óxido nítrico (NOx):** Para a determinação da concentração de subprodutos do NOx foi utilizado o plasma periférico e medular. Foi realizado pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez et al. (1998). O óxido nítrico é um gás muito instável que se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotização e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx é feita em leitora de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA), sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração foi expressa em  $\mu\text{M}$  de nitrito.

**3.6.3 Estimativa da capacidade antioxidante total da amostras (TRAP):** O TRAP foi avaliado por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996). A metodologia é baseada na geração de radicais peroxila ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azoiniciador dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (ABAP). Este experimento é conduzido em uma leitora de microplacas Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30°C. Os resultados são expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox.

**3.6.4 Determinação dos níveis plasmáticos de hidroperóxidos por quimiluminescência (LOOH):** A avaliação da formação de hidroperóxidos por quimiluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991) e Panis et al. (2012). A quimiluminescência estimulada por tert-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos presentes no plasma. Este teste baseia-se no consumo das defesas antioxidantes e a formação de hidroperóxidos resultando em um aumento da emissão de fótons, ou seja, em um aumento de quimiluminescência que está relacionado com o estresse oxidativo. Este experimento é realizado em luminômetro Glomax (TD 20/20). Todo o experimento é realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência, a 30°C,

durante 60 minutos. Os resultados são expressos em unidades relativas de luz (URL) e a curva obtida foi utilizada como um indicador qualitativo da lipoperoxidação. Os resultados quantitativos foram obtidos após a integração da área sobre a curva utilizando o OriginLab 7.5 software.

### **3.7 Correlação clinicopatológica**

Os dados obtidos nas análises dos parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes foram associados a parâmetros clínicos e patológicos obtidos durante o seguimento dos pacientes, bem como de dados extraídos de prontuário.

### **3.8 Análise estatística**

Inicialmente uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância para cada variável estudada pelo teste de Levene. Para os dados com distribuição normal, utilizou-se o teste de ANOVA complementado pelo teste de Tukey. Estes resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão. Caso contrário, foi empregado Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn. Neste caso, os dados foram apresentados por mediana e valores mínimos e máximos. Foi considerado significativo sempre que  $p < 0,05$ . Todos os cálculos foram feitos no software GraphPad Prisma 5.0 (GRAPHPAD software, San Diego, California).

Artigo

## ORIGINAL ARTICLE

**Lipid peroxidation in peripheral and bone marrow plasma discloses a new putative marker of disease evolution during the induction phase of childhood B-cell acute lymphocytic leukemia treatment.**

Broto GE, Panis C, Trigo FC, Victorino VJ, Bonifácio, KL; Barbosa DS.

**Abstract**

Oxygen reactive species (ROS) are responsible for the pathogenesis of many disorders, including B-cell Acute lymphocytic leukemia (B-ALL). The purpose of this study was to evaluate biomarkers of oxidative stress in patients with B-ALL in different phases of induction. The dosages were given to 17 patients with ALL and the blood samples were collected on day 0—i.e. before beginning the treatment—and on D8, D15, D22, and D28 of the treatment process in accordance with the protocol developed by the Brazilian group treating childhood leukemia (GBTLI). Pro-oxidative parameters evaluated were estimated from the level of nitric oxide by products (NOx) and hydroperoxides (LOOH); in addition, the antioxidants were the sulphhydryl groups (SH) and the total plasmatic antioxidant capacity (TRAP). These indicators were analyzed in peripheral blood and bone marrow and a comparison was done between them. The results were also compared with minimal residual diseases. The results were significant with an increase of the oxidative stress (NOx and LOOH) in the bone marrow (in relation to the peripheral blood and a reduction of the SH only in the peripheral blood on D28. Levels of LOOH were significant in the presence of minimal residual diseases. These findings could lead to new therapeutic advances in the future and make in-roads for new studies leading to a better understanding of this disease.

**Keywords:** B-cell Acute lymphocytic leukemia. Oxidative stress. Bone marrow

## Introduction

Oxidative stress is a pivotal event in physiological processes that occur during hemopoiesis<sup>1</sup>, specially for stem cells differentiation<sup>2</sup>.

Studies have documented the participation of oxidative stress in some aspects of hematological neoplasias, including leukemia<sup>3,4</sup>. It is known that cancer cells are under higher oxidative stress than normal cells<sup>5</sup>, which requires its adaptation to counterpart the continuous prooxidant impairment. Since oxidative stress is necessary to the normal bone marrow functioning, in the process of hematopoiesis, it is expected that this environment might exhibit altered redox balance in cancer patients, as well presents hematopoiesis impairment in some instance.

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common malignant neoplasia that affects child worldwide. Notwithstanding its relative good prognosis, a small percentage of patients present poor clinical outcome<sup>6</sup>. The reasons why it occurs are determined in part by clinical aspects of disease; however, there are some cellular and molecular factors that may contribute to its poor progression in both tumor microenvironment and systemic level. Therefore, understand the molecular mechanisms that underly the initial phases of treatment seems to be crucial.

Bone marrow stromal cells can mediate redox adaptation in ALL by leading to increased mitochondrial oxidative stress, which has been potentially associated as a mechanism for drug resistance and disease recurrence<sup>7</sup>. Further, enhanced oxidative stress have been reported in disease treatment as a cause of systemic injury<sup>8,9</sup>.

In spite of this, studies have not focused in establish the relationship between oxidative stress and disease prognosis in B-ALL patients undergoing the initial phases of treatment, like the induction. Induction phase is characterized by a set of combined drugs know by generating oxidative stress<sup>6</sup>.

Al-Tonbary et al.<sup>10</sup> evaluated the antioxidant capacity and malondialdehyde levels in serum of ALL, and found redox imbalance when comparing patients at diagnosis and at the end of treatment. But no additional studies have described the oxidative profiling and its clinical relevance in bone marrow environment. So, it seems relevant to characterize the systemic and bone marrow

microenvironment oxidative profiling of ALL patients, aiming to understand if oxidative mediators could help to explain some of the clinical aspects observed during this step of treatment.

In this context, this work characterized the oxidative stress profiling of patients newly diagnosed with B-ALL undergoing the induction phase of treatment by comparing plasma samples from systemic and bone marrow microenvironment, and its meaning in the context of disease response along diagnosis (D0) and the subsequent treatment days (D8, D15, D22 and D28) and risk categorization.

Methods:

### **Study design**

This study has a longitudinal observational design and was approved by the Institutional Ethics Board (24498213.0.0000.5231). Pediatric patients diagnosed with B-ALL with age between 0-18 years were recruited from January 2015 to January 2016, after signed consent forms.

All patients were from Institute of Cancer in Londrina, Paraná-Brazil, and were ongoing the chemotherapeutic schedules recommended by the Brazilian Childhood Leukemia Treatment Group (GBTLLI, 2009). Whole blood samples were obtained at diagnosis (D0 no treatment), and sequentially in the eighth (D8), fifteenth (D15), twenty-second (D22) and twenty-eighth (D28) days after starting the induction phase of treatment. Following the routine sample collection employed by the GBLTI protocol, for peripheral plasma analysis we collected samples from all treatment intervals, while for bone marrow plasma it was evaluated samples from D0, D15 and D28.

D0 started with corticoid (prednisone), then the following drugs were introduced: vincristine, prednisone, daunorubicin and asparaginase.

All samples (peripheral blood and bone marrow) were centrifuged to obtain plasma (3500 x g, 5 minutes) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until oxidative stress analyses. Medical records were assessed to obtain clinical pathological data. For risk categorization were considered as low risk children between 1 and 9 years, white cells  $< 50000/\text{mm}^3$ . The others were high risk.

### Investigation of oxidative status

To determine the oxidative status of samples, we quantified the following parameters:

**a) Sulfhydryl groups (SH):** Sulfhydryl groups from proteins were evaluated by the method described by Hu (1994)<sup>11</sup> adapted by Taylan and Resmi (2010)<sup>12</sup>. SH method is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2 nitrobenzoic acid (DTNB) with sulfhydryl groups. Determination was conducted in a microplate reader, Perkin Elmer®, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at 412nm. Results are expressed as  $\mu\text{M}$  of sulfhydryl.

**b) Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP):** TRAP was evaluated according to the method described by Repetto et al. (1996)<sup>13</sup> in microplate reader Victor X-3, Perkin Elmer® (Waltham, MA, USA). Experimental conditions were: running time of 25 minutes, response range from 300 to 620 nm and a temperature of 30°C. This method detects hydro and/or liposoluble antioxidants present in serum. The results were expressed as  $\mu\text{M}$  trolox.

**c) Nitric oxide metabolites (NOx):** NO levels were assessed indirectly by determining the plasma nitrite concentration using an adaptation of the technique described by Navarro-González et al. (1998)<sup>14</sup>. This method is based on the reduction of the nitrate present in the sample to nitrite by oxidation-reduction reactions mediated by the system cadmium-copper reagent. Thereafter, Griess reagent was added to induce diazotization, forming a colored complex and subsequent detection at 540 nm. The quantification of NOx was made in a microplate reader Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, USA). The nitric oxide metabolites concentration was expressed as  $\mu\text{M}$  nitrite.

**d) Lipid hydroperoxides - chemiluminescence assay (CL-LOOH):** CL-LOOH were determined according to an adaptation of the technique described by Gonzales-Flecha et al.<sup>15</sup> (1991) and Panis et al. (2012)<sup>16</sup>. This method uses the compound tert-butyl hydroperoxide to start a lipid chain reaction that can be detected by photon emission during the formation of lipid hydroperoxides. Readings were performed in a Glomax luminometer (TD 20/20 Turner Designers, E.U.A.) over 1h at 1 readings/s. Results were expressed as relative units of light (RUL).

### 3.4 Statistical analysis

Comparisons were performed according to the normal distribution of data in the Shapiro-Wilk test, as well as the homogeneity by Levene's test. Difference among groups were analysed by

ANOVA followed by Tukey's test (parametric data) or Kruskal-Wallis followed by Dunn's test (non-parametric data). For the study of minimal residual disease, data were compared by using paired Student's t-test. All analyses were performed in the software GraphPad Prism 5.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). A  $p < 0.05$  value was considered as significant.

## RESULTS

Clinicopathological data of patients is shown in Table 1. A total of 17 patients was included in this study. The mean age of patients was 7.8 years, and most of patients were male (52.95%) and caucasian (88.23%).

**Table 1 – Clinicopathological characterization of patients.**

Number of patients	N=17
Mean age at diagnosis (years)	7.8±0.95
Mean BMI (kg/m <sup>2</sup> )	16.46±0.6
<b>Ethnicity</b>	
Caucasian	88.23%
African	11.74%
<b>Gender</b>	
Male	52.95%
Female	47.05%
<b>Risk categorization</b>	
Low risk at D15	N=13
High risk at D15	N=4
Low risk at D28	N=10
High risk at D28	N=7

**Legend:** BMI= body mass index, D15 = 15<sup>th</sup> day of sample collection, D28 = 28<sup>th</sup> day of sample collection

Table 2 shows the oxidative status of peripheral plasma during the induction phase of treatment. It was observed significant augment in NO<sub>x</sub> levels when comparing D8 versus D22. We further observed increased LOOH at D22 when compared to D0. At D28 we detected increased NO<sub>x</sub> and LOOH in

relation to D8 and D28, respectively. Significant reduced SH levels were also observed when comparing D8 versus D28.

**Tabela 2 oxidative status of peripheral plasma during the induction phase of treatment**

variables	NOx ( $\mu$ M)	SH ( $\mu$ M)	TRAP ( $\mu$ M)	LOOH (R.L.U)
Moment				
D0	6.54 (2.50 – 16.16)	354.95 (144.81 – 436.29)	907.98 (690.24 – 1,399.30)	966 x 10 <sup>3</sup> (690 x 10 <sup>3</sup> – 3,98 x 10 <sup>3</sup> )
D8	4.64 (2.13 – 9.15)	406.70 (144.27 – 604.89)	767.29 (579.10 – 1,399.0)	1,135 x 10 <sup>3</sup> (880 x 10 <sup>3</sup> – 2,235 x 10 <sup>3</sup> )
D15	4.92 (2.88 – 15.27)	324.01 (161.51 – 474.90)	737.84 (566.39 – 1,248.40)	1,185 x 10 <sup>3</sup> (748 x 10 <sup>3</sup> – 1,819 x 10 <sup>3</sup> )
D22	6.60 & (3.87 – 23.45)	329.44 (200.68 – 489.52)	751.96 (517.18 – 1,168.80)	1,562.10 <sup>3</sup> # (800 x 10 <sup>3</sup> – 4,905 x 10 <sup>3</sup> )
D28	8.54 * (5.19 – 24.73)	308.56 ¥ (205.32 – 403.68)	691.35 (574.56 – 1,234.0)	1,739 x 10 <sup>3</sup> # (799 x 10 <sup>3</sup> – 4,666 x 10 <sup>3</sup> )

Legend: The results are presented as median (min-max). statistic - Kruskal-Wallis completed with Dunn's test. D = day of treatment; NOx (nitric oxide by-products); SH (sulphydryl groups); TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter); LOOH (hydroperoxides) in peripheral blood. & p < 0.05 D8 X D22; \* D8 X D28; ¥ D8 X D28. # D0 X D22; D0 X D28.

Regarding the oxidative status of bone marrow plasma (table 3), it was only detected a significant increase in NOx levels at D28 in relation to D15.

**Tabela 3 Oxidative status of bone marrow plasma during the induction phase of treatment**

variables	Nox ( $\mu$ M)	SH ( $\mu$ M)	TRAP ( $\mu$ M Trolox)	LOOH (R.L.U.)
Moment				
D0	5.13 (3.17- 17.41)	330.75 (72.70 – 418.33)	857.17 (619.64 – 1,291.9)	2,43x10 <sup>3</sup> (948x10 <sup>3</sup> – 5,316x10 <sup>3</sup> )
D15	4.59 (3.61 – 14.52)	299,21 (157.90 – 467.18)	846.31 (538.15 – 1,146.1)	2,11x10 <sup>3</sup> (1,02x10 <sup>3</sup> – 6,16x10 <sup>3</sup> )
D28	8.03 # (4.38 – 27.47)	294,06 (238.96 – 324.80)	775,16 (496.80 – 1,114.90)	2,200x10 <sup>3</sup> (1,05x10 <sup>3</sup> – 7,71x10 <sup>3</sup> )

Legend: The results are presented as median (min-max). Statistic - Kruskal-Wallis completed with Dunn's test. D = day of treatment; NOx (nitric oxide by-products); SH (sulphydryl groups); TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter); LOOH (hydroperoxides) in bone marrow.

# p < 0.05 D15 X D28

When comparing the oxidative status from peripheral versus bone marrow plasma

(quadro 1), it was possible to detect significant augmented LOOH in both D0 and D15.

**Quadro 1- Comparative analysis of oxidative status from peripheral and boné marrow plasma during the induction phase of treatment.**

Variables	D0		D15		D28	
	PB	BM	PB	BM	PB	BM
Nox (µM)	6.54 (2.50 – 16.16)	5.13 (3.17 – 17.41)	4.92 (2.87 – 15.27)	4.59 (3.61 – 14.52)	8.54 (5.19 – 24.73)	8.03 (4.38 – 27.47)
SH (µM)	354.95 (148.81 – 436.29)	330.75 (72.70 – 418.33)	324.01 (161.51 – 474.90)	299.21 (157.90 – 467.18)	308.56 (205.32 – 403.68)	294.06 (238.96 – 32.80)
TRAP (µM Trolox)	907.98 (690.24 – 1,390.3)	857.17 (619.64 – 1,291.9)	737.84 (566.39 – 1,248.4)	846.31 (538.15 – 1,146.1)	691.35 (574.56 – 1,234.0)	775.16 (496.80 – 1,114.9)
LOOH (R.L.U.)	966x10 <sup>3</sup> (690x10 <sup>3</sup> – 3,98x10 <sup>3</sup> )	2429x10 <sup>3</sup> # (948x10 <sup>3</sup> – 5,32x10 <sup>3</sup> )	1,185x10 <sup>3</sup> (748x10 <sup>3</sup> – 1,82x10 <sup>3</sup> )	2,107x10 <sup>3</sup> * (1,024x10 <sup>3</sup> – 6,16x10 <sup>3</sup> )	1,739x10 <sup>3</sup> (799x10 <sup>3</sup> – 4,67x10 <sup>3</sup> )	2,200x10 <sup>3</sup> (1,052x10 <sup>3</sup> – 7,71x10 <sup>3</sup> )

Legend: The results are presented as median (min-max). Statistic – Wilcoxon completed with Spearman test. D = day of treatment; NOx (nitric oxide by-products); SH (sulphydryl groups); TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter); LOOH (hydroperoxides) in Peripheral blood vs. bone marrow. # p < 0.05 D0 PB X D0 BM #; \* D15 PB X D15 BM

Aiming to understand if the oxidative parameters could affect disease outcome, we performed the analysis of the presence of minimal residual disease (MRD) at D15 and D28 in both peripheral and bone marrow plasma samples. Our data shows that only LOOH was significantly altered regarding MRD status (Figure 1). It was observed augmented LOOH in the bone marrow (BM) from positive MRD patients at D15 in relation to peripheral blood (PB) plasma (PB median 1,129e+006, min 808480 and max 1,669e+006; BM median 2,233e+006, min 1,024e+006, max 6,162e+006, p=0.0131). Further significant elevation of LOOH was detected when comparing PB from D28 patients with or without positive MRD (MRD positive median 2,915e+006, min 2,694e+006 and max 3,725e+006; MRD negative median 1,570e+006, min 799447 and max 1,862e+006, p=0.0006).

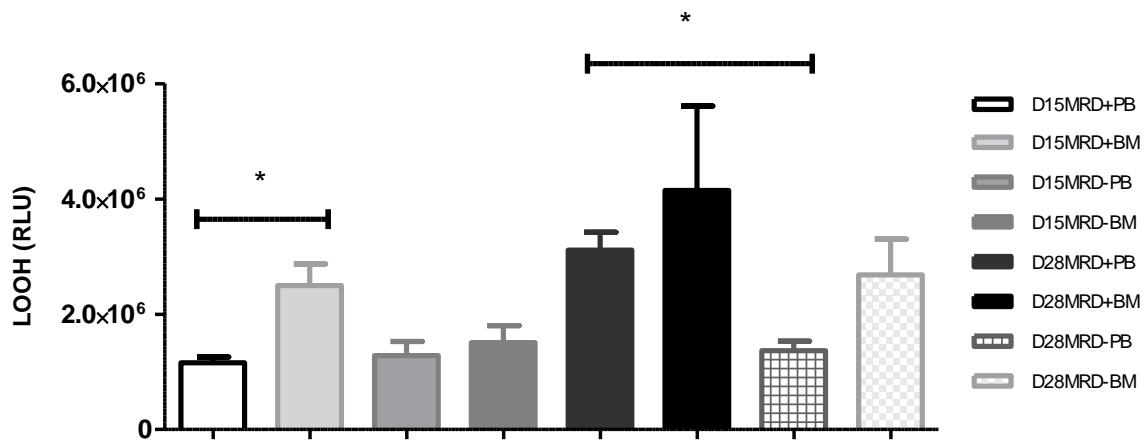


Figure 1: evaluation of lipid peroxidation profile of peripheral and bone marrow plasma concerning the minimal residual disease status at D15 and D28. MRD= minimal residual disease, PB= peripheral blood, BM= bone marrow, RUL= relative units light. \* $p < 0,05$ .

## DISCUSSION

The present study shows for the first time that the profiling of lipid peroxidation metabolites can be altered during the induction phase of B-ALL treatment, and establishes a comparative vision regarding systemic versus tumor microenvironment. A key finding of our work concerns the demonstration of an increase in lipid hydroperoxide levels in bone marrow as compared to peripheral blood from diagnosis up to the 15th day of induction treatment, by which time they had already received three chemotherapy drugs (prednisone, methotrexate and daunorubicin).

The comparison between bone marrow and peripheral blood allows a better understanding of the B-ALL microenvironment, as it is probably under an increased oxidative stress. It is well known that normal hematopoiesis is dependent on low oxidative stress levels<sup>2</sup> and is negatively affected by its rise, leading to defective cell proliferation processes and possibly cancer development<sup>17,2</sup>.

ROS production is a crucial phenomenon that can directly affect cellular components as lipids, proteins and DNA. Therefore, characterize the oxidative status from both systemic and tumor microenvironment in B-ALL may help to understand disease behavior. In this context, analysis of peripheral blood samples by oxidative stress parameters revealed significant increases in NOx and LOOH on days 22 and 28.

There was no significant difference in lipid hydroperoxide levels at day 28 of induction

treatment in bone marrow. This is possibly explained by the bone marrow intensive hypocellularity and the consequent peripheral blood pancytopenia at this stage of treatment, reflecting a common side effect of non target specific chemotherapeutic drugs <sup>18</sup>.

Induction treatment consists mainly on the use of corticosteroid, methotexate, vincristine, doxorubicin and L-Asparaginase. The later 4 drugs are known to generate oxidative stress and are used in high doses to achieve rapid tumor cells eradication <sup>19, 20</sup>. Corticosteroid use has a crucial role as it may provide tumor cell apoptosis gene expression <sup>21</sup>. As such, ALL response to prednisone only (exclusively used from day 1 to 8 of Induction) is an important prognostic factor and is defined by a positive blast count on day 8 <sup>22</sup>.

As for the NOx varying levels observed from day 0 through 28, these may be indicative of systemic synthesis alterations as well as peripheral consumption at oxidative stress reactions. A recent study has demonstrated nitric oxide to slow rat embryogenic stem cell differentiation and therefore maintaining its pluripotent state <sup>23</sup>. This fact might enhance ALL persistence at bone marrow.

NO is frequently associated with peroxynitrite molecule generation in oxidative stress situations, which may completely consume the antioxidant defense molecules for its intense reactivity <sup>18</sup>. This may have accounted for SH low levels at day 28 in peripheral blood, as elevated chemotherapy drugs levels and its oxidant metabolites may have decreased patients antioxidant defense molecules. Chemotherapy drugs are frequently active upon its metabolism by the kidney and liver P450 enzymatic systems. alkylation and dehydrogenation metabolic processes may be identified by the presence of its metabolites in urine, such as carboxiphosphamide. It is found in the urine of patients receiving cyclophosphamide, which is extensively utilized as part of the treatment in a wide variety of cancer types <sup>24</sup>.

LOOH high levels in peripheral blood reflects the established oxidative stress in ALL, as it is the result of higher levels of free radicals in this disease situation. Nevertheless, Devi et al (2000)<sup>25</sup> have found normal LOOH plasma levels while analysing different leukemia types against his own expectation. Accordingly to our results, Battist et al.(2008) <sup>26</sup> have obtained high LOOH levels in ALL patients both before and after Induction phase of treatment.

Antioxidant consumption comprehends an important step in oxidative stress

establishment. Our results show decreased sulphhydryl molecule levels at the end of Induction treatment. Several studies have addressed the enzymatic antioxidant molecules' lower levels in leukemias such as SOD, catalase and glutathion peroxidase<sup>27</sup>, detected even before treatment<sup>28</sup>. On the other hand, Arshi Naz et al. (2013)<sup>29</sup> have found increased antioxidant enzymatic activity of SOD, glutathion reductase (GR) and total antioxidant capacity (TAC) in pediatric ALL patients. El-Sabagh et al (2011)<sup>30</sup> have also found lower levels of antioxidants GSH, Ascorbic Acid (Vitamin C), glutathion reductase (GR), catalase and SOD after 3 months of chemotherapy, therefore revealing oxidative stress in these patients. A review article on redox control in leukemias by Irwin (2011)<sup>18</sup> argues that antioxidant levels may present elevated or diminished according to treatment being applied and/or reactive oxygen species generation. In this way, it seems that antioxidant consumption occurs both by the disease and the treatment, as chemotherapy drugs used in ALL treatment protocols are capable of producing such systemic event<sup>31</sup> despite the lack of studies comparing different times of Induction such as our study.

Arshi Naz et al. (2013)<sup>29</sup> have found higher levels of oxidative stress at the end of Induction treatment in patients with either lymphoid and myeloid acute leukemias, as compared to their diagnosis status.

Therefore, we conclude that our findings of oxidative stress may be caused not only by the disease itself but also by the chemotherapy received.

Regarding bone marrow analysis, samples collected at days 0, 15 and 28 per protocol were analysed comparatively. The only significant finding was an increased NOx level in day 28, without any variation in antioxidant levels or any other parameter. Our results therefore demonstrate oxidative stress in the bone marrow. This oxidative stress plays an important role in the chemotherapy efficacy, as the rise in reactive oxygen species in the tumoral microenvironment enables marrow hematopoietic stem cells proliferation and reduces its self-renewal capacity<sup>2</sup>.

NO produced by the eNOS also plays an important role in the cellular response as it is implicated in stem cell mobilization from bone marrow. This has been well demonstrated by Li, Lu, Zhao et al. (2009)<sup>32</sup> with the expression of eNOS promoting the migration of mesenchymal stromal cells (MSC) to the ischemic myocardic muscle and subsequent gain of function. ROS are important

regulatory molecules in several biological processes, as cell differentiation. Nevertheless, they also play an important role in detrimental cell growing processes such as apoptosis and DNA damage<sup>33</sup>. There have been reports of stem cell aging through cellular decomposition processes after ROS increased levels, reducing its mitochondrial integrity and self renewal capacity although in a reversible way<sup>34</sup>.

Hematopoietic stem cells are capable of differentiating in any type of tissue cells, as well as being able to produce all of immune defense cells indefinitely. The so called “Niche” microenvironment provides the ideal conditions to sustain and regulate these cellular processes. Either extrinsic or intrinsic, this sustained activity is constantly studied as these cells are implicated in important processes such as tissue repair, inflammation and angiogenesis<sup>35,36</sup>.

ROS constitutes itself in an important regulatory mechanism of stem cells, specially the superoxide anion ( $O_2^-$ ) and the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). We have already argued that normal levels of ROS are important to maintain cellular physiological functions such as proliferation, migration and differentiation, whereas excessive levels are pathological. It is a fact that ROS, specially  $H_2O_2$ , promotes stem cells to abandon quiescent state<sup>36</sup>. In order to better understand the homeostatic ROS levels that are adequate to promote efficient cell signaling pathways, Yun et al.<sup>37</sup> have proposed the concept of “redox window” that suggests ROS levels limits enabling adequate cellular responses.

It was observed that there is no statistically significant increase of LOOH at D28 hydroperoxides. It may be due to the fact that, at the end of the induction stage of the chemotherapy protocol, bone marrow is hypocellular, as a consequence of the severity of treatment. This process is important for reducing the amount of tumor cells, but also for the normal blood cells, since unfortunately the drug is not a specific target<sup>18</sup>. We have measured the total lipid content from bone marrow samples, and did not observe any difference among groups during treatment (data not shown). Thus, it is noted that bone marrow during this hypocellularity stage was not significantly filled by lipids, suggesting that the lipoperoxidation process in the tumor microenvironment is related to the oxidation of cell membranes, and does not require free lipids in tumor microenvironment.

On the other hand, it was observed in relation to the lipoperoxidation profile that patients with positive minimal residual disease in D15 and D28 presented a significant increase of the

lipoperoxide levels in the BM and PB, respectively. These findings indicate that the presence of minimal residual disease, ie the presence of treatment-resistant tumor cells in both bone marrow (D15) and peripheral blood (D28), may be required for the production of lipoperoxides observed in this study . MRD occurs significantly in some cases of ALL and is used to classify risk of relapse of patients at this stage <sup>38</sup>.

In summary, regarding oxidative stress, there are differences between bone marrow (i.e. tumoral microenvironment) and periferic blood. The presence of minimal residual disease aggravates the level of oxidative stress. These findings could lead to new therapeutic advances in the future.

Acknowledgements:

Conflict of Interest: None

References:

1. Gaman AM, Buga A-M, Gaman M-A, Popa-Wagner A. The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014;2014:158135. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4212632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*. 2011;117(22):5816–26.
3. Er T-K, Tsai S-M, Wu S-H, Chiang W, Lin H-C, Lin S-F, et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin Biochem*. 2007;40:1015–9.
4. Zhou F, Zhang W, Wei Y, Zhou D, Su Z, Meng X, et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leuk Res*. 2007;31:387–93.
5. Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-

- cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med.* 2017; 23(1): 120 - 127. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869804>
6. Hockenberry MJ, Taylor OA, Gundy PM, Ross AK, Pasvoqel A, Montqomery D, et al. F2-isoprostanes: a measure of oxidative stress in children receiving treatment for leukemia. *Biol Res Nurs.* 2014; 16(3): 303 – 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956352>
  7. Liu J, Masurekar A, Johnson S, Chakraborty S, Griffiths J, Smith D, et al. Stromal cell-mediated mitochondrial redox adaptation regulates drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2015; 6(40): 43048 -68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26474278>
  8. Ki Moore IM, Gundy P, Pasvogel A, Montqomery DW, Taylor OA, Koerner KM, et al. Increase in oxidative stress as measured by cerebrospinal fluid lipid peroxidation during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015; 37(2): 86 – 93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25222054>
  9. Cole PD, Finkelstein Y, Stevenson KE, Blonquist TM, Vijayanathan V, Silverman LB, et al. Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress Are Associated With Inferior Cognitive Function After Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J clin Oncol.* 2015; 33(19): 2205 – 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987702>
  10. Al-Tonbary Y, Al-Hasan SA, Zaki M, Hammad A, Kandil S, Fouda A. Impact of anti-oxidant status and apoptosis on the induction phase of chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology [Internet].* 2011;16(1):14–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269562>
  11. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI (eds) *Methods in Enzymology.* California: Academic Press.1994; 380-82.
  12. Taylan E, Resmi H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulphydryl Measurement in Biological Samples. *Turk. J. Biochem.* 2010; 35 (3): 275-278

13. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta.* 1996; 255: 107-117.
14. Navarro-gonzález JA, García-benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 1998; 44: 679-681.
15. Flecha BG, Ilesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Radical Biology and Medicine.* 1991; 10: 93-100.
16. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 33, 89-97, 2012.
17. De Cavanagh EM V, Honegger AE, Hofer E, Bordenave RH, Bullorsky EO, Chasseing NA, et al. Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients. *Cancer.* 2002;94(12):3247–51.
18. Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013;18(11):1349–83. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Babiak RMV, Campello AP, Garnieri EGS, Oliveira MBM. Metotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell biochem funct.* 1998; 16(4): 283 – 93.
20. Vagace JM, Gervasini G. Chemotherapy Toxicity in Patients with Acute Leukemia. *Acute Leuk - Sci Perspect Chall.* 2011;391–414.
21. Tissing WJE, Boer ML Den, Meijerink JPP, Menezes RX, Swagemakers S, Spek PJ Van Der, et al. Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Gene.* 2007;109(9):3929–35.
22. Meissner B, Stanulla M, Ludwig W-D, Harbott J, Möricke a, Welte K, et al. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2004;18(11):1920–3. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15457183>
23. Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Beltran-Povea A, Hitos AB, et al. Nitric Oxide Prevents Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation Through Regulation of Gene Expression, Cell Signaling, and Control of Cell Proliferation. *J Cell Biochem.* 2016; 2088(February):2078–88.
  24. Saul G, Matthias M, Rose H, Pradel I. Excretion patterns of alkylating metabolites in urine following cyclophosphamide treatment of tumor patients: Influence of application route, dosage, liver and kidney function. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1979;94(3):277–86.
  25. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta.* 2000;293:53–62.
  26. Battisti V, Maders LDK, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado P a., et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem.* 2008;41:511–8.
  27. Sentürker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Hamza Müslümanoğlu, Gedikoglu G, et al. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett.* 1997;416:286–90.
  28. Sarmiento-Ribeiro AB, Proença MT, Sousa I, Pereira A, Guedes F, Teixeira A, et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leuk Res.* 2012;36:1041–8.
  29. Naz A, Shamsi TS, Sattar A, Mahboob T. Oxidative stress and total antioxidant status in acute leukemia at diagnosis and post remission induction phase. *Pak J Pharm Sci.* 2013;26(6):1123–30.
  30. El-Sabagh ME, Ramadan KS, El-slam IMA, Ibrahim AM. Antioxidants Status in Acute Lymphoblastic Leukemic Patients. *Am J Med Med Sci [Internet].* 2011;1(1):1–6. Available from: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajmms.20110101.01.html>
  31. Ozcicek A, Cetin N, Keskin Cimen F, Tumkaya L, Malkoc I, Gulaboglu M, et al. The Impact of Resveratrol on Oxidative Stress Induced by Methotrexate in Rat Ileum Tissue: Evaluation of

- Biochemical and Histopathological Features and Analysis of Gene Expression. *Med Princ Pract*. 2016; 25(2): 181 – 6.
32. Li N, Lu X, Zhao X, Xiang F-L, Xenocostas A, Karmazyn M, et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells*. 2009; 27(4): 961–70.
  33. Reddy MM, Fernandes MS, Salgia R, Levine RL, Griffin JD, Sattler M. NADPH Oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia*. 2011; 25(2): 281 – 289.
  34. Oh J, Lee DY, Wagers A. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014; 20(8): 870-880.
  35. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011;9(4):298–310. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.010>
  36. Norifumi Urao and Masuko Ushio-Fukai. Redox Regulation of Stem/Progenitor Cells and Bone Marrow Niche. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014;54:26–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637653/pdf/nihms-415447.pdf>
  37. Yun J, Rocic P, Pung YF, Belrnadani S, Carrao ACR, Ohanyan V, et al. Redox-Dependent Mechanisms in Coronary Colateral Growth: The “Redox Window” Hypothesis. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(8): 1961-1974.
  38. Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D. Detection of Minimal residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B* 2013; 84B: 359-369.

### 3 CONCLUSÃO

Embora a formação de espécies radicalares ocorra de forma fisiológica, durante um desequilíbrio redox pode ocorrer o estresse oxidativo. A presença desta condição em indivíduos com LLA-B seja pela doença *per si* ou agravada pelo tratamento foi comparada pela primeira vez em nível sistêmico e no microambiente tumoral na medula. O fato de níveis maiores de lipoperoxidação encontrados na medula em comparação ao sangue periférico ao diagnóstico durante diferentes fases do tratamento e na vigência da doença residual mínima talvez possa nos indicar uma nova abordagem terapêutica futura. Novos estudos deverão ser realizados para averiguar se a redução no nível de estresse oxidativo em nível medular em pacientes com LLA possa apresentar um melhor prognóstico.

## REFERÊNCIAS

- BARRERA, G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. **ISRN oncology**, v. 2012, p. 137289, 2012.
- BATTISTI, V. et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 511–518, 2008.
- CAVALCANTE, A.G.M; BRUIM, P.F.C. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. **J. Bras. Pneumol.** 35(12), p. 1227-1237, 2009.
- CHAO, M.-W. et al. The synergic effect of vincristine and vorinostat in leukemia in vitro and in vivo. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 8, n. 1, p. 82, 2015.
- COLLADO, R. et al. Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. **Cancer Letters**, v. 317, n. 2, p. 144–149, 2012.
- DESHPANDE, A. J. et al. Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALM/AF10-positive leukemia. **Cancer Cell**, v. 10, n. 5, p. 363–374, 2006.
- ER, T.-K. et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. **Clinical biochemistry**, v. 40, p. 1015–1019, 2007.
- FLECHA, B.G.; ILESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p. 93-100, 1991.
- GAROFOLLO, A. Implicações do estresse oxidativo em crianças com câncer. **Pediatria Moderna**. V. 39, p. 132-138, 2003. Disponível em: <  
[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=2320](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2320)
- GOTO, H; et al. Lack of mitochondrial depolarization by oxidative stress is associated with resistance to buthionine sulfoximine in acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia Research**. V. 31, p. 1293-1301, 2007.
- GREAVES, M. et al. Leukemia in twins: lessons in natural history. **Blood**. V. 102, p. 2321-2333, 2003.
- GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature**. V. 6, p. 193-203, 2006.
- GBTLI LLA-1999, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.
- GBTLI LLA-2009, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.
- HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de**

**pediatria**, v. 84, p. S52–S57, 2008.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, v. nov/dez, p. 20–23, 2012.

HENRIKSEN, L. et al. Peg- Asparaginase Allergy in children with acute lymphoblastic leukemia in the NOPHO ALL 2008 protocol. **Pediatr Blood Cancer**. V. 62, p. 427-433, 2015.

HONG, D. et al., Initiating and Cancer-Propagating Cells in TEL-AML1- Associated Childhood Leukemia. **Science**. V. 319, p. 336, 2008.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI (eds) *Methods in Enzymology*. California: **Academic Press**. p. 380-82, 1994.

KANTARJIAN, H. et al. Long- term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. **Cancer**. V.101. p. 2788-801, 2004.

LEITE, E. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** v.7, n. 4, p. 413-421, 2007.

MATLOUB, Y. et al. Outcome of Children with Standard-Risk T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia-Comparison among Different Treatment Strategies. **Pediatr Blood Cancer**. V. 63, p. 255-261, 2015.

NATHAN, C., BUSSEL, A.C. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Immunology**. V. 13, p.349, 2003.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A., García-benayas, C., Arenas, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem**. V.44, p.679-681, 1998.

ORTEGA, J. A. et al. L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **Cancer Res**, v. 37, n. 2, p. 535–540, 1977.

PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**. V.33, p.89-97, 2012.

PEI, S.; JORDAN, C.T. How close are we to targeting the leukemia stem cell. **Best Practice & Research Clinical Haematology** v. 25, p. 415–418, 2012.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin. Chim. Acta**. V. 255, p.107-117, 1996.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

SANTOS, MA et al. DNA-damage-induced differentiation of leukaemic cells as an anti-cancer barrier. **Nature**. v. 27, 2014.

SILVA, Bárbara et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quím. Nova**, vol. 32, N.2, p. 453-462, Rio de Janeiro, 2009.

SILVEIRA, A. B. et al. PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13105–13118, 2015.

SILVERMAN, J. A.; REYNOLDS, L.; DEITCHER, S. R. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Vincristine Sulfate Liposome Injection (VSLI) in adults with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 11, p. 1139–1145, 2013.

SOOSAY RAJ, T. A.; SMITH, A. M.; MOORE, A. S. Vincristine sulfate liposomal injection for acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4361–4369, 2013.

SOUZA, A. et al . Leucemia mieloide crônica. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo , v. 59, n. 3, p. 220-232, June 2013 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302013000300006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302013000300006&lng=en&nrm=iso)>. access on 18 Jan. 2016.

TAYLAN, E.; RESMI, H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulfhydryl Measurement in Biological Samples. **Turk. J. Biochem**. V.35, n. 3, p. 275-278, 2010.

VENDRAMI-COLONI, C. Alterações cromossômicas e frequência do rearranjo gênico BCR/ABL ao diagnóstico, tratamento com mesilato de imatinibe e após transplante de medula óssea em leucemia mielóide crônica. **Rev. Bras. Hematol. e Hemoter**. V. 28, n.1, p.79-80, 2006.

YAMAMOTO, M.; FIGUEIREDO, V. L. P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 4, p. 229–232, 2005.

ZHOU, F. et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. **Leukemia Research**, v. 31, p. 387–393, 2007.

# Anexos

## 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### **Título da pesquisa:**

“Investigação dos mecanismos oxidativos potencialmente associados à resposta ao tratamento quimioterápico da leucemia linfocítica aguda (LLA)”

Prezados pacientes, Pais e/ou Responsáveis:

Gostaríamos de convidar seu filho(a) a participar da pesquisa “Investigação dos mecanismos oxidativos potencialmente associados à resposta ao tratamento quimioterápico da leucemia linfocítica aguda (LLA)”, realizada no **Hospital Universitário de Londrina e Hospital do Cancer de Londrina**. O objetivo da pesquisa é melhorar a compreensão sobre a doença Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e definir o modo de funcionamento da célula leucêmica, assim permitindo o desenvolvimento de novas terapias futuras e melhorando o acompanhamento dos pacientes.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação e a do seu filho(a) é totalmente voluntária, e que sua decisão em participar ou não do estudo não vai interferir com a qualidade do tratamento que seu filho(a) receberá nestas Instituições. Caso aceite participar, você poderá ainda desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa ou a seu filho(a).

A participação do seu (sua) filho(a) é muito importante e ela se daria da seguinte forma: a cada coleta de sangue e/ou medula óssea para acompanhamento rotineiro da criança (ou seja, que seria realizada para o acompanhamento clínico de qualquer maneira), um tubo extra de sangue ou medula óssea seria coletado, portanto sem expor a criança a coletas adicionais àquelas já necessárias para o tratamento da Leucemia. Os riscos associados à coleta de sangue (hematoma, sangramento, infecção, punção arterial, trombose) ou medula óssea (sangramento, dor) são os mesmos com ou sem a participação no estudo, portanto sem gerar riscos adicionais. Além disso, o prontuário da criança seria estudado para as análises do estudo. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são uma melhor compreensão da LLA infantil e contribuição no seu diagnóstico, tratamento e seguimento.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar ( **Dr Fausto Celso Trigo, Departamento de Clínica Médica (Setor de Hematologia) do Hospital Universitário de Londrina, localizado à Avenida Robert Koch 60; Telefone 3371-2750 e e-mail faustotrig@gmail.com**), ou procurar o Comitê de Ética

em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Koch, nº 60, no telefone 33712490 ou por e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida, assinada e entregue ao(a) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

**Pesquisador Responsável**

**Dr Fausto Celso Trigo**

RG: 18164943-3 SSP

Eu, \_\_\_\_\_ (pai, mãe ou responsável), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo que meu filho (a) \_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de pesquisa) participe **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica) do participante (menor de idade)

\_\_\_\_\_

Assinatura (ou impressão dactiloscópica) do pai/mãe ou responsável

\_\_\_\_\_

Data \_\_/\_\_/\_\_\_\_



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina  
 Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	245/2013
CAAE:	24498213.0.0000.5231
Data da Relatoria:	13/12/2013
Pesquisador(a):	Fausto Celso Trigo
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

**"Investigação dos mecanismos oxidativos potencialmente associados à resposta ao tratamento quimioterápico da leucemia linfocítica aguda (LLA)"**

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 13 de dezembro de 2013.

**Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  
 Universidade Estadual de Londrina

