

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

**ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA
ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)**

Dissertação de Mestrado

Vanessa Battisti

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)**

por

Vanessa Battisti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como
requisito parcial
para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Vera Maria Morsch

Santa Maria RS Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Elaborada por
Vanessa Battisti

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Vera Maria Morsch
(Presidente/Orientador)

Dra. Dominguita Lühers Graça (UFSM)

Dra. Vânia Lúcia Loro (UFSM)

Santa Maria, 28 de janeiro de 2008.

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”
(Martin Luther King Jr.)

Dedicatória

**Essa dissertação é dedicada aos meus queridos pais Ireno e Terezinha Battisti
pelo apoio, incentivo e amor incondicional.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, por tudo de bom que eu tenho e pelas oportunidades que Ele colocou em meu caminho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma cooperaram para que este trabalho fosse possível e se consolidasse.

Aos meus pais, Ireno e Terezinha Battisti pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos. A força e incentivo de vocês foram fundamentais para que eu conseguisse vencer mais esta etapa.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos Plínio e Gerson, pelos conselhos e por sempre torcerem por mim.

Agradeço de maneira especial ao meu noivo Cleverson que soube me entender e me apoiar em todos os momentos. Obrigado por todo o amor, carinho, compreensão, esforços, paciência, sacrifícios e renúncias. Amo muito você!

A minha orientadora, Vera Maria Morsch, pela oportunidade de aprendizado, pela paciência, dedicação e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de perseverança, determinação e garra e por sempre me apoiar e estimular meu crescimento profissional. Agradeço também a minha co-orientadora, Maria Rosa Schetinger, por ter aberto as portas da bioquímica para mim e ter participado dessa trajetória.

A todos os amigos do laboratório 2208, pela amizade, pelo apoio, pela ajuda, por tudo! Margarete, Rosélia, Maísa, Paula, Roberta e a todos os outros, muito obrigada!

Sou muito grata à minha amiga e IC Liési pela amizade, dedicação e eficiência na realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial a minha “mana” Karen e a Maria do Carmo, duas amigas e colegas que foram essenciais para que esse trabalho se concretizasse.

Agradeço também aos amigos do laboratório de hematologia-oncologia do HUSM, em especial a Alice.

As professoras Dominguita Graça e Vânia Lúcia Loro por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores do curso, a UFSM, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica e ao CNPq.

Minha sincera homenagem e agradecimento às crianças com LLA que participaram desse estudo. Jamais esquecerei do exemplo destas crianças que apesar das dificuldades lutam pela vida com uma força e vontade de viver grandiosas.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO E ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)

Autora: Vanessa Battisti
Orientadora: Vera Maria Morsch
Co – Orientadora: Maria Rosa Schetinger
Data e local de Defesa: Santa Maria, 28 de Janeiro de 2008.

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância e é caracterizado por uma proliferação descontrolada de células linfóides imaturas (linfoblastos) na medula óssea. Na LLA há uma produção elevada de espécies reativas e estudos relatam que o estresse oxidativo está envolvido na patogenia desta doença. Além disso, a enzima acetilcolinesterase (AChE) presente no sangue e no plasma, inclusive nos linfócitos, desempenha funções não colinérgicas e parece estar envolvida na regulação da função imune e no desenvolvimento do câncer. Levando em consideração tais afirmativas, este trabalho investigou o perfil oxidativo e a atividade da enzima AChE em pacientes com LLA. Participaram do estudo 82 pacientes com LLA e 50 indivíduos controles. Os pacientes foram divididos em 4 grupos: recém diagnosticado (RD), indução da remissão (IR), manutenção da remissão (MR) e fora de tratamento (FT). Para avaliação do perfil oxidativo, determinou-se a atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) em sangue total, os níveis de tióis não protéicos (NPSH) em plasma e eritrócitos, bem como, a concentração de vitamina E, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o conteúdo de proteína carbonil em amostras de soro da população estudada. Os marcadores de danos oxidativos em lipídeos e proteínas, representados pelos níveis de MDA e conteúdo de proteína carbonil mostraram-se elevados nos pacientes quando comparados ao grupo controle. Em relação aos antioxidantes enzimáticos, representados pelas enzimas SOD e CAT, observou-se uma diminuição nas atividades das mesmas nos pacientes com LLA nos grupos RD, IR e MR voltando ao normal no grupo FT. Os antioxidantes não enzimáticos analisados (NPSH em plasma e vitamina E) também se mostraram diminuídos nos pacientes em relação aos controles. Nenhuma diferença nos níveis de NPSH em eritrócitos foi encontrada entre o grupo RD e o grupo controle. Em relação à atividade da AChE, observou-se um aumento nos pacientes do grupo RD em relação aos demais grupos tanto em sangue total quanto em linfócitos. Já, nos grupos IR e MR a atividade da enzima encontrou-se diminuída em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa na atividade da AChE entre o grupo FT e o grupo controle. Os resultados sugerem que na LLA, ocorre acumulação excessiva de espécies reativas levando a depleção ou disfunção das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não enzimáticas. Os resultados também revelaram que a atividade da AChE está modificada na LLA, o que pode sugerir o envolvimento desta enzima na modulação da função imune e no desenvolvimento do câncer. Conclui-se então que na LLA ocorrem mudanças sistêmicas, as quais podem ser detectadas pela medida de marcadores periféricos do estresse oxidativo e pela atividade da AChE em linfócitos e sangue total.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda, estresse oxidativo, acetilcolinesterase, linfócito

ABSTRACT

Master Dissertation
Toxicological Biochemistry Graduate Program
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

STUDY OF OXIDATIVE PROFILE AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA.

Author: Vanessa Battisti

Adviser: Vera Maria Morsch

Co-adviser: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Date and place of the defense: Santa Maria, January 28 nd, 2008.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer found in the pediatric population and is characterized by uncontrolled proliferation and maturation arrest of lymphoid progenitor cells (lymphoblasts) in the bone marrow. In ALL occurs an increase in the production of reactive species and studies show the involvement of oxidative stress in ALL pathogenesis. Moreover acetylcholinesterase (AChE) present in blood and plasma and also in lymphocytes is well established as having non-cholinergic functions including development of cancer and its contribution to the regulation of immune function. Considering such statements, it was investigated the oxidative profile and AChE activity in ALL patients. Eighty two ALL patients and 50 healthy subjects participated in this study. Patients were divided into 4 groups: newly diagnosed (ND) remission induction (RI), remission maintenance (RM) and out-of-treatment (OT). For evaluation of the oxidative profile, we determined the catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in blood, thiols non protein (NPSH) in plasma and erythrocytes, as well as, vitamin E, TBARS and protein carbonyl content from serum samples. Damage markers in lipids and proteins, represented by MDA levels and protein carbonylation content respectively, showed increased levels in patients when compared with the control group. In relation to enzymatic defense, represented by the enzymes SOD and CAT, it was observed a decrease in the activities in ALL patients in groups RD, RI and RM, coming back to the normal in OT group. Non enzymatic defense (NPSH in plasma and vitamin E) analyzed also revealed decrease in ALL patients in relation to the controls. No significant difference in NPSH levels was observed between RD group and control group. In relation to AChE activity, in both total blood and lymphocytes, was observed an increase in the RD group in relation to the other groups. On the other hand, in RI and RM the enzyme activity was diminished in relation to control group. No significant difference was observed in AChE activity between FT group and the control group. The results suggest that in ALL an excessive accumulation of reactive species contributes to an antioxidant depletion and dysfunction. The results had also disclosed that the AChE activity is modified in ALL, what can suggest the involvement of this enzyme in the modulation of immune function and in cancer development. The ALL results in a systemic disorder that induces changes, which can be detected by measuring the peripheral markers of oxidative stress and AChE activity in whole blood and lymphocytes.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, oxidative stress, lymphocyte, acetylcholinesterase

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA:

Tabela 1 - Esquema das fases de tratamento da LLA (GBTLI LLA-99)..... 25

MANUSCRITO I:

Table 1: General characteristics of patients..... 75

MANUSCRITO II:

Table 1: General characteristics of patients..... 104

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Células linfóides imaturas em sangue periférico. | 23 |
| Figura 2 - Fatores genéticos e exposição ambiental associados ao risco de LLA.... | 26 |
| Figura 3 - Imagem de um linfócito feita a partir de um microscópio eletrônico. | 26 |
| Figura 4 - Diferenciação das células sanguíneas | 27 |
| Figura 5 - Dano oxidativo às macromoléculas biológicas | 30 |
| Figura 6 - Nível de efeitos carcinogênicos <i>versus</i> nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese..... | 31 |
| Figura 7 - Mecanismo enzimático antioxidante..... | 34 |
| Figura 8 - Papel da GSH na oxidação de grupos sulfidril da das proteínas..... | 37 |
| Figura 9 - Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio ... | 38 |
| Figura 10 - Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina | 39 |
| Figura 11 – Sistema colinérgico | 40 |
| Figura 12 - Isoformas da enzima AChE..... | 42 |
| Figura 13 - Frações moleculares da AChE nas células sanguíneas | 43 |
| Figura 14 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica | 44 |
| Figura 15 - Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS)..... | 45 |
| Figura 16 - Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE..... | 45 |
| Figura 17 - Reação de hidrólise da ACh catalisada pela AChE..... | 46 |
| Figura 18 – Sistema colinérgico linfocítico..... | 48 |

MANUSCRITO I

Figure 1 - Protein carbonylation content in serum of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=18), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).....77

Figure 2 - TBARS levels in plasma of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=20), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=22) groups. Controls consisted of 44 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).....78

Figure 3 - CAT activity in total blood of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=20), remission maintenance (RM, n=22) and out-of-treatment (OT, n=17) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).....79

Figure 4 - SOD activity in total blood of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=18), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).....80

Figure 5 - Non-protein thiol levels in plasma of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=19), remission maintenance (RM, n=24) and out-of-treatment (OT, n=21) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).....81

Figure 6 - Non-protein thiol levels in erythrocytes of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=8), remission induction (RI, n=17), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=23) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple

range test: groups that show different letters are statistically different (p<0.05).....82

Figure 7 - Vitamin E content in serum of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=17), remission maintenance (RM, n=20) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean ± S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different (p<0.05).....83

MANUSCRITO II

Figure 1 - Total blood AChE activity in ALL patients. Patients were divided into: newly diagnosed (ND, n=12), remission induction (RI, n=15), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean ± S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different (p<0.05).....106

Figure 2 - Lymphocyte AChE activity in ALL patients. Patients were divided into: newly diagnosed (ND, n=12), remission induction (RI, n=15), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean ± S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different (p<0.05).....106

Figure 3 - Total blood AChE activity in the presence of different concentrations of cytarabine. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean ± S.E. (p < 0.05).....107

Figure 4 - Lymphocyte AChE activity in the presence of different concentrations of cytarabine. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean ± S.E. (p < 0.05).....107

Figure 5 - Total blood AChE activity in the presence of different concentrations of methotrexate. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean ± S.E. (p < 0.05).....108

Figure 6 - Lymphocyte AChE activity in the presence of different concentrations of methotrexate. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean \pm S.E. ($p < 0.05$).....108

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AChRs – Receptores de acetilcolina
AR – Alto risco
BChE – Butirilcolinesterase
CAT – Catalase
ChAT – Acetiltransferase
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FT – Fora de tratamento
GBTLI – Grupo brasileiro de tratamento da leucemia infantil
GSH – Glutathiona reduzida
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IL - 2 – Interleucina-2
IL - 4 – Interleucina-4
IL - 5 – Interleucina-5
IL - 6 – Interleucina-6
IL - 10 – Interleucina-10
INF - γ - Interferon - γ
IR – Indução da remissão
LLA – Leucemia linfoblástica aguda
MDA – Malondialdeído
MR – Manutenção da remissão
NPSH – Tióis não protéicos
RB – Risco baixo
RD – Recém diagnosticado
RO₂[·] – Radical peroxila
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
Th1 – Linfócito CD4+ T helper 1
Th2 – Linfócito CD4+ T helper 2

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMENTOS | 6 |
| RESUMO | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 10 |
| SUMÁRIO | 16 |
| APRESENTAÇÃO | 18 |
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 Objetivos | 22 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) | 23 |
| 2.1.1 Diagnóstico e estadiamento..... | 24 |
| 2.1.2 Prognóstico e tratamento | 24 |
| 2.1.3 Etiopatologia | 25 |
| 2.2 Linfócitos | 26 |
| 2.2.1 Origem e diferenciação | 27 |
| 2.2.2 Funções e subpopulações | 28 |
| 2.3 Radicais livres | 29 |
| 2.4 Estresse Oxidativo | 29 |
| 2.4.1 Estresse oxidativo versus câncer..... | 30 |
| 2.4.2 Indicadores pró-oxidantes..... | 31 |
| 2.4.2.1 Lipoperoxidação | 31 |
| 2.4.2.2 Oxidação protéica | 32 |
| 2.4.3 Mecanismos antioxidantes..... | 33 |
| 2.4.3.1 Antioxidantes enzimáticos..... | 34 |
| 2.4.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos..... | 36 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 2.5 | Sistema Colinérgico | 39 |
| 2.5.1 | Colinesterases | 41 |
| 2.5.2 | Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7; AchE) | 41 |
| 2.5.3 | Estrutura da acetilcolinesterase | 42 |
| 2.5.4 | Mecanismo catalítico..... | 43 |
| 2.5.5 | Sistema colinérgico extra-neural | 46 |
| 2.5.6 | Sistema colinérgico e sua relação com o sistema imune..... | 47 |
| 2.5.7 | Sistema colinérgico versus câncer..... | 48 |
| 2.5.8 | Acetilcolinesterase versus drogas antineoplásicas | 49 |
| 3 | MANUSCRITOS | 50 |
| 3.1 | Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients | 51 |
| | Abstract..... | 52 |
| 1. | Introduction..... | 53 |
| 2. | Methods..... | 55 |
| 3. | Results..... | 61 |
| 4. | Discussion | 63 |
| 5. | Acknowledgement | 68 |
| 6. | References | 69 |
| 3.2 | Changes in Acetylcholinesterase (AchE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. | 86 |
| | Abstract..... | 87 |
| 1. | Introduction | 88 |
| 2. | Materials and methods..... | 90 |
| 3. | Results | 94 |
| 4. | Discussion..... | 96 |
| | Acknowledgement..... | 99 |
| | References..... | 99 |
| 4 | DISCUSSÃO | 110 |
| 5 | CONCLUSÃO | 114 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 115 |
| 7 | ANEXOS | 127 |

Apresentação

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscritos, os quais foram escritos seguindo-se as normas dos periódicos aos quais os mesmos foram submetidos à publicação. Os itens discussão e conclusões, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes a ambos os manuscritos. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia que pode ser caracterizada pelo desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. O processo de carcinogênese consiste de múltiplos e distintos estágios, dentre eles a iniciação, a promoção e a progressão tumoral, cada um caracterizado por diferentes mecanismos (Valko et al., 2006).

Devido à grande incidência e importância das leucemias, esta patologia tem sido alvo de estudo em nosso laboratório de pesquisa (Zanin, 2006; Morsch, 2006). A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo mais comum de câncer encontrado na população pediátrica, assumindo uma proporção de mais de 50% das malignidades nessa faixa etária. A LLA é uma desordem maligna resultante da proliferação clonal de precursores linfocíticos, chamados blastos (Plasschaert et al., 2004).

Diferentes linhagens de células linfóides podem originar a LLA, que pode ser dividida em leucemia de células linfóides B e de células T, (Mobasheri et al., 2006), sendo a primeira a mais comum. O diagnóstico precoce da LLA é importante para instituir o tratamento apropriado e obter a remissão completa. O tratamento e acompanhamento constituem-se de três fases: Indução, Manutenção e Acompanhamento Pós-Tratamento. Nas duas primeiras fases, é instituída uma abordagem quimioterápica, segundo protocolo padronizado pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI LLA-99) e na terceira fase os pacientes são acompanhados periodicamente por até 10 anos a fim de excluir uma possível recidiva (Gaynon, 2005).

Vários estudos, incluindo trabalhos realizados em nosso laboratório, evidenciam o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento do câncer (Toyokumi et al., 1995; Maldonado et al., 2006). O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo. As EROs podem agir na iniciação, na promoção e na progressão, ou seja, nos três estágios do desenvolvimento do câncer. Além disso, vários mecanismos que conduzem ao estresse oxidativo foram propostos em pacientes com câncer. Dentre eles encontramos alterações no metabolismo energético (Bakan et al., 2003), a inflamação crônica não-específica

(Mantovani et al., 1998) e por fim o uso de drogas antineoplásicas (Bakan et al., 2003).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das mesmas (Beckman e Ames, 1998). A carbonilação de proteínas é outro exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres (Tian et al. 1998).

Contudo, o estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante enzimático, representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Bonney et al., 2002). A detoxificação das EROs envolve um mecanismo de elevada sincronia e as enzimas antioxidantes atuam de maneira cooperativa. Cabe à SOD a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT.

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não enzimáticos. Sabe-se que o organismo tem a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (Halliwell e Gutteridge, 2000). Dentre estes antioxidantes pode-se citar as vitaminas E e os compostos orgânicos contendo grupos sulfidríla, denominados tióis. A glutathiona reduzida (GSH) é um tiol de baixo peso molecular que se encontra no interior celular, sendo um tripeptídeo importante na proteção contra o dano oxidativo. Os tocoferóis ou vitamina E são varredores de radicais peroxil, sendo, portanto, os inibidores mais importantes da peroxidação lipídica em animais. Devido às suas propriedades antioxidantes, acredita-se que possa prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo, dentre elas o câncer (Brigelius-Flohe et al., 2002).

Por outro lado, um dos responsáveis pela regulação da função, diferenciação e ativação dos linfócitos é o sistema colinérgico extraneural presente na membrana e no citoplasma destas células (Wessler e Kirkpatrick, 2001). A acetilcolina (ACh) sintetizada pelos linfócitos pode ter ação imunomoduladora via receptores muscarínicos e nicotínicos (Kawashima e Fujii, 2000).

A ACh é rapidamente hidrolisada e inativada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (Soreq e Seidman, 2001). Considerando que a interação da ACh com o seu

receptor vai depender da eficiência catalítica da AChE, a atividade desta enzima pode ser usada como um índice da função colinérgica, já que mudanças na sua atividade podem indicar alterações na disponibilidade de ACh em nível de receptor (Benedito, 1997).

Embora o papel do sistema colinérgico nos linfócitos ainda não esteja bem estabelecido, a demonstração da existência de marcadores colinérgicos em linfócitos T e B pode contribuir para avaliar a importância do sistema colinérgico como um possível regulador da função imune (Tayebati et al., 2002).

Levando em consideração o exposto acima e a alta incidência da LLA em crianças, torna-se importante avaliar o perfil de estresse oxidativo através do estudo do sistema oxidante e antioxidante, bem como, analisar a atividade da enzima AChE em linfócitos e sangue total de pacientes com diagnóstico desta doença.

1.1 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivos:

Objetivo Geral:

Analisar os indicadores de estresse oxidativo e as defesas antioxidantes, além de determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase em linfócitos e sangue total de pacientes controles e pacientes com LLA provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria.

Objetivos Específicos:

- Analisar a intensidade das lesões biológicas causadas pelos radicais livres através da dosagem de TBARS em plasma e da determinação da carbonilação protéica em soro.
- Avaliar o estado das defesas antioxidantes enzimáticas através da determinação das enzimas CAT e SOD em sangue total de pacientes com LLA e de pacientes controles.
- Avaliar o estado das defesas antioxidantes não enzimáticas através da determinação dos níveis de tióis não-protéicos em plasma e eritrócitos e Vitamina E em soro de pacientes com LLA e de pacientes controles.
- Verificar a atividade da enzima AChE em linfócitos e em sangue total de pacientes com LLA e em pacientes controles.
- Verificar uma possível interferência de alguns medicamentos utilizados na quimioterapia na atividade da AChE através de testes *“in vitro”*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

As leucemias são originadas das células hematopoiéticas multipotentes (stem cells) que perderam a sua capacidade de se diferenciar normalmente em células maduras (Molica et al., 2004). Embora possa ocorrer em crianças e adultos, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) tem uma maior prevalência na faixa etária de 2-18 anos (70%), sendo essa doença o tipo mais comum de câncer encontrado na população pediátrica, assumindo uma proporção de mais de 50% das malignidades hematopoiéticas nessa faixa etária.

A LLA resulta da proliferação de células linfóides imaturas, os linfoblastos, que invadem a medula óssea, o sangue periférico e outros órgãos (Figura 1). Esta doença pode ser do tipo B ou T. A leucemia do tipo B corresponde ao tipo mais comum entre os pacientes (80%), enquanto aproximadamente 15% dos casos consistem em leucemias do tipo T (Sinnott et al., 2006).

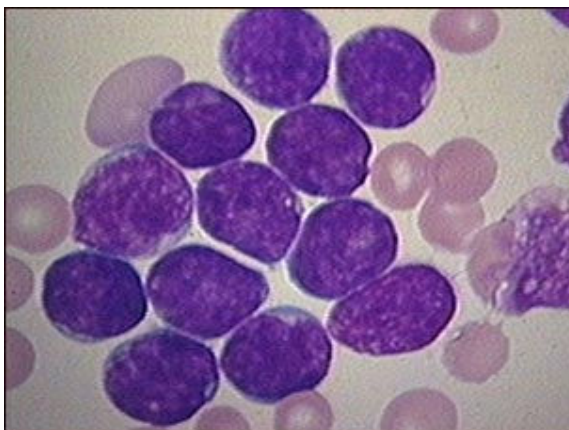


Figura 1 - Células linfóides imaturas em sangue periférico.

(www.clinicalili.org/.../imagenes/15mar2004.jpg)

Na LLA, assim como em outros tumores malignos, existe um desequilíbrio entre os processos de apoptose e de proliferação celular, havendo uma maior sobrevivência das células clonais malignas, além de um aumento na suas taxas de

proliferação (Schuler and Szende, 2004; Lin et al., 2002). Na LLA é bastante freqüente um quadro de infecções recorrentes devido à imunossupressão induzida pelo tratamento quimioterápico a que esses pacientes são submetidos (Mazur et al., 2006) e às anormalidades funcionais apresentadas pelos linfócitos T e B destes pacientes (Zhang et al., 1997; Yotnda et al., 1999).

2.1.1 Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico da LLA é feito através dos achados clínico-laboratoriais, que incluem hemograma, imunofenotipagem, mielograma, biologia molecular, reações citoquímicas e o exame físico (Lorenzi, 2003).

Os resultados dos exames clínico-laboratoriais são utilizados como base para estabelecer o prognóstico da doença, classificando o paciente nos grupos: baixo risco de recaída (RB) ou alto risco de recaída (AR), o que definirá o esquema de tratamento a ser seguido.

2.1.2 Prognóstico e tratamento

A LLA possui prognóstico diferenciado dependendo da faixa etária do paciente. Crianças acometidas possuem melhor prognóstico, sendo que mais de 95% destes pacientes alcançam a remissão total e a taxa de sobrevivência é de aproximadamente 80% com adequado tratamento quimioterápico. Já para adultos, 75-89% alcançam a remissão total, enquanto que a taxa de sobrevivência é de 28-39% (Plasschaert et al., 2004; Bhatia, 2003).

O esquema de tratamento quimioterápico consiste basicamente nas fases de indução e de manutenção da remissão. Após estas fases, o paciente é acompanhado por um período longo (podendo chegar a 10 anos) em que são feitos exames clínicos laboratoriais a fim de excluir uma possível recidiva da doença. O esquema de tratamento quimioterápico varia conforme o grupo de risco de recaída em que o paciente está enquadrado (Tabela 1).

Tabela 1 - Esquema das fases de tratamento da LLA (GBTLI LLA-99)

| Fase | Tempo (semanas) | |
|------------|------------------|-----------------|
| | Baixo-risco (RB) | Alto-risco (AR) |
| Indução | 0-21 | 0-33 |
| Manutenção | 22-106 | 34-111 |

2.1.3 Etiologia

A etiologia da LLA é desconhecida. Existem, no entanto, associações importantes: A LLA é mais freqüente em certas doenças hereditárias, como na síndrome de Down, sendo decorrente das interações entre fatores genéticos e ambientais (Davies e Ross, 1999). Estudos têm sugerido que tanto a exposição pré-natal quanto pós-natal aos fatores ambientais podem ser importantes no desenvolvimento da LLA (Figura 2). Alguns fatores de risco têm sido apontados por desencadear a transformação maligna das células precursoras linfóides, como mutações genéticas (translocações são bastante comuns), infecções virais, radiações ionizantes, agentes quimioterápicos, exposição ao benzeno, entre outros (Lorenzi, 2003; Viele, 2003).

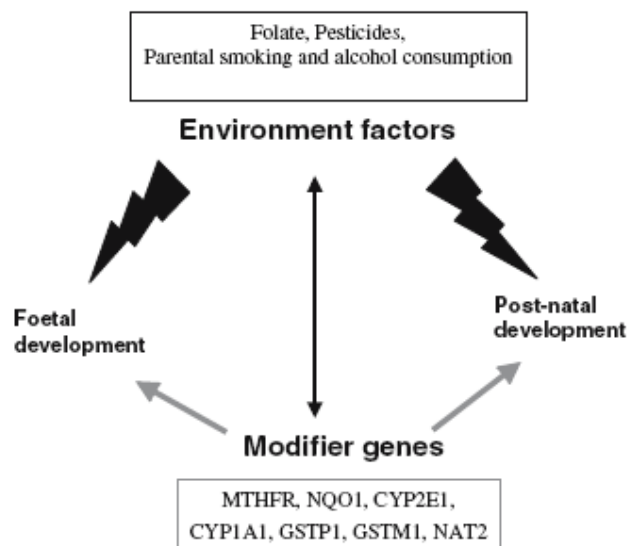


Figura 2 - Fatores genéticos e exposição ambiental associados ao risco de LLA.
(adaptado de Sinnott et al., 2006)

2.2 Linfócitos

Os linfócitos são leucócitos do tipo agranulócitos e constituem-se nas principais células envolvidas no reconhecimento e destruição de antígenos não-próprios ou prejudiciais ao organismo (Lorenzi, 2003) (Figura 3). Correspondem a cerca de 20 a 30% das células circulantes do sangue, porém estas quantidades variam em condições fisiológicas (como sexo e idade) e patológicas (como proliferações benignas e malignas).

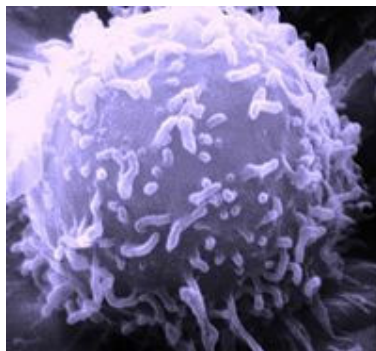


Figura 3 - Imagem de um linfócito feita a partir de um microscópio eletrônico de varredura (SEM).
(upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/...)

2.2.1 Origem e diferenciação

Um único precursor hematopoiético comum (célula tronco ou célula indiferenciada pluripotente) origina todas as células sanguíneas na medula-óssea. Os precursores passam pelos estágios intermediários de linfoblastos e pró-linfócitos até chegar a linfócito adulto. O processo de diferenciação é regulado de maneira complexa e dependente de fatores de crescimento e diferenciação específicos para cada linhagem linfocitária. É importante lembrar que falhas nesse mecanismo de regulação podem levar a desordens hematopoiéticas, como as linfoproliferações (incluindo a leucemia).

Após a diferenciação, ocorre o processo de maturação final dos linfócitos, que pode ocorrer na própria medula-óssea ou em outro tecido. Do ponto de vista fisiológico os linfócitos podem se diferenciar em 3 sub-populações: linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (Figura 4).

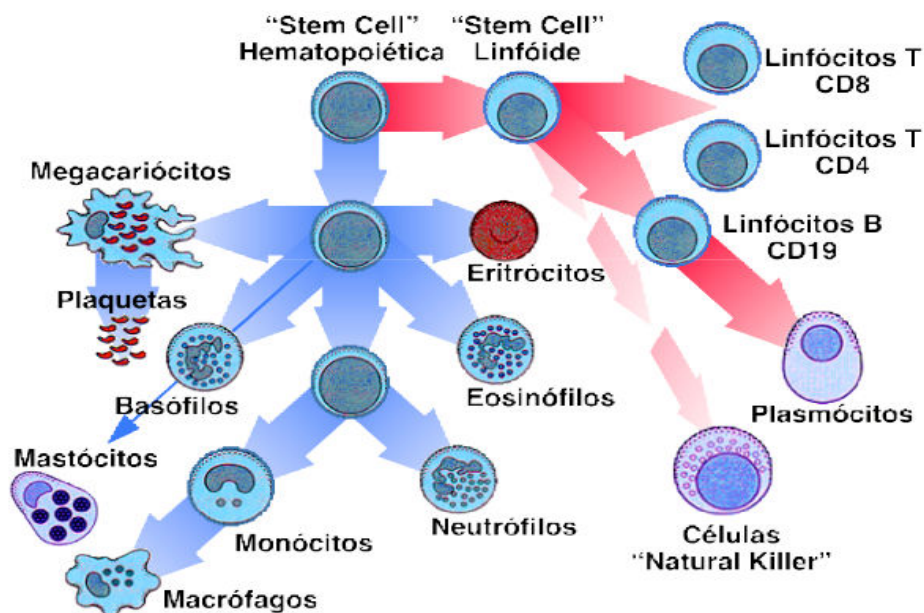


Figura 4 - Diferenciação das células sanguíneas

(<http://www.imunologia.uac.fmed.uc.pt/public/artigos/Respostalmunitaria.pdf>)

2.2.2 Funções e sub-populações

2.2.2.1 - Linfócitos T

As células T originam-se da medula, porém sua fase final de maturação ocorre no timo. Encarregados da imunidade mediada por células, atuam em sincronia com os linfócitos B e possuem funções efetoras e reguladoras da resposta imune. As funções reguladoras são realizadas por células T auxiliares (CD4+). As células CD4+ podem ainda ser dos tipos Th1 e Th2 tendo por base o tipo de citocina que produzem. O CD4+ Th1 é responsável pela produção de IL-2, que atua na ativação de CD4+, CD8+ e INF- γ o qual ativa macrófagos. O CD4+ Th2 é responsável pela produção de IL-4 e IL-5, as quais induzem nas células B a produção de anticorpos, além de IL-6 e IL-10. Os linfócitos CD8+ possuem a potencialidade de desenvolver uma função efetora citotóxica, quando estimuladas por um antígeno ligam-se à célula alvo, induzindo lesões nas membranas que resultam na lise desta célula (Zago et al., 2004). Existem ainda os linfócitos T formadores de células de memória, que podem ficar em estado inativo durante muito tempo, mas respondem imediatamente frente a um segundo contato com o mesmo antígeno.

2.2.2.2 - Linfócitos B

Provêm de células linfocitárias que se diferenciam em linfócitos B na própria medula óssea. À semelhança dos linfócitos T, os B depois de amadurecerem passam à circulação e tecidos. São os responsáveis pela imunidade humoral, especialmente baseada na produção de anticorpos. Os linfócitos B possuem moléculas de imunoglobulinas inseridas na sua membrana plasmática que funcionam como receptores de antígenos específicos (Levinson e Jawetz, 1998). Quando ativadas pelos linfócitos CD4+ (Th2), produzem anticorpos (imunoglobulinas) contra antígenos específicos, ou transformam-se em células de memória, capazes de reconhecer especificamente o antígeno agressor, caso haja uma posterior exposição (Lorenzi, 2003).

2.2.2.3- Linfócitos NK

Possuem um processo de diferenciação pouco conhecido que os distingue dos demais linfócitos pelo seu grande poder citotóxico contra células tumorais ou outras células que contenham partículas virais, atuando sobre elas de modo rápido e sem necessidade de imunização prévia (Lorenzi, 2003).

2.3 Radicais livres

Um radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados tem uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa. Possuem uma enorme capacidade de combinar-se de maneira inespecífica com qualquer composto que esteja próximo deles, a fim de captar um elétron desse composto para sua estabilização, independente de ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo, a partir do que, acontecem reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, são denominados de substâncias oxidantes.

As espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes endógenas e exógenas. Dentre as fontes endógenas mais comuns estão a mitocôndria (no metabolismo oxidativo normal), os peroxissomos e o citocromo P-450. Já as principais fontes exógenas de radicais livres são as radiações, cigarro, solventes orgânicos, entre outros.

2.4 Estresse Oxidativo

Os radicais livres se formam em condições fisiológicas em proporções controladas por mecanismos de defesa celular. Porém, em condições patológicas, essa produção de radicais livres pode aumentar substancialmente.

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que ocorre uma diminuição nos níveis das defesas antioxidantes tanto enzimáticas quanto não-enzimáticas do organismo, uma elevada produção de espécies reativas ou uma combinação de ambos os fatores. Esse quadro de estresse oxidativo pode causar danos a todas as estruturas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas (Figura 5).

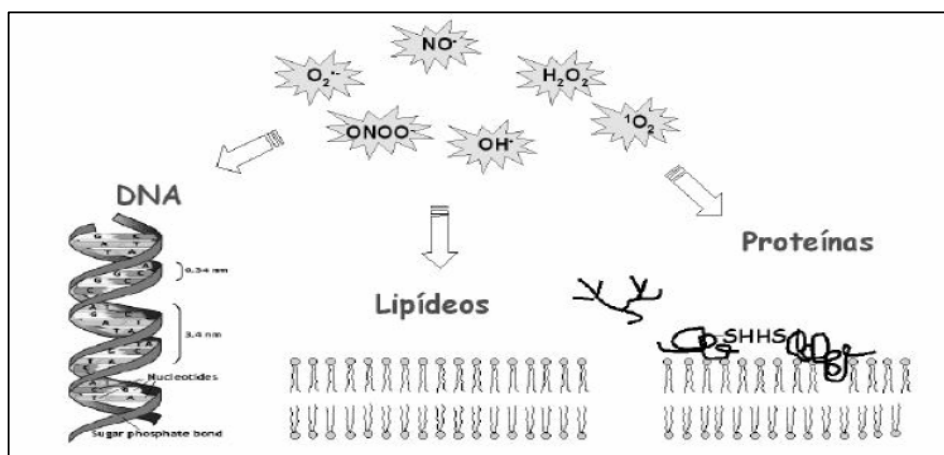


Figura 5 - Dano oxidativo às macromoléculas biológicas.
(adaptado de Torres, 2003)

Distúrbios do equilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas são importantes na patogênese de muitas doenças, como por exemplo, no câncer (Beckman & Ames, 1998).

2.4.1 Estresse oxidativo *versus* câncer

Um modelo geral de 3 estágios pode ser associado à carcinogênese: iniciação, promoção e progressão do tumor. Vários estudos mostram que o estresse oxidativo participa destes 3 processos (Klaunig e Kamendulis, 2004) (Figura 6).

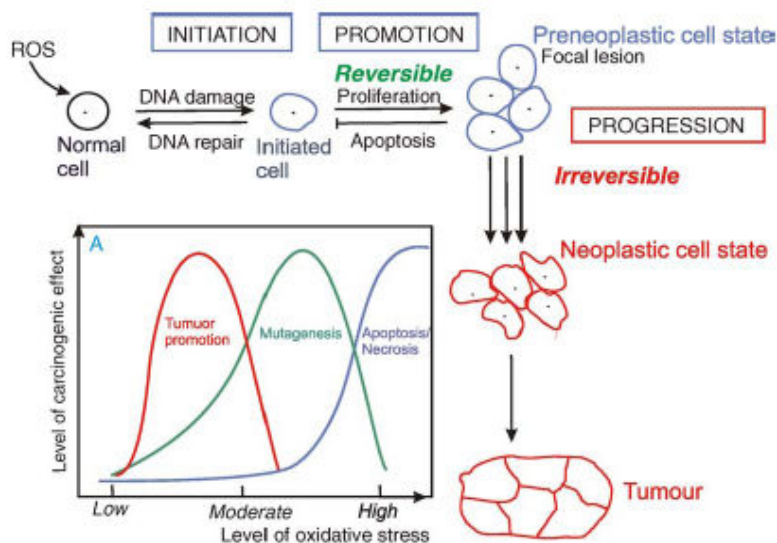


Figura 6 - Nível de efeitos carcinogênicos *versus* nível de radicais livres nos vários estágios do processo de carcinogênese (adaptado de Valko et al., 2006)

Ainda não está bem estabelecido se o estresse oxidativo verificado em células tumorais resulta de um aumento na produção de oxidantes ou de falhas nos mecanismos de defesa (Toyokuni et al., 1995). É importante lembrar, que as células tumorais estão freqüentemente em hipóxia (Oliveira e Alves, 2002), o que pode alterar a regulação de suas defesas antioxidantes.

2.4.2 Indicadores pró-oxidantes

2.4.2.1 Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello Filho et al., 1984). Um dos bem conhecidos produtos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA) (Zhou et al., 2006), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados; altos níveis de

MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da lipoperoxidação (Kashyap et al., 2005).

A peroxidação lipídica é o processo através do qual as EROs agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, deste modo, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares.

Este processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e dos gradientes iônicos transmembrana (Bezerra et al., 2004). Além disso, tem sido observada perda da seletividade na troca iônica, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos e até à morte celular.

Muitos trabalhos indicam um aumento nos níveis de peroxidação lipídica em pacientes com diversos tipos de câncer, incluindo nas leucemias. De acordo com Drabko et al. (2006) níveis elevados de MDA sérico foram detectados em pacientes com leucemia aguda. Além disso, em pacientes com leucemia linfocítica crônica também foram encontradas altas taxas de peroxidação lipídica (Oltra et al., 2001).

2.4.2.2 Oxidação protéica

As proteínas são moléculas biológicas alvos para a modificação oxidativa e danos causados pelas EROs. A exposição das proteínas ao ataque dos radicais livres resulta em múltiplas modificações nestas moléculas. Estas modificações incluem a oxidação dos grupos das cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e formação de novos grupos reativos (como os grupos carbonil). Além disso, este processo pode resultar na perda da estrutura ou atividade enzimática das proteínas (Hawkins e Davies, 2001; Dean et al., 1997). A carbonilação protéica parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (Donne et al., 2003), já que é um marcador estável de oxidação protéica.

As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas são suscetíveis à ação das EROs, principalmente a prolina (Pro), arginina (Arg), lisina (Lis) e treonina (Tre). Os grupamentos carbonil (C=O) (presentes em aldeídos e cetonas) são produzidos pela oxidação destas cadeias laterais de aminoácidos e

também podem ser gerados através da clivagem oxidativa das proteínas, tanto por oxidação das cadeias laterais de glutamato quanto por α amidação, levando à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado α -cetoacil. Do mesmo modo, derivados carbonil reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como consequência da reação de açúcares redutores podem levar à formação de grupos carbonil (Donne et al., 2003).

A carbonilação de proteínas é atualmente o melhor indicador e o mais comumente usado para quantificar o conteúdo de proteína oxidada (Shacter 2000, Beal 2002). Além disso, possui vantagem em relação a outros métodos por ser quimicamente estável, o que facilita a detecção e o armazenamento. A acumulação de proteína carbonilada tem sido observada em várias doenças humanas, incluindo Alzheimer, diabetes e câncer (Chevion et al., 2000). Popadiuk et al. (2006) ao verificarem o nível de carbonilação protéica em pacientes com doenças hematológicas (leucemia e linfoma) encontraram uma significativa e importante elevação nos níveis deste marcador nos pacientes em relação ao grupo controle. É importante salientar que níveis elevados de carbonilação protéica são indicadores não somente de estresse oxidativo, mas também de doenças derivadas do metabolismo protéico (Donne et al., 2003).

2.4.3 Mecanismos antioxidantes

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante enzimático e/ou não enzimático. De acordo com Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

O equilíbrio entre a geração e a neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa intra e extracelular é responsável pela manutenção dos componentes celulares vitais.

2.4.3.1 Antioxidantes enzimáticos

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (Figura 7).

As enzimas que atuam na detoxificação das espécies reativas agem em um mecanismo de elevada sincronia e atuam de forma altamente cooperativa.

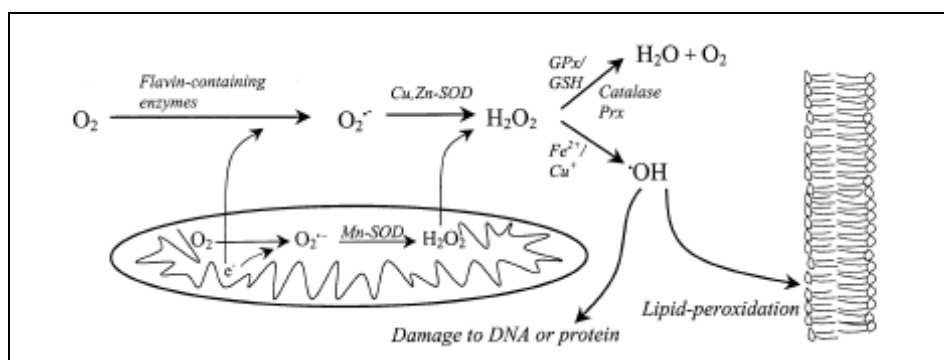
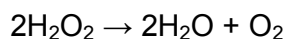


Figura 7 - Mecanismo enzimático antioxidante.

(adaptado de Nordberg & Arner, 2001)

2.4.3.1.1 Catalase (CAT)

A Catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima presente em células de plantas, animais e bactérias aeróbias (Mates et al., 1999). É uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade, e tem uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa. A catalase promove a conversão do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Possui uma das mais altas taxas de turnover, sendo que uma molécula de catalase pode converter cerca de 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular a cada minuto, conforme a reação:

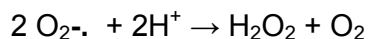


O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{2+} (Ferreira & Matsubara, 1997). Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). Apesar da CAT não ser essencial para alguns tipos celulares sob condições normais, ela desempenha um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo e na resposta adaptativa das células (Matés et al., 1999).

A literatura revela que os dados sobre a atividade dos antioxidantes enzimáticos em vários tipos de câncer são contraditórios. Em pacientes com doenças hematológicas, a maioria dos trabalhos indica uma diminuição nas defesas antioxidantes enzimáticas (Oltra et al., 2001). Nas leucemias, Senturker et al. (1997) em seu estudo demonstraram que a atividade da enzima CAT estava diminuída em linfócitos de pacientes com LLA. O decréscimo significativo da capacidade de uma variedade de tumores para detoxificar o H_2O_2 pode estar relacionado ao decréscimo nos níveis de catalase.

2.4.3.1.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada em 1939, mas somente em 1969 Mc Cord e Fridovich provaram a atividade antioxidante desta enzima (Mc Cord e Fridovich, 1969). Constitui-se de uma metaloenzima abundante nas células aeróbias e uma das defesas antioxidantes enzimáticas mais efetivas. Cabe a SOD catalisar a dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Valko et al., 2006). Sendo que, é capaz de aumentar em 10^4 vezes a velocidade da reação de dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio em pH fisiológico, conforme a reação:



A SOD existe em uma série de isoformas, que diferem pela natureza do metal presente no sítio ativo e na constituição dos aminoácidos, bem como pelo número de subunidades, cofatores e outros aspectos. Geralmente, isoenzimas distintas são

responsáveis por compartimentos celulares também distintos. Em humanos, a SOD existe em três formas: Cu-Zn citosólica, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular (EC-SOD) (Landis e Tower, 2005). A SOD varre o $O_2^{\cdot-}$ através de sucessivas oxidações e reduções do metal de transição no sítio ativo em um mecanismo do tipo “ping-pong” (Mates et al., 1999).

A SOD Cu-Zn: é uma enzima com peso molecular de 32 kDa e composta por duas subunidades idênticas (homodímero) (Mates et al., 1999). Encontra-se quase que exclusivamente no citosol (Zelko et al., 2002). A SOD Mn: é um homotetrâmero (96 kDa) contendo um átomo de manganês em cada subunidade. Na maioria dos tecidos animais e leveduras, ela é encontrada na mitocôndria (Fridovich, 1998). É uma das enzimas antioxidantes com atividade anti-tumor mais efetiva (Valko et al., 2006).

A SOD extracelular (EC-SOD) é um tetrâmero que contém cobre e zinco e possui um peptídeo sinalizador que direciona esta enzima exclusivamente para o espaço extracelular.

Em certos tipos de tumor, a atividade da SOD total se mostrou diminuída (Oberley, 1988). Além disso, trabalhos indicam que um desequilíbrio entre a formação do radical superóxido e a degradação do peróxido de hidrogênio que ocorre em células com a alteração na atividade da SOD pode ativar o poder metastático das células do câncer (Valko et al., 2006).

2.4.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, possuem grande relevância os antioxidantes não enzimáticos. O organismo possui a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (Halliwell e Gutteridge, 2000), além disso, alguns compostos ingeridos na alimentação também atuam como antioxidantes.

Entre os antioxidantes não enzimáticos podem-se citar as vitaminas, compostos fenólicos e os compostos de baixo peso molecular, como os tióis não-protéicos.

2.4.3.2.1 Tióis não-proteicos (NPSH)

Geralmente a capacidade antioxidante dos compostos tiólicos deve-se ao átomo de enxofre que pode facilmente acomodar a perda de elétron (Karoui et al., 1996). A glutathiona reduzida (GSH, L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) é o mais abundante composto tiol de baixo peso molecular encontrado em plantas e animais (Sies, 1999), em concentrações variando entre 0,1 – 10 mM (Davis Júnior et al., 2001). Este tripeptídeo apresenta diversas funções celulares em adição a suas propriedades antioxidantes (Figura 8). Possui papel importante na transdução de sinal, na expressão gênica e na apoptose, na detoxificação eletrofílica, na manutenção do equilíbrio tiólico, na prevenção da oxidação de grupos sulfidril, na promoção de um reservatório para cisteína, na modulação do processo celular da síntese de DNA e na função imune (Arrigo, 1999). Em condições normais, mais de 95% da GSH nas células está reduzida; portanto o ambiente intracelular é, normalmente, altamente redutor.

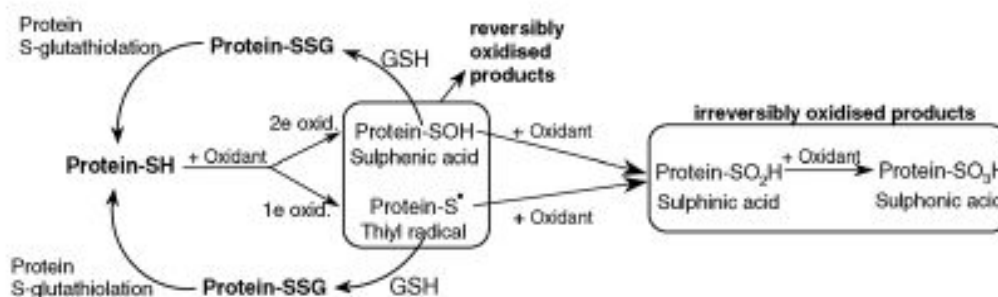


Figura 8 - Papel da GSH na oxidação de grupos sulfidril das proteínas.

(Adaptado de Valko et al., 2006)

A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula. Participa na decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), potencialmente tóxico, que é convertido em H₂O em reação catalisada pela GSHPx, às custas da glutathiona reduzida; a glutathiona oxidada

resultante é reciclada à forma reduzida pela glutathiona redutase e NADPH (Figura 9) (Gul et al., 2000). O NADPH é regenerado pela via das pentoses fosfato, em reação catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase, a qual é particularmente importante nos eritrócitos. Sendo assim, o processo de manutenção de níveis adequados de GSH pode prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (Stamler & Slivka, 1996). Estudos têm revelado uma associação entre a incidência do câncer e várias disfunções nas funções da GSH.

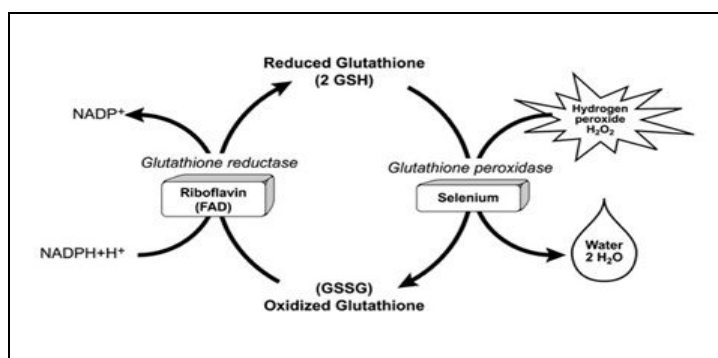


Figura 9 - Papel da GSHPx e GSH na decomposição do peróxido de hidrogênio.

([http:// www. lpi.oregonstate.edu/selenium/gsh](http://www.lpi.oregonstate.edu/selenium/gsh))

2.4.3.2.2 Vitamina E

O termo vitamina E é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem, qualitativamente, a atividade biológica do α -tocoferol, que é o composto mais potente e, geralmente, a forma predominante. Estruturalmente, tocoferóis e tocotrienóis diferem apenas na cadeia lateral e ambos se subdividem em α , β , γ e δ , dependendo do número e posição do grupo metila no anel cromanol (Theriault et al., 1999). A vitamina E designa todos os tocoferóis, varredores de radical peróxido, que são, provavelmente, os inibidores mais importantes na reação em cadeia da peroxidação lipídica em animais (Halliwell e Gutteridge, 2000). É um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Intercepta o radical peróxido (RO_2^{\cdot}), resultante com formação do radical tocoferila, que será

regenerado por ascorbato, glutatona ou ubiquinol a tocoferol (Barreiros et al., 2006; Buettner, 1993).

Misaki et al., (2003) verificaram o conteúdo de vitamina E em linfócitos de crianças com LLA e encontraram níveis significativamente menores em relação ao grupo controle. Da mesma forma, Dasgupta et al. (1993) ao pesquisarem os níveis e o papel da vitamina E em pacientes com leucemia e linfoma, encontraram níveis diminuídos e propuseram o papel benéfico da suplementação desta vitamina nestes pacientes. Por outro lado, Marco et al. (1997) ao verificarem os níveis de vitamina E em pacientes com leucemia, linfoma e mieloma não encontraram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

2.5 Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) (Figura 10) foi a primeira substância encontrada e definida como um neurotransmissor (Loewi, 1921). Foi identificada no *Ascaris* e em outros nematódeos em 1955 por Helen Mellanby e posteriormente foi definida como um neurotransmissor excitatório na junção neuromuscular do nematódeo (del Castilho et al., 1963). Como mostrado na figura 11, a ACh é sintetizada pela acetiltransferase (ChAT; EC 2.3.1.6) a partir da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídeos da dieta, e Acetil CoA, um produto do metabolismo celular (Soreq & Seidman, 2001; Prado et al., 2002), e é carregada até as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular da acetilcolina onde fica armazenada até a sua liberação (Rand, 2007).

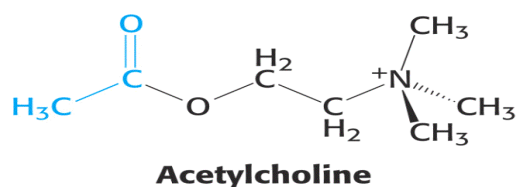


Figura 10 - Estrutura química do neurotransmissor acetilcolina
(http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/Biofvirtual/Tema-ImN/ImpNerv.htm)

Depois de ser liberada, a ACh se difunde na fenda sináptica e ativa os receptores de ACh (AChRs), posicionados nas células pós sinápticas. A ACh é amplamente distribuída no SNC, onde seus efeitos são principalmente excitatórios, efetivados pela ativação de receptores específicos, designados como receptores colinérgicos e, subdivididos em dois grandes grupos: nicotínicos e muscarínicos, que transmitem os sinais por mecanismos diferentes (Rang et al., 2004).

A ação da ACh é finalizada pela sua hidrólise enzimática na fenda sináptica pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A colina liberada é, em parte recaptada para o terminal pré-sináptico, através de um mecanismo de recaptação de alta afinidade (Soreq & Seidman, 2001) onde poderá ser reutilizada para a síntese de novas moléculas de ACh.

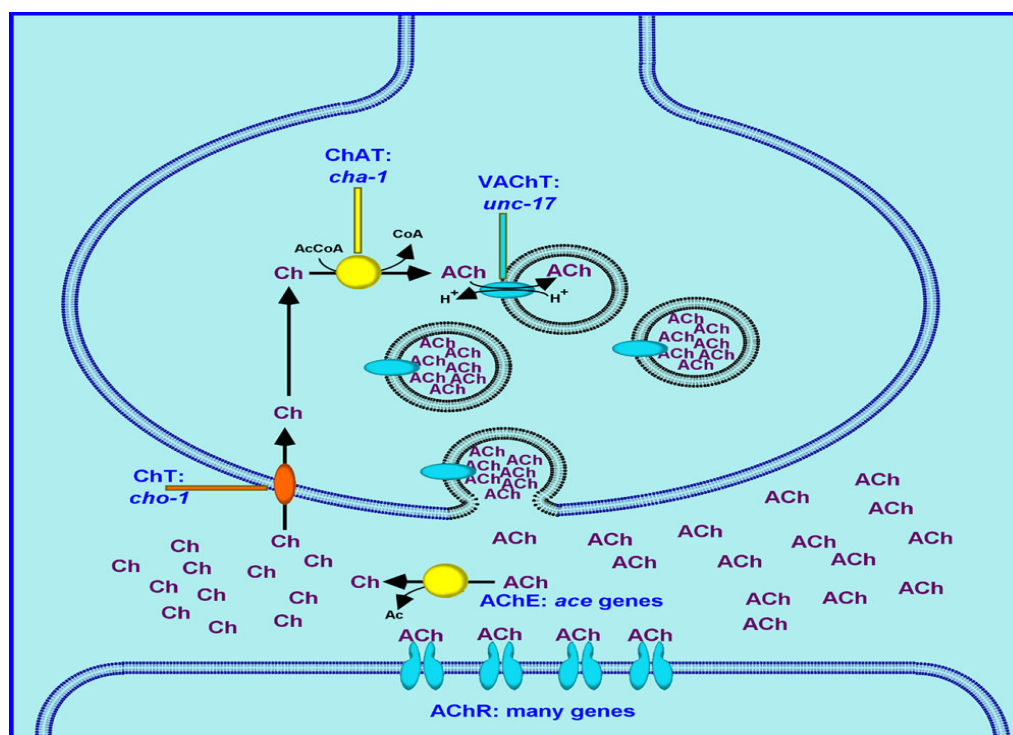


Figura 11 – Sistema colinérgico. (adaptado de Rand, 2007)

2.5.1 Colinesterases

Existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas e existem estudos que sugerem a coexistência de outras funções não colinérgicas (Balasubramanian, 1984; Grifman et al., 1998).

A butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8), anteriormente chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase e colinesterase não específica, é sintetizada no fígado, sendo também encontrada em plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, substância branca do encéfalo e coração (Wescoe et al., 1947). Hidrolisa vários ésteres de colina, desde a acetilcolina até a heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A função da BChE no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos.

A seqüência de aminoácidos da BChE e da AChE tem 53% de identidade, sendo bem conservada no sítio ativo. As duas enzimas apresentam respostas similares a diversos inibidores (Schumacher et al., 1986) e semelhança imunológica (George et al., 2001).

2.5.2 Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7; AChE)

A AChE possui um papel regulatório na neurotransmissão colinérgica. Ela é responsável pela hidrólise rápida da acetilcolina modulando a concentração deste transmissor na sinapse. É uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas e em concentrações elevadas na junção neuromuscular (Massoulié et al., 1993).

A AChE está amplamente distribuída no sistema nervoso central e também é encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos (Silva, 1998). Atualmente, existe o interesse no meio científico pelo papel não-catalítico dessa proteína, e alguns trabalhos têm demonstrado que variantes estruturais da AChE participam de funções no crescimento e adesão celular, neurogênese, sinaptogênese, hematopoiese, osteogênese; além de processos patológicos

associados ao estresse e deterioração de neurônios colinérgicos (Soreq & Seidman, 2001; Bartolini et al., 2003).

2.5.3 Estrutura da acetilcolinesterase

A AChE é responsável pela inativação da acetilcolina nas sinapses colinérgicas dos sistemas nervosos central e periférico. Esta enzima possui um rico polimorfismo já que existe em uma variedade de formas moleculares que podem ser classificadas como homoméricas ou heteroméricas com base na associação com subunidades estruturais especializadas (Figura 12) (Massoulié et al., 1993).

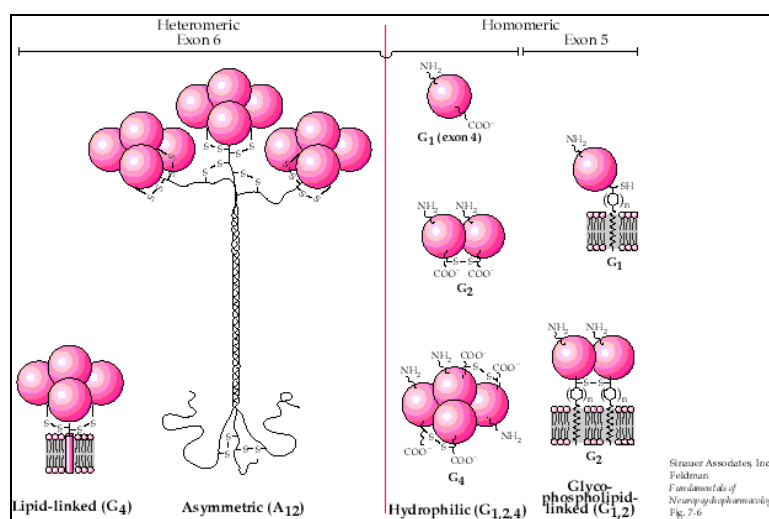


Figura 12 - Isoformas da enzima AChE

(http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm)

As formas homoméricas incluem a forma globular monomérica (G₁), dimerica (G₂) e tetrâmera (G₄). Estas formas moleculares diferem uma da outra quanto às suas características anfífilicas e quanto ao grau de hidrofobicidade, conseqüentes à adição pós-transducional de um glicofosfolípido no aminoácido carboxi-terminal (Taylor & Brown, 1999). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente, com a finalidade de exportação ou associadas à membrana externa da célula por meio de uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou do glicofosfolípido acoplado (Taylor & Brown, 1999).

Já as formas heteroméricas consistem em uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde a ligação através de pontes dissulfeto de uma molécula tríplice helicoidal de colágeno a um, dois ou três tetrâmeros catalíticos resulta nas formas estruturais assimétricas A_4 , A_8 e A_{12} (Massoulié et al., 1993).

Tanto os eritrócitos, os linfócitos, como as plaquetas contêm a forma globular dimérica (G_2), tetramérica (G_4) a assimétrica (A_{12}) como padrões de formas moleculares (Figura 13). No entanto, nenhuma forma globular monomérica (G_1) foi encontrada nas células sanguíneas humanas (Rakonczay et al., 2005). Tanto em linfócitos quanto em plaquetas, a principal forma encontrada é a G_2 (aproximadamente 80%) e as formas G_4 e A_{12} mostram-se igualmente distribuídas. Os eritrócitos mostram um predomínio da forma globular dimérica (G_2), encontrada em até 98% das células como foi demonstrado por Rakonczay et al. (2005).

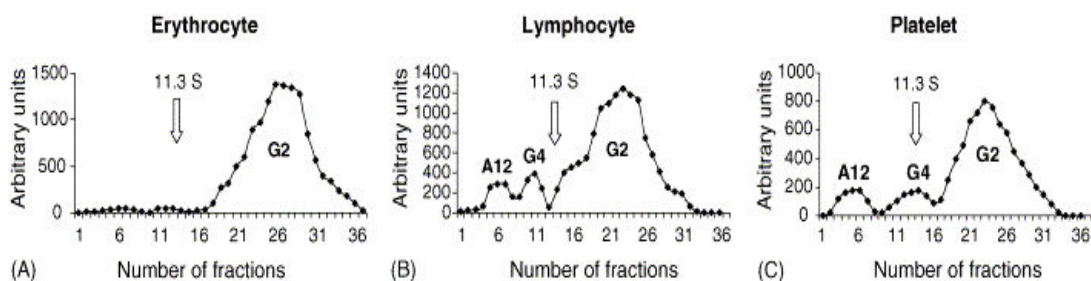


Figura 13 - Frações moleculares da AChE nas células sanguíneas.

(adaptado de Wessler, 2001)

As diferenças nos arranjos das subunidades permitem a localização de subunidades cataliticamente ativas em tipos distintos de célula e em posições subcelulares para realizar funções sítio específicas, mas parecem não afetar as atividades catalíticas intrínsecas das formas individuais (Massoulié et al., 1993).

2.5.4 Mecanismo catalítico

A importância fisiológica e as propriedades bioquímicas da AChE a tornaram um alvo interessante para a análise detalhada da sua função estrutural. A seqüência de aminoácidos da AChE foi codificada pela primeira vez no modelo de estrutura

cristalina da AChE dimérica de *Torpedo Califórnia*, a qual vem sendo historicamente uma das principais fontes da enzima colinérgica para a pesquisa. Mais tarde, as estruturas cristalinas da AChE a partir de outras fontes, incluindo o homem foram obtidas e mostraram-se essencialmente semelhantes (Soreq & Seidman, 2001).

O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327) (Figura 14).

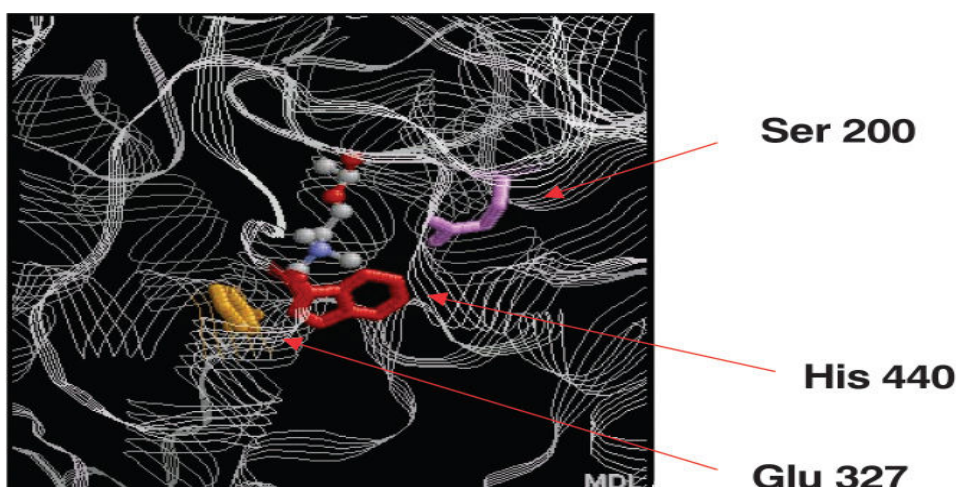


Figura 14 - Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica. (adaptado de Viegas Júnior et al., 2004)

A visão tradicional do sítio ativo da AChE foi considerada como tendo dois subsítios; um sítio carregado negativamente ou “aniônico” ao qual a cadeia de nitrogênio quaternário $[-N+(CH_3)_3]$ da acetilcolina carregada positivamente se liga, e um sítio esterásico contendo os verdadeiros resíduos catalíticos, que aloja o grupamento éster e carbonila da ACh (Figura 15) (Taylor & Brown, 1999). Além disso, um segundo sítio “aniônico” que se tornou conhecido como sítio aniônico periférico (peripheral anionic site - PAS) foi proposto com base na ligação de compostos bis quaternários. Pesquisas envolvendo o sítio periférico revelaram que este parece ser fundamental para algumas das funções não-clássicas da enzima (Soreq & Seidman, 2001).

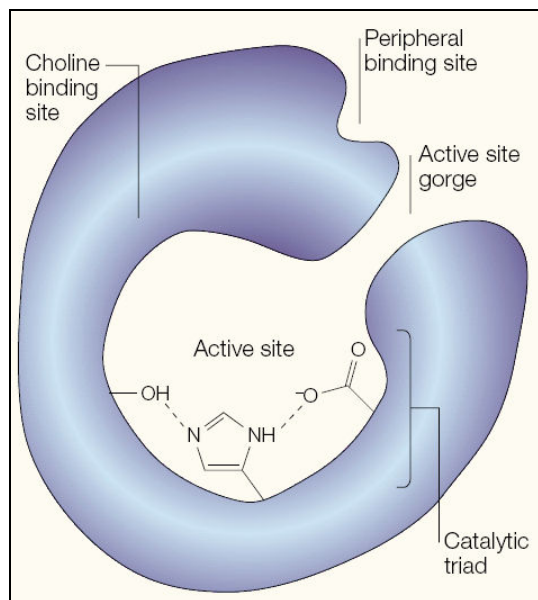


Figura 15 - Sítio esterásico contendo a tríade catalítica, externamente o sítio periférico aniônico (PAS). (adaptado de Soreq & Seidman, 2001)

A AChE é classificada como uma serina hidrolase e o mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases. A estrutura tridimensional da enzima demonstra que o sítio ativo é quase centroassimétrico a cada unidade e reside na base de um gargalo estreito com uma profundidade de 20 Å (Sussman et al., 1991). Na base do gargalo situam-se os resíduos da tríade catalítica (Figura 16).

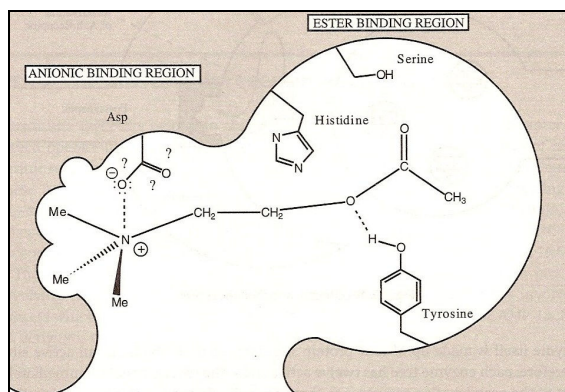


Figura 16 - Interação do substrato (ACh) com o sítio esterásico da AChE. (adaptado de Patrick, 2001)

A AChE catalisa a hidrólise de ACh com uma alta eficiência catalítica. A quebra da ACh em colina e ácido acético catalisada pela AChE se processa em dois estágios: acilação e desacilação (Tachikawa et al., 2005) (Figura 17).

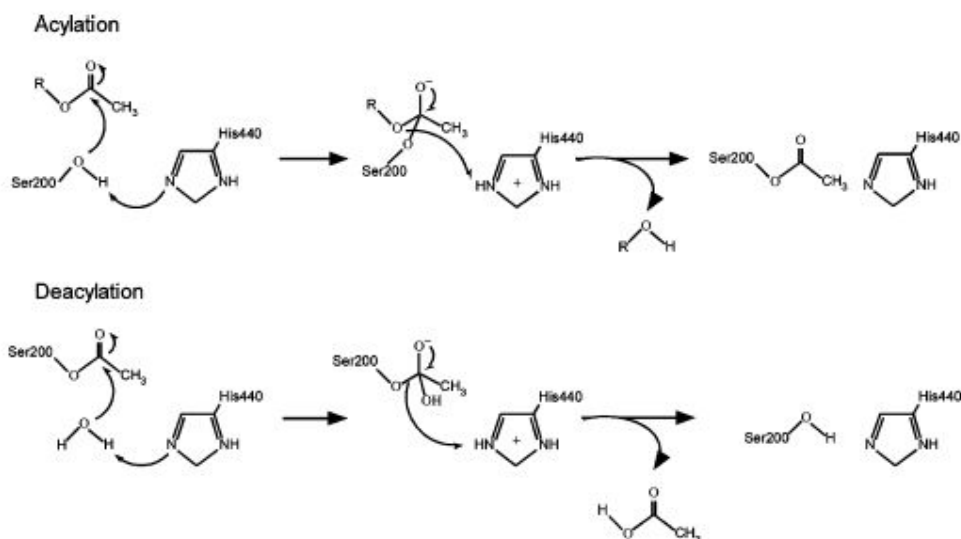


Figura 17 - Reação de hidrólise da ACh catalisada pela AChE (adaptado de Tachikawa et al., 2005)

O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. No caso da AChE humana, os resíduos de Ser200 e His440 localizados no sítio ativo, são envolvidos na reação com o substrato durante a catálise da ACh. No processo de acilação ocorre a transferência de próton da Ser200 para o imidazol da His440 e a adição nucleofílica do átomo de oxigênio da Ser200 para o substrato ACh ocorre subsequentemente. Na desacilação, a acil enzima é hidrolisada voltando à sua forma original através da hidrólise do grupo acetila da serina pela água, o que recupera o sítio catalítico da enzima (Viegas Júnior et al., 2004).

2.5.5 Sistema colinérgico extra-neural

A AChE está presente tanto em neurônios quanto em eritrócitos e linfócitos. A AChE está presente na membrana dos eritrócitos, onde apesar de possuir uma alta

atividade, não possui funções enzimáticas. A AChE eritrocitária possui as mesmas propriedades da enzima pura presente no encéfalo (Al-Jafari, 1995). No entanto, seu exato papel biológico é ainda desconhecido (Kamal et al., 1999).

Uma das funções não enzimática da AChE sangüínea parece estar relacionada com a diferenciação das células hematopoiéticas (Soreq et al., 1994). Além disso, apesar de o papel da AChE na membrana das células sangüíneas ainda não estar bem estabelecido, estudos indicam que esta enzima é um bom marcador de integridade e estado funcional da membrana (Szelényi et al., 1987).

Em relação aos linfócitos, sabe-se que estas células possuem todos os componentes necessários para constituir um sistema colinérgico extraneuronal independente envolvido na regulação da função imune (Kawashima & Fujii, 2000).

2.5.6 Sistema colinérgico no linfócito e sua relação com o sistema imune

Várias evidências sugerem a existência de uma relação entre os sistemas neuroendócrino e imune. Estudos indicam que estes dois sistemas apresentam um grau de interdependência (Adem et al., 1986) e os linfócitos têm demonstrado a expressão de vários neurotransmissores, incluindo receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (Tayebati et al., 1999).

A ACh que é o principal neurotransmissor excitatório, também possui papel na modulação da função imune (Kawashima and Fujii, 2000). A ACh sintetizada e liberada dos linfócitos pode ser considerada um imunomodulador atuando via receptores muscarínicos e nicotínicos dos linfócitos. Os linfócitos possuem todos os componentes necessários para a constituição de um sistema colinérgico não-neuronal próprio (Figura 18).

Segundo Kawashima e Fujii (2000), as funções dos linfócitos são reguladas em parte pelo sistema colinérgico extraneuronal presente na superfície destas células. Além disso, trabalhos relatam que a inibição da AChE reduz a proliferação de linfócitos, porém o mecanismo envolvido neste processo permanece desconhecido (Nizri et al., 2005)

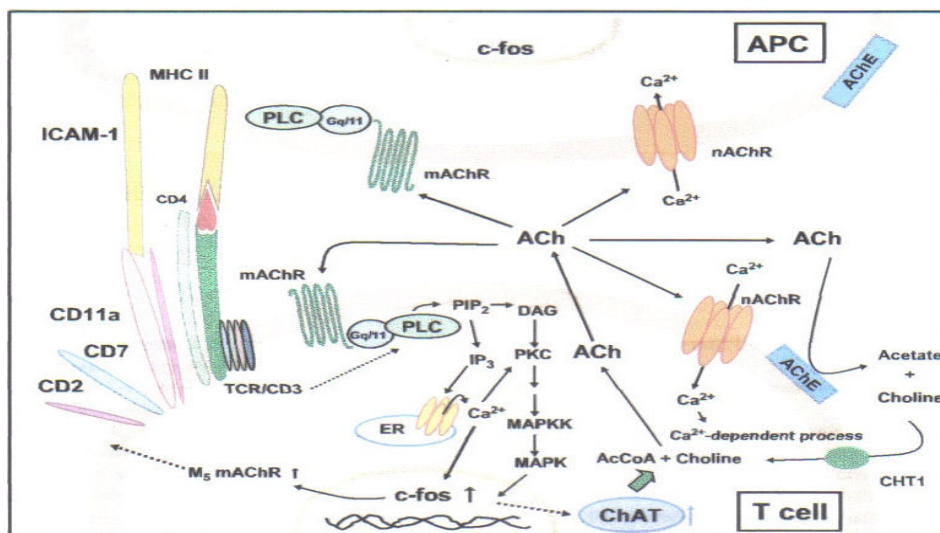


Figura 18 – Sistema colinérgico linfocítico.
(adaptado de Kawashima e Fujji 2003)

2.5.7 Sistema colinérgico *versus* câncer

Apesar de ser bem conhecida como a enzima que hidrolisa a ACh, a AChE é agora também conhecida por ter funções não enzimáticas adicionais em relação ao estresse, desenvolvimento e neurodegeneração (Silman & Sussman 2005). Várias observações têm também indicado a possibilidade de uma nova função da AChE em tecidos não-neuronais, incluindo tumores (Small et al., 1996). Estudos relatam que parece haver uma associação entre mudanças na expressão e atividade da AChE e a o desenvolvimento de vários tipos de câncer (Ruiz-Espejo et al., 2003).

Alguns autores têm investigado a relação entre as colinesterases e a diferenciação das células hematopoiéticas e evidências mostram que nas leucemias ocorrem mudanças estruturais nos genes expressos por estas enzimas (Lapidot-Lifson et al., 1989). Além disso, a AChE parece estar envolvida no mecanismo celular e molecular que regula a proliferação e diferenciação das células sanguíneas (Deutsch et al., 2002).

2.5.8 Acetilcolinesterase *versus* drogas antineoplásicas

Vários estudos tem investigado o efeito de drogas antineoplásicas na atividade da AChE (Al-Jafari et al., 1995a; 1995b). Drogas utilizadas no tratamento quimioterápico como, por exemplo, o metotrexato podem produzir uma mudança conformacional na enzima através da ligação reversível com o complexo enzima-substrato. Portanto, as drogas antineoplásicas podem diminuir a atividade da enzima por impedir o posicionamento adequado do sítio catalítico para a reação de acilação com o substrato.

3 MANUSCRITOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos. As apresentações estão baseadas na versão aceita para publicação na revista *Clinical Biochemistry* (Manuscrito 1) e na versão em fase final de revisão pelos autores para submissão à revista *Clinical Chimica Acta* (Manuscrito 2).

3.1. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients

3.2. Changes in Acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients.

Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients

Vanessa Battisti^a, Liési D. K. Maders^a, Margarete D. Bagatini^a, Karen F. Santos^a, Rosélia M. Spanevello^b, Paula A. Maldonado^a, Alice O. Brulé^c, Maria do Carmo Araújo^c, Maria R. C. Schetinger^a, Vera M. Morsch^{a*}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^cHospital Universitário de Santa Maria - HUSM, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Corresponding author:

Dr. Vera Maria Morsch

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

E-mail: veramorsch@gmail.com

Fax: + 55-55-3220-8978

Abstract

Objectives: To evaluate the oxidative status and antioxidant defense in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Design and methods: We measured concentrations of plasmatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), serum protein carbonylation, whole blood catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, as well as the plasmatic and erythrocyte thiol levels and serum vitamin E concentration. This study was performed on 80 children with ALL divided into 4 groups: just diagnosed, remission induction, remission maintenance and out-of-treatment.

Results: TBARS levels and serum protein carbonylation were higher in ALL patients than in controls and reduced levels of antioxidants were found in these patients.

Conclusion: These findings may indicate a possible link between decreased antioxidants and increased levels of cells alterations due to oxidative damage, supporting the idea that there is a persistence of oxidative stress in acute lymphoblastic leukemia.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL); Oxidative Stress; Antioxidant System; TBARS; protein carbonylation; SOD; CAT; thiols; vitamin E

1. Introduction

Leukemias originate from hematopoietic stem cells that lose the capacity to differentiate normally in mature blood cells at different stages of their maturation and differentiation [1, 2]. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer found in the pediatric population and it accounts for more than 50% of the hematopoietic malignancies in this age group [3,4]. In contrast, ALL is a relatively rare leukemia subtype in adults, accounting for only 2–3% of hematopoietic malignancies [4].

ALL is a disease characterized by uncontrolled proliferation and maturation arrest of lymphoid progenitor cells in bone marrow resulting in an excess of malignant cells [5]. The lymphoblasts replace the normal marrow elements, resulting in a marked decrease in the production of normal blood cells. ALL is a disorder caused by an abnormal expression of genes, which is usually a result of chromosomal translocations [6].

The disease can be originated from lymphoid cells of different lineages, giving rise to B- or T-cell leukemias or sometimes mixed-lineage leukemia [7]. It is a curable disease with an expected long term survival rate of at least 70%, when treated with modern therapeutic regimens. In general, ALL standard treatment protocols consist of induction and maintenance remission with chemotherapeutic drugs [8].

It is well recognized that oxidants play a role in several stages of carcinogenesis [9]. Production of reactive oxygen species (ROS) is an inevitable result in cells that use aerobic metabolism for energy production [10]. ROS are known to play a dual role in biological systems, since they may be either harmful or beneficial to living systems. Furthermore, oxidative stress may inhibit or promote

apoptosis and until necrosis, depending on the intensity of the stimulation. Beneficial effects of ROS involve physiological roles in cellular responses to noxia, as for example in the defense against infectious agents and in the function of a number of cellular signaling systems [11]. In contrast, at high concentrations, ROS can be important mediators of damage to biomolecules such as DNA, proteins, and lipids, leading to cellular dysfunction and cell death. Accumulation of such molecules causes noxious effects on individuals, resulting in diseases such as hematopoietic malignancies [12]. The first biological molecules for oxidative damage in cells are proteins and their side chains can be carbonylated by reactive carbonyl compounds [13]. In addition, oxidative damage in lipids leads to the formation of products such as malondialdehyde (MDA) [14].

The effect of reactive species is balanced by the antioxidant action of non-enzymatic antioxidants, as well as by antioxidant enzymes. Antioxidant defenses are extremely important as they represent the direct removal of free radicals (prooxidants), providing maximal protection for biological sites [11].

The most efficient enzymatic antioxidants involve superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). SOD is an antioxidant enzyme that catalyzes the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ to O_2 and to the less-reactive species hydrogen peroxide (H_2O_2) protecting cells from injury induced by free radicals [15]. Additionally, the enzyme CAT very efficiently promotes the conversion of H_2O_2 to water and molecular oxygen [14]. Non-enzymatic antioxidants include thiol antioxidants and Vitamin E. Non-protein thiols have a variety of functions in bioreduction and detoxification processes [16]. The main antioxidant function of vitamin E is the protection against lipid peroxidation [17].

Information about the activities of antioxidant enzymes is conflicting in patients with cancer and studies on leukemia patients are rare [18]. Moreover, the levels of oxidative damage and antioxidant defenses have not been investigated in children just diagnosed with ALL as compared to those in the different stages of treatment and after therapy. In this work, we studied the oxidative profile in ALL patients in these groups, through the verification of main enzymatic antioxidant defenses (CAT and SOD) and non-enzymatic antioxidants (thiols and Vitamin E). Moreover, we determined the intensity of biological damage caused by free radicals in lipid and protein through the measurement of lipid peroxidation and the levels of protein carbonylation.

2. Methods

Patients

The sample consisted of 80 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients recently diagnosed and under treatment at the Oncology-Hematology Laboratory – Hospital of the Federal University of Santa Maria. The controls consisted of 50 healthy volunteers with ages and social conditions similar to those of the patients. They presented no acute or chronic diseases such as diabetes, parasitosis or any immune dysfunction. Also, the controls used in this study had normal leukocytes and other blood cell counts and made no use of pharmacological therapy. Patients included in this study received the diagnosis for ALL, which is based on the following findings: leukocyte count, age, involvement of tissues other than bone marrow, immunophenotyping and responsiveness to the treatment. Patients were diagnosed

and treated according to the GBTLI LLA-99 protocol [19] defined by the Brazilian Group of Childhood Leukemia Treatment.

The treatment with chemotherapeutic agents consisted of two phases: remission induction and remission maintenance. The first phase starts with induction therapy, using multiple chemotherapeutic drugs, followed by consolidation. Remission maintenance is a long phase, in which patients undergo up to 84 weeks of chemotherapeutic agents. After these phases, patients have follow-ups with periodic laboratorial exams to eliminate the possibility of recurrence. Taking this into account, we selected four patient groups: The first group was composed of 10 children (ages ranged from 3-17 years) just diagnosed with ALL who had not received any therapy preceding the blood sampling. The second group was composed of 20 patients (ages ranged from 3-19 years) undergoing treatment in the first phase, remission induction. The third group was composed of 25 patients (ages ranged from 3-23 years) in the second phase of treatment, called remission maintenance. 25 patients out of treatment (ages ranged from 4 -20 years) constituted the fourth group.

Consent was given by family members of all the patients included in this work. The Human Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 51/06. The patients' general characteristics are shown on Table 1.

Sample collection

The blood was collected in vacutainer tubes without an anticoagulant system, centrifuged at 5000 rpm for 10 min, the precipitate was discarded and the serum was used to determine the protein carbonyl and the vitamin E contents. CAT and SOD

activities were determined using whole blood collected in citrated vacutainer tubes and diluted in a 1:10 in saline solution. For plasmatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and non- protein thiols, the blood was collected using EDTA as anticoagulant. The sample was then centrifuged (5000 rpm for 10 min) and the plasma was used to determine MDA and thiols and the erythrocytes were used only to verify thiol levels. Samples were obtained from November 2006 to may 2007.

Hematological determinations

Quantitative determinations of blood cells obtained by venipuncture were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami, USA).

Carbonylation of serum protein

The carbonylation of serum proteins was determined by a modified Levine's method [20]. Firstly, from 1ml of serum, the proteins were precipitated using 0.5 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 5000 rpm for 5 min discarding the supernatant. One half milliliter of 10 mmol/l 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 mol/l HCl was added to this protein precipitate and incubated at room temperature for 30 min. During incubation, the samples were mixed vigorously every 15 min. After incubation, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitate and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, the precipitate was washed twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g SDS and 50 mg EDTA in 100 ml 80 mmol/l phosphate buffer,

ph 8.0) and incubated at 37 °C water bath for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/l HCl. Carbonyl content was calculated by using the molar extinction coefficient (21×10^3 l/mol cm) and results were expressed as nanomoles per milligram protein.

Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS in plasma samples according to a modified method of Jentzsch et al. [21]. Briefly, 0.2 ml of serum was added to the reaction mixture containing 1 ml of 1% ortho-phosphoric acid, 0.25 ml alkaline solution of thiobarbituric acid-TBA (final volume 2.0 ml) followed by 45 min heating at 95 °C. The results were expressed as nanomole MDA per milliliter of plasma.

Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) activities

The determination of CAT activity was carried out in accordance with a modified method of Nelson and Kiesow [22]. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to CAT dependent decomposition of hydrogen peroxide. An aliquot (0.02 ml) of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of 0.07 ml in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/l. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient ($0.0436 \text{ cm}^2/\mu\text{mole}$) and the results were expressed as picomoles per milligram protein.

SOD activity measurement is based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Mc Cord & Fridovich [23]. In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50 % the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM).

Determination of non-protein thiols

Non-protein thiols were assayed in plasma and erythrocytes by the method of Ellman [24]. Aliquots (0.1 ml) of plasma were added to a phosphate buffer 0.3 mol/l (0.85 ml), pH 7.4 and the reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 ml). Results were expressed as $\mu\text{mol/ml}$ of plasma.

Aliquots of erythrocytes (0.3 mL) were hemolyzed with 10% Triton X-100 (0.1 mL) and, after 10 min, precipitated with 0.2 mL of 20% TCA. After centrifugation at 5.000 rpm for 10 min, the supernatant aliquots reacted with 50 μL of DTNB (10 mM) and the reaction product was read at 412 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol/mL}$ of erythrocyte.

Serum vitamin E quantification

Serum vitamin E was estimated by a modified method of Hansen & Warwick, [25]. In a cover tube, 140 μ l of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) was added to 20 μ L of butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), 140 μ l of sample and 2.1 ml of ethanol solution (66%). After this, it was vortex-mixed for 10 s and 3.5 ml of n-hexane was added and mixed for 1 min. It was then centrifuged at 1800 g for 10 min and 3 ml of superior phase transferred to fluorimeter cuvettes and the vitamin E was measured in the fluorimeter: excitement: 295 nm; emission: 340 nm. All samples were analyzed in duplicate. Calibration curves with α -tocoferol (Sigma-Aldrich Inc, USA) were used to determine the concentration, following the same procedure for the samples.

Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford [26] using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Statistical analysis was done by the commercial SPSS package for Windows©. All the data are expressed as the mean \pm standard error. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3. Results

Characteristics and Hematological features in blood

Table 1 presents the patient's general characteristics and blood cell count. We observe the presence of blast cells in the patients just diagnosed. White blood cell count, including lymphocytes was elevated in the just diagnosed patients and platelets count was diminished in these patients. Hemoglobin and erythrocytes were decreased in the just diagnosed and remission induction patients.

Protein carbonylation

Protein oxidation, determined by protein carbonyl content in serum samples from the patients, is shown in Figure 1. It can be observed that there was a significant difference between the patients and the controls. The protein carbonyl content was increased in the just diagnosed patients, in patients of both treatment phases and also in the out-of-treatment patients when compared to the controls ($F(4,108) = 7.62$; $p < 0.001$).

Lipid peroxidation

The lipid peroxidation results are shown in Figure 2. Post-hoc comparisons by Duncan's test revealed that TBARS content was increased in the just diagnosed patients and in the remission induction patients in relation to controls and to the remission maintenance and out-of-treatment patients ($F(4,116) = 8.94$; $p < 0.001$), but the remission maintenance and out-of-treatment patients were also increased in relation to the controls.

Antioxidant catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities

CAT activity in just diagnosed, remission induction and remission maintenance patients was reduced when compared to controls ($F(4,104) = 16.09$; $p < 0.001$). No significant difference was observed between the out-of-treatment patients and the controls (Figure 3).

Figure 4 shows the SOD activity in ALL patients and controls. No statistically significant relationship was found between the remission maintenance and out-of-treatment patients and the controls, or between the remission induction and out-of-treatment patients. Nevertheless, the SOD activity was shown to be decreased in the just diagnosed and the remission induction patients in relation to the controls ($F(4,103) = 4.87$; $p < 0.01$).

Levels of non-protein thiols in plasma and erythrocytes

Post-hoc comparisons made by Duncan's test revealed that the levels of non-protein thiols in plasma were reduced in the remission induction, remission maintenance and just diagnosed patients, ($F(4,119) = 6.43$; $p < 0.001$), while it was not significantly different for the out-of-treatment patients in relation to the controls (Figure 5).

Thiol levels in erythrocytes were also decreased in the remission maintenance patients when compared to the controls ($F(4,108) = 7.95$; $p < 0.001$). However, there was no significant difference between the just diagnosed, remission induction and out-of-treatment patients in relation to the controls (Figure 6).

Serum vitamin E content

Serum vitamin E content was reduced both in the just diagnosed and remission induction patients, while it was not significantly different for the remission maintenance and out-of-treatment patients in relation to controls ($F(4,102) = 5.60$; $p < 0.001$). No statistically significant relationship was found between the remission maintenance patients and the other groups (Figure 7).

4. Discussion

ALL is more prevalent, and has a better prognosis, in children. This disease was diagnosed on the basis of clinical history, physical examination and complete hemogram. Patients with ALL can have a high, normal, or low white blood cell count. The lymphoblasts replace the normal marrow elements, resulting in a marked decrease in the production of normal blood cells. Consequently, anemia, thrombocytopenia, and neutropenia occur to varying degrees.

Extensive evidence has shown that disturbances of oxidative stress metabolism are a common feature of transformed tumor cells [27]. Both alterations of antioxidants and increases in the production of oxygen reactive species have been reported [28]. As a result, higher rates of lipid peroxidation and protein lesions have been found in the majority of neoplastic tissues. Furthermore, altered levels of antioxidant enzymes (SOD, CAT) and non-enzymatic antioxidants (thiols, Vitamin E) are evident in many human cancers [29].

There is a relationship between leukemia and oxidative stress. Leukemic cells produce higher amounts of reactive oxygen species (ROS) than non-leukemic cells as they are under a repeated state of oxidative blockade [30]. However, discrepancies as to the reported changes of enzymatic activities in these patients are reflected in the scientific literature. Moreover, a study that analyzes the oxidative profile in children just diagnosed with ALL in comparison to that of the different stages of treatment has not been found in the literature. Others studies evaluated antioxidant status in children with newly diagnosed ALL and during the first months of chemotherapy treatment [31, 32], but no compared with patients out-of-treatment. In this context, we have examined the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT) as well as thiol, vitamin E and MDA levels and protein carbonylation in the blood of just diagnosed ALL patients as compared to those in the different stages of treatment and after therapy.

In the present study, the levels of protein carbonylation and TBARS contents were shown to be increased in the just diagnosed patients, in the two treatment phases and in the out-of-treatment patients when compared with the control group (Figure 1 and 2). These results are in accordance with the increase of TBARS levels in the serum of patients with chronic leukemia [30] and acute lymphoblastic leukemia [33] and of bone marrow transplant recipients [34]. On the other hand, Devi et al. [18] and Er et al. [35] showed that plasma lipid peroxidation products in untreated leukemia patients and in patients with acute myeloid leukemia were in the normal range and Popadiuk et al. [36] demonstrated that in children with malignant bone tumors no alterations in the level of protein carbonylation were found.

We can suggest that the increase of oxidative lesions seems not to be a result of the treatment with chemotherapeutic agents but may be involved with the pathogenesis of leukemia, since in the non treated patients, the levels were more increased than in those in treatment. Moreover, protein carbonylation may be an irreversible lesion as this parameter was high in the out-of treatment group. Another important data observed in this study is that although of the groups have a age range of 3-23 years, this difference in age does not affect the results, since the values found of markers of oxidative stress were adequately homogeneous in all groups.

The data reported in the literature concerning antioxidant enzymes in different human cancer types are controversial. In this study, it was demonstrated that SOD and CAT activities were decreased in ALL patients. CAT activity was reduced in just diagnosed patients and patients in both treatment groups. SOD activity was decreased in the just diagnosed and remission induction patients (Figure 3 and 4). This phenomenon indicates a disturbance of the protective role of these enzymes against free radicals in ALL. These findings are in accordance with earlier studies of Oltra et al. [37] who confirmed decreased SOD and CAT activities in the lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. The results are also in agreement with the reports of Senturker et al. [38], who demonstrated reduced CAT and SOD activities in the lymphocytes of ALL patients, and Madej et al. [39] who found a decreased activity of these enzymes during the development of the leukemic process in mice. However, Nishiura et al. [40] reported elevated serum SOD activity in acute leukemia and indicated that regression of the leukemia was accompanied by a decrease in the serum level of SOD. However, taken together, these findings suggest that there are alterations in the enzymatic antioxidant defenses, which can interfere in

the direct removal of free radicals (pro-oxidants) and in the protection for biological sites.

The cumulative production of free radicals during either endogenous or exogenous insults is common for many types of cancer cells and is linked with the altered redox regulation of cellular signaling pathways. Oxidative stress induces a cellular redox imbalance which has been found to be present in various cancer cells. The effect of reactive oxygen and nitrogen species is balanced by antioxidant enzymes such as CAT and SOD. In this context the impaired antioxidant role of CAT and SOD may support the accumulation of free radicals. Alternatively, it is possible that the antioxidant system is impaired as a consequence of an abnormality in the antioxidative metabolism due to the cancer process. This effect could be enhanced by the characteristic increase in the production of H_2O_2 by the cancer cells [41]. On the other hand, the SOD inhibition by novel anticancer agents may be a beneficial effect, resulting from induced apoptosis of the leukemia cells through a free radical-mediated mechanism [42].

Another important aspect to be discussed is that, no significant difference was observed between the out-of-treatment and the control groups for CAT and SOD activity. We suggest that these findings may be a consequence of the amount of time passed after the treatment, demonstrating that the treatment was in fact efficient.

With respect to the thiol levels in plasma and erythrocytes, our findings revealed that the levels in plasma were reduced in remission induction, remission maintenance groups and just diagnosed patients. The thiol content in erythrocytes was also decreased in the remission maintenance patients when compared to the controls (Figure 5 and 6). Glutathione (GSH), the main cellular thiolic compound, has

a variety of functions in bioreduction and detoxification processes. Silber et al. [43] reported GSH depletion in lymphocytes isolated from the blood of patients with CLL. On the other hand, Oltra et al. [37] observed higher GSH concentration in lymphocytes of CLL subjects. There are many publications that reveal the effect of cancer on the antioxidant system [44]. However, previous evidence for the role played by thiols, mainly GSH, in determining a prognosis in leukemia has been conflicting. The decrease in thiol levels may represent a depletion of this antioxidant due to high concentrations of H₂O₂ and other peroxides formed in tumor cells. Therefore, thiols levels are not sufficient to prevent oxidative stress in the affected cells.

Serum vitamin E content was reduced in both just diagnosed and remission induction patients; however these levels returned to the normal values for the remission maintenance and out-of-treatment patients (Figure 7). A similar result was shown by Singh et al. [45] who found significantly decreased serum vitamin E levels in chronic myeloid leukemia patients before starting treatment and increased vitamin E levels after treatment. These findings confirm that vitamin E is an important antioxidant that is altered in leukemia. As an antioxidant, vitamin E may inhibit cancer formation by scavenging reactive oxygen or nitrogen species and could be considered the major membrane-bound antioxidant employed by the cell [46]. However, the epidemiologic evidence supporting a link between vitamin E and cancer is limited, and intervention studies are scarce [47].

The results reported in this paper characterize the persistence of oxidative stress in ALL. Although reactive species are well recognized for playing a dual role as both deleterious and beneficial species, excessive accumulation of reactive

species contributes to antioxidant depletion and dysfunction. In addition, oxidative stress induces lipid peroxidation and protein carbonylation by inactivating antioxidant enzymes. One important aspect to be discussed is that the biggest differences in the parameters analyzed was observed in just diagnosed patients in compared to controls subjects, demonstrating the relationship between these changes and the development of ALL. In the out-of-treatment patients, levels of antioxidants returned to normal values, indicating the regression of disease as a result of the treatment.

In conclusion, the present work provides evidence for the increased levels of oxidative damage and decreased levels of the antioxidant system in ALL patients, suggesting a possible link between these two important parameters in this type of cancer. Furthermore, we hope that our results represent an important contribution in the study of the oxidative profile in children just diagnosed with ALL as compared to those in the different stages of treatment and after therapy. More studies are necessary to confirm whether these alterations are the cause or the consequence of carcinogenesis.

5. Acknowledgement

The authors wish to thank all the ALL patients and the professionals at the Hematology-Oncology Laboratory (HUSM) for their support.

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

6. References

1. Sinnett D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. *Fam Cancer* 2006;5:35-47.
2. Molica S, Vacca A, Levato D, Merchionne F, Ribatti D. Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004;28:321-4.
3. Gaynon PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol* 2005;131:579-87.
4. Downing JR, Shannon KM. Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell* 2002;2:437-46.
5. Plasschaert SLA, Kamps WA, Vellenga A, Vries EGE, De Bont ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? *Cancer Treat Rev* 2004;30:37-51.
6. Mrozeka K, Heeremab NA, Bloomfielda CD. Cytogenetics in acute leukemia *Blood Rev* 2004;18:115-36.
7. Mobasheri MB, Modarressi MH, Shabani M, Asgarian H, Sharifian RA, Vossough P, et al. Expression of the testis-specific gene, TSGA10, in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res* 2006;30:883-9.
8. Igarashi S, Manabe A, Ohara A, Kumagai M, Saito T, Okimoto Y, et al. No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol* 2005;23:6489-98.

9. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P. The Role of the Cellular Antioxidant Defense in Oxidant Carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;102:123-30.
10. Goto H, Yanagimachi M, Kajiwara R, Kuroki F, Yokota S. Lack of mitochondrial depolarization by oxidative stress is associated with resistance to buthionine sulfoximine in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res* 2007;31:1301-9.
11. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
12. Masutani H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 2000;71:25-32.
13. Donne ID, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38.
14. Manoharan S, Kalanjiappan K, Kayalvizhi M. Enhanced Lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:699-707.
15. Oberley LW, Buettner GR. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 1979;39:1141-9.
16. Silber R, Farber CM, Papadopoulos E, Nevrla D, Liebes L, Bruck M, et al. Glutathione Depletion in Chronic Lymphocytic Leukemia B Lymphocytes. *Blood* 1992;80:2038-43.

17. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad Bio Med* 2000;28:141-64.
18. 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.
19. Protocolo GBTLI LLA-99, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.
20. Levini RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
21. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:251-6.
22. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;49:474-8.
23. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
24. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
25. Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969;51:538-41.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:218-54.

27. Skarstein J, Aass N, Fossa SD, Skovlund E, Dahl AA. Anxiety and depression in cancer patients: relation between the Hospital Anxiety and Depression Scale and the European Organization for Research and Treatment of Cancer Core Quality of Life Questionnaire. *J Psychosom Res* 2000;49:27-34.
28. Malyszczak K, Tomasz W, Mazur G, Lindner K, Pyszel A, Kiejna A, et al. Anxiety and depressive symptoms in patients treated due to haematologic malignancies. *Psychiatr Pol* 2005;39:33-40.
29. McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Ann Rev Nutr* 2005;25:261-95.
30. Al-Gayyar MM, Eissa LA, Rabie AM, El-Gayar AM. Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients. *J Pharm Pharmacol* 2007;59:409-17.
31. Malvy DJ, Arnaud J, Burtshy B, Sommelet D, Leverger G, Dostalova L, et al. Antioxidant micronutrients and childhood malignancy during oncological treatment. *Med Pediatr Oncol* 1997;29(3):213-7.
32. Kennedy DD, Ladas EJ, Rheingold SR, Blumberg J, Kelly KM. Antioxidant status decreases in children with acute lymphoblastic leukemia during the first six months of chemotherapy treatment. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44(4):378-85.
33. Drabko K, Bojarska-Junak A, Kowalczyk J. Activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase and concentrations of malonyldialdehyde, vitamin E, total antioxidant status and extracellular cytokines concentrations in

- children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Med Wieku Rozwoj* 2006;10:861-8.
34. Hunnisett A, Davies S, McLaren-Howard J, Gravett P, Finn M, Gueret-Wardle D. Lipoperoxides as an index of free radical activity in bone marrow transplant recipients. Preliminary observations. *Biol Trace Elem Res* 1995;47:125-32.
35. Er TK, Tsai SM, Wu SH, Chiang W, Lin HC, Lin SF, et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clinical Biochemistry* 2007;40:1015-9
36. Popadiuk S, Renke J, Wozniak M, Korzon M. Does chemotherapy and radiotherapy influence the level of oxidative stress in children with malignant bone tumours? *Med Wieku Rozwoj* 2006;10:855-9.
37. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT. Antioxidant enzyme activities and production of MDA and 8-oxo-dg in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1286-92.
38. Sentuërker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Muësluëmanoglu H, Gedikoglu G, et al. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett* 1997;416:286-90.
39. Madej JA, Kaszubkiewicz C, Radzanowska G. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in mice with natural lymphocytic leukemia *Pol Arch Weter* 1988;28:25-34.
40. Nishiura T, Suzuki K, Kawaguchi T, Nakao H, Kawamura N, Taniguchi M, et al. Elevated serum manganese superoxide dismutase in acute leukemias. *Cancer Lett* 1992;62:211-5.

41. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide in human tumor cells. *Cancer Res* 1991;51:794-8.
42. Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 2003;101:4098-104.
43. Silber R, Farber CM, Papadopoulos E, Nevrla D, Liebes L, Bruck M, et al. Glutathione Depletion in Chronic Lymphocytic Leukemia B Lymphocytes. *Blood* 1992;80:2038-43.
44. Maldonado PA, Negrini LA, Kaizer RR, Zanin RF, Araújo MM, Battisti V, et al. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. *Clin Chim Acta* 2006;366:174-8.
45. Singh V, Kharb S, Ghalaut PS, Gupta S. Serum vitamin E in chronic myeloid leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44:378-85.
46. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:7-22.
47. Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 2002;76:703-16.

Table 1: General characteristics of patients

| General characteristics | | Just diagnosed | Remission Induction | Remission Maintenance | Out of treatment |
|---|--------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Age range (years) | | 3-17 | 3-19 | 3-23 | 4-20 |
| Sex | Male | 5 | 12 | 15 | 15 |
| | Female | 5 | 8 | 10 | 10 |
| Risk | LR | 5 | 8 | 13 | 12 |
| | HR | 5 | 12 | 12 | 13 |
| Type | B | 5 | 13 | 21 | 19 |
| | T | 5 | 7 | 4 | 6 |
| Hematological features in blood | | | | | |
| WBC (10^3 mm^3) | | 66.0±38.1 ^a | 4.9±1.2 ^b | 3.9±0.3 ^b | 7.0±0.4 ^b |
| Lymphocytes (10^3 mm^3) | | 9.7±4.8 ^a | 1.3±0.2 ^b | 1.1±0.1 ^b | 2.4±0.1 ^b |
| Hb (g/dl) | | 7.2±0.8 ^a | 8.0±0.6 ^a | 11.5±0.2 ^b | 13.2±0.2 ^c |
| Platelets (10^3 mm^3) | | 56.6±15.5 ^a | 191.4±32.9 ^b | 230.6±19.5 ^b | 250.0±16.9 ^b |
| Erythrocytes (millions/mm ³) | | 2.5±0.3 ^a | 2.6±0.2 ^a | 3.67±0.1 ^b | 4.67±0.3 ^c |
| Blasts (10^3 mm^3) | | 27.7±13.1 | - | - | - |

HR: high recurrence risk, LR: low recurrence risk, WBC: white blood cell count, Hb: hemoglobin.

Data are presented as mean \pm SEM

Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 1.

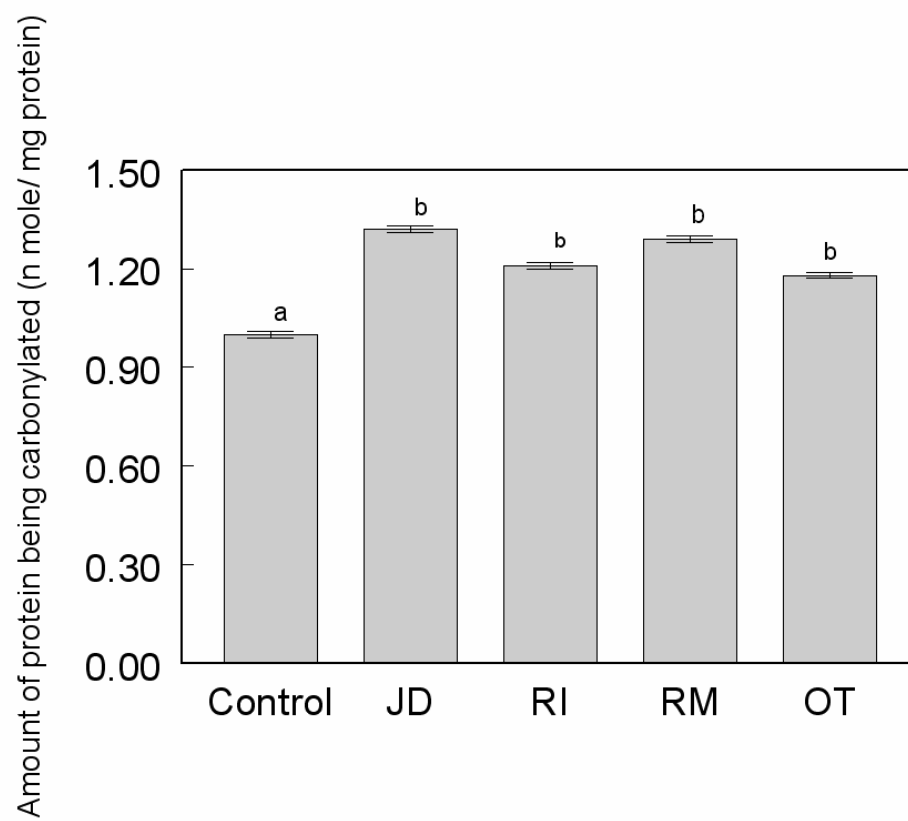


Fig 2.

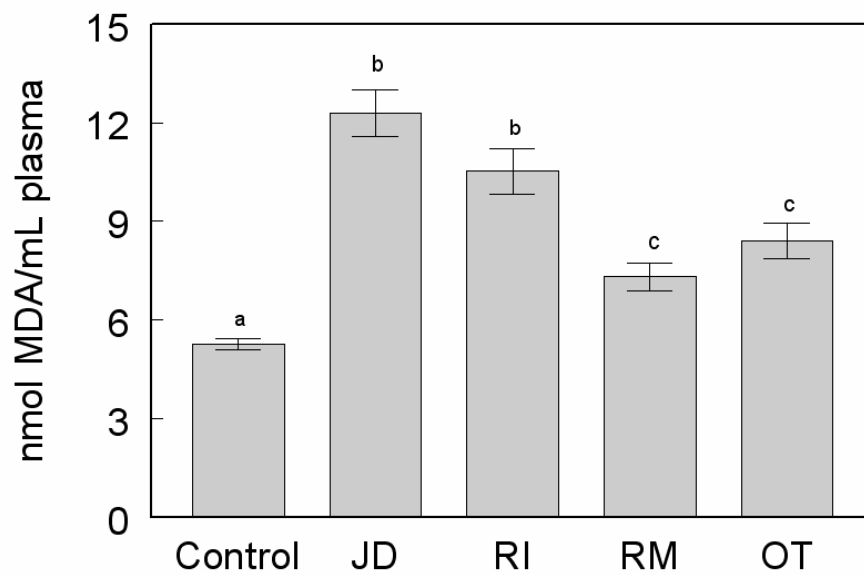


Fig 3.

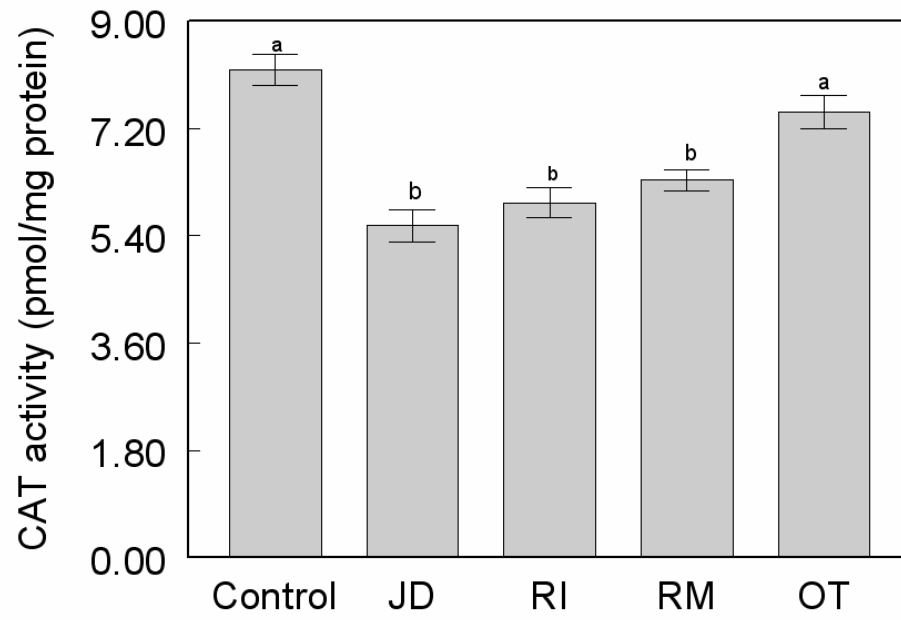


Fig 4.

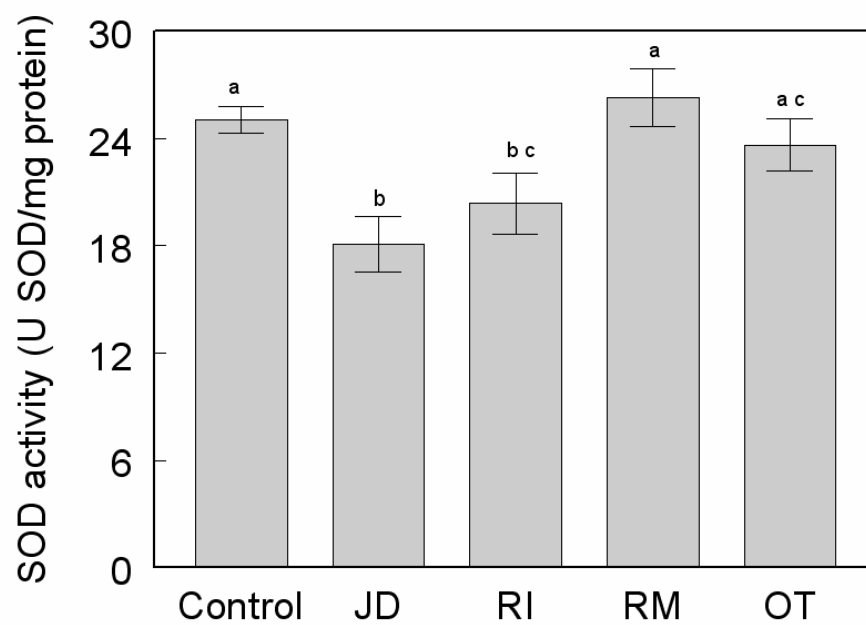


Fig 5.

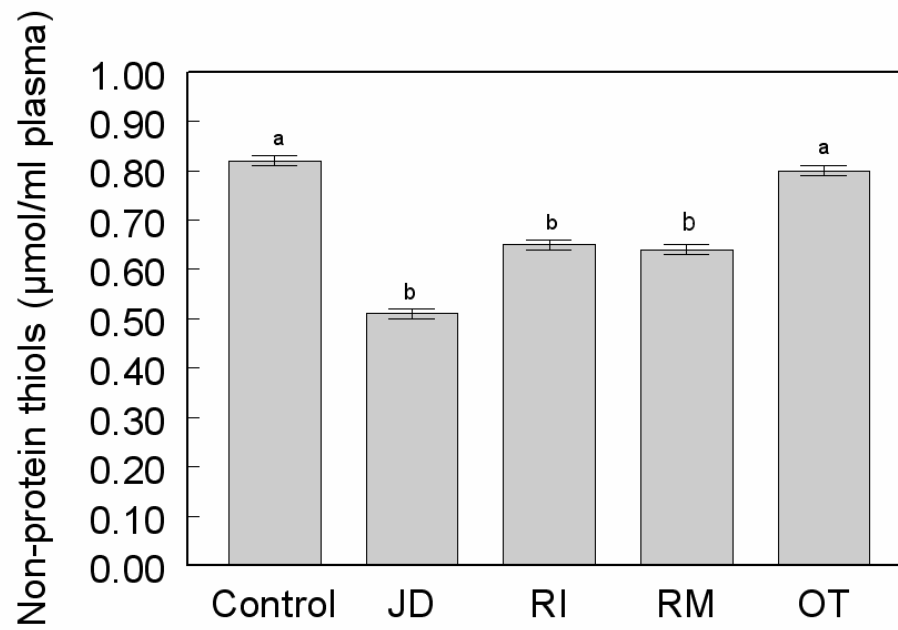


Fig 6.

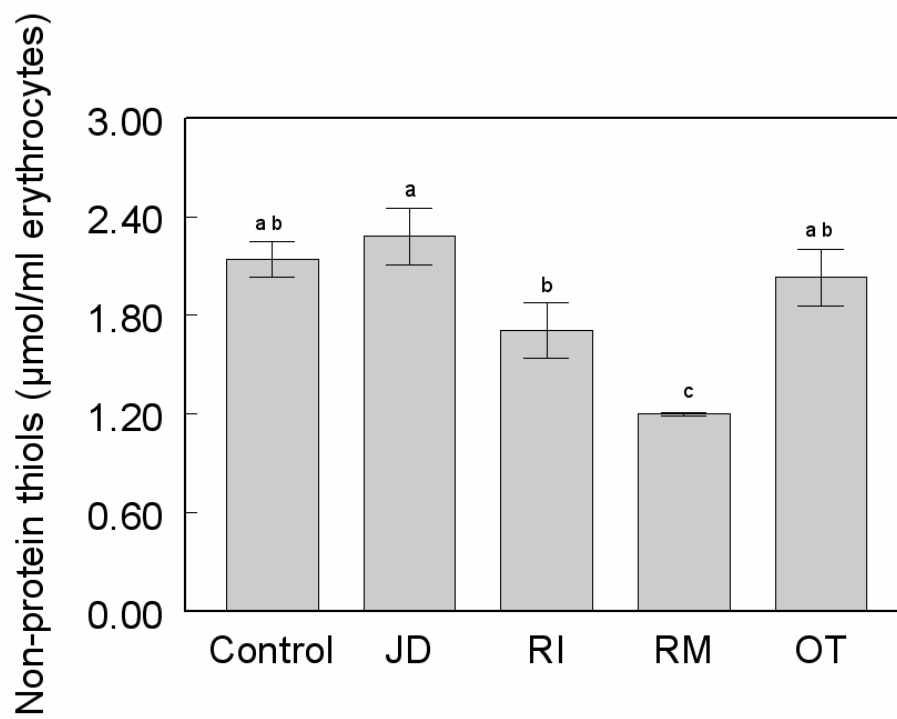
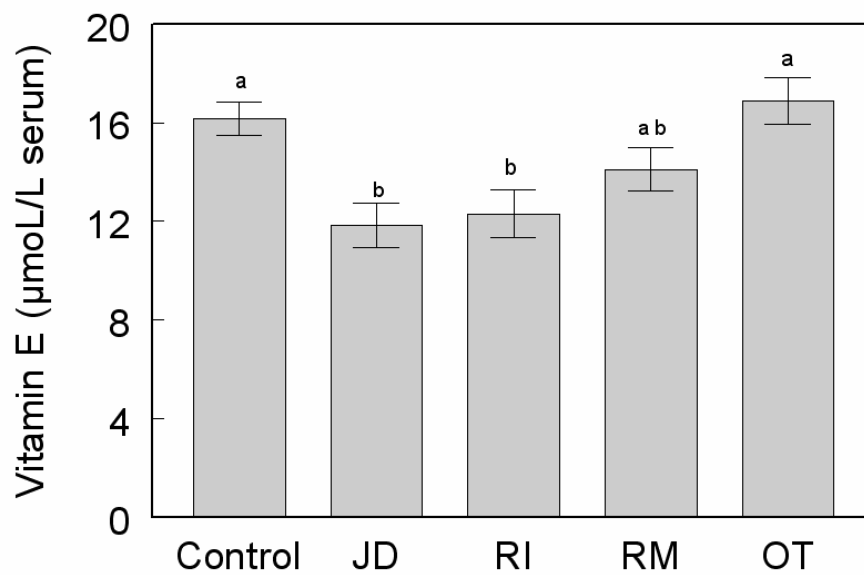


Fig 7



Legends

Fig 1. Protein carbonylation content in serum of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=18), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 2. TBARS levels in plasma of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=20), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=22) groups. Controls consisted of 44 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 3. CAT activity in total blood of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=20), remission maintenance (RM, n=22) and out-of-treatment (OT, n=17) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 4. SOD activity in total blood of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=18), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 5. Non-protein thiol levels in plasma of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=19), remission maintenance (RM, n=24) and out-of-treatment (OT, n=21) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 6. Non-protein thiol levels in erythrocytes of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=8), remission induction (RI, n=17), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=23) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 7. Vitamin E content in serum of ALL patients. Patients were divided into: just diagnosed (JD, n=10), remission induction (RI, n=17), remission maintenance (RM, n=20) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 40 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.D. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Changes in Acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients.

Vanessa Battisti^a, Liési D. K. Maders^a, Karen F. Santos^a, Margarete D. Bagatini^a, Maísa C. Correa^a, Rosélia M. Spanevello^b, Maria do Carmo Araújo^c, Maria R. C. Schetinger^a, Vera M. Morsch^{a*}

^aDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^cHospital Universitário de Santa Maria - HUSM, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Corresponding author:

Dr. Vera Maria Morsch

Departamento de Química

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria RS Brasil - 97105-900

E-mail: veramorsch@gmail.com

Fax: + 55-55-3220-8978

Abstract

Background: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a type of cancer that affects lymphocytes and it is the most common type of cancer in children. Acetylcholinesterase (AChE) is well known as having non-cholinergic functions and has been detected in the blood and plasma of humans including in lymphocytes. Thus, we investigated whole blood and lymphocyte AChE activity in patients with ALL.

Methods: This study was performed on 72 children with ALL divided into 4 groups: newly diagnosed, remission induction, remission maintenance and out-of-treatment and one control group of 50 healthy subjects. We determined AChE activity in whole blood and lymphocytes of these patients

Results: Results demonstrated that whole blood AChE activity was enhanced in the newly diagnosed group and reduced in the remission induction and remission maintenance groups in relation to the control group. For lymphocyte AChE activity we found an increase in the newly diagnosed group and a decrease in the remission induction group in relation to the control.

Conclusions: These results suggest that AChE activity was altered in ALL patients. This fact may be related with the essential role played by AChE in the development of hematological disease and its contribution to the regulation of immune function.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), acetylcholinesterase, lymphocyte, whole blood.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a disease characterized by the uncontrolled proliferation and maturation arrest of lymphoblasts (progenitor cells of T and B lymphocytes) invading the bone marrow, the peripheral blood and other organs [1]. Pre-B cell ALL accounts for the majority of patients (80%), while about 15% of cases are of the pre-T cell type. It is the most common form of cancer in children, accounting for approximately 25% of all pediatric tumors. Childhood leukemia and other cancers may stem from a combination of genetic susceptibility factors and environmental exposure [2]. ALL is a curable disease with an expected long term survival rate of at least 70%, when treated with modern therapeutic regimens. In general, ALL standard treatment protocols consist of induction and maintenance remission with chemotherapeutic drugs [3].

In ALL, as in other malignant diseases, the balance between cell proliferation and apoptosis is dysregulated [4, 5]. Furthermore, recurrent infections are frequent in these patients, due to abnormalities in lymphocyte function, as well as to immunosuppression induced by the treatment [6, 7].

Despite being the object of studies over a long period of time, little is known about the origin or function of acetylcholine (ACh) in the blood. However, the available data have demonstrated that ACh in the blood appears to be involved in the activation and clonal expansion of lymphocytes [8, 9] and also plays a role in immune modulation [10]. Several investigations have provided evidence that immune cells possess a complete cholinergic system consisting of ACh muscarinic and nicotinic receptors (mAChR and nAChR, respectively), choline acetyltransferase (ChAT) and

acetylcholinesterase (AChE) [11, 12]. The complete cholinergic repertoire of immune cells is termed “the lymphocytic cholinergic system” [11].

ACh has been reported to be involved, as a neuroimmunomodulator, in the regulation of interactions between the nervous and immune systems [13]. Stimulation of T- and B-lymphocytes with their respective activators or cell surface molecules leads to up-regulation of ACh synthesis and mAChR expression [14]. Immunological activation of lymphocytes *in vivo* thus appears to enhance cholinergic signal transmission between T-lymphocytes and target cells, including B-lymphocytes, by enhancing the synthesis and release of ACh by lymphocytes and the expression of muscarinic receptors in both T- and B-lymphocytes [11].

The literature data have demonstrated that one of the main mechanisms responsible for appropriate cholinergic function is performed by the AChE enzyme [15]. AChE is a membrane-bound enzyme mainly found in the brain, muscles, erythrocytes, cholinergic neurons and lymphocytes. It plays a major role in the regulation of several physiological events [16, 17] by hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine in cholinergic synapses [18].

Although best known as the enzyme that hydrolyses ACh, AChE is now widely accepted as having additional non-enzymatic functions [18, 19]. Interestingly, various observations have also indicated the possibility of a comparable, novel role for AChE in nonneuronal tissue, including tumours [20, 21]. Another important aspect is that studies have revealed that many anticancer drugs can inhibit different enzymes, including AChE, *in vitro* and *in vivo* [22, 23]. However, little is known about the inhibitory effect of Cytarabine and Methotrexate, drugs used in the induction and maintenance chemotherapy regimen for ALL patients, on blood AChE [24].

Considering the important role of the extraneuronal cholinergic system in the immune function, as well as in cell activation and clonal expansion, the present study was designed to investigate the activity of AChE enzymes in lymphocytes and whole blood of patients newly diagnosed with ALL as compared to that in the different stages of treatment and after therapy.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The sample consisted of 72 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients newly diagnosed and under treatment at the Oncology-Hematology Laboratory – Hospital of the Federal University of Santa Maria. The controls consisted of 50 healthy volunteers with ages similar to those of the patients. They presented no acute or chronic diseases such as diabetes, parasitosis or any immune dysfunction. Also, the controls used in this study had normal leukocytes and other blood cell counts and made no use of pharmacological therapy. Patients included in this study received the diagnosis for ALL, which is based on the following findings: leukocyte count, age, involvement of tissues other than bone marrow, immunophenotyping and responsiveness to the treatment. Patients were diagnosed and treated according to the GBTLI LLA-99 protocol [25] defined by the Brazilian Group of Childhood Leukemia Treatment.

The treatment with chemotherapeutic agents consists of two phases: remission induction and remission maintenance. The first phase starts with induction

therapy, using multiple chemotherapeutic drugs, followed by consolidation. Remission maintenance is a long phase, in which patients undergo up to 84 weeks of chemotherapeutic agents. After these phases, patients have follow-ups with periodic laboratorial exams to eliminate the possibility of recurrence. Taking this into account, we selected four patient groups: The first group was composed of 12 patients (ages ranged from 3-17 years) newly diagnosed with ALL who had not received any therapy preceding the blood sampling. The second group was composed of 15 patients (ages ranged from 3-19 years) undergoing treatment in the first phase, remission induction. The third group was composed of 25 patients (ages ranged from 3-23 years) in the second phase of treatment, called remission maintenance. 20 patients out of treatment (ages ranged from 4 -20 years) constituted the fourth group.

Consent was given by family members of all the patients included in this study. The Human Ethics Committee from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 51/06. The patients' general characteristics are shown in Table 1.

2.2. Chemicals

Acetylthiocholine iodide (ASCh), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Ellman's reagent) and Triton X-100 were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany), ethopropazine hydrochloride from Aldrich (Steinheim, Germany). Ficoll Hypaque (Lymphoprep™) was purchased from Nycomed Pharma (Oslo, Norway). All the other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

2.3. Sample preparation

The blood was collected in vacountainer tubes using EDTA as anticoagulant. For AChE activity in whole blood, the samples were hemolized with phosphate buffer 0.1M, pH 7.4 containing Triton X -100 (0.03%) and stored at -20 °C for one week. For AChE activity in lymphocytes, the peripheral lymphocytes were isolated and AchE activity was determined immediately.

2.4. Isolation of the cells

The peripheral lymphocytes were isolated using Ficoll Hypaque density gradient as described by Böyum [26]. After separation, only samples with at least 95% of lymphocytes, as verified in the coulter STKS (Miami-USA) were used. Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of cells, excluding 0.1% trypan blue, and measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity [27].

2.5. Hematological determinations

Quantitative determinations of blood cells obtained by venipuncture were performed using a Coulter-STKS analyzer (Miami, USA).

2.6. Whole blood AChE activity

Whole blood AChE activity was determined by the method of Elmann et al. [28] modified by Worek et al. [29]. To achieve temperature equilibration and complete reaction of sample matrix sulfhydryl groups with DTNB, the mixture was incubated for

10 min prior to addition of substrate. Enzyme activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and DTNB degradation. The butyrylcholinesterase (BChE EC 3.1.1.8) was inhibited by ethopropazine. AChE activity was measured at 436 nm and 37°C using polystyrol cuvetts. The activity of whole blood AChE was calculated from the quotient between AChE activity and protein content and the results are expressed as $\mu\text{mol/ h/ mg}$ of protein.

2.7. Lymphocyte AChE activity

After isolation of the lymphocytes, AChE activity was determined according to the method described by Ellman et al. [28] modified by Fitzgerald and Costa [30]. Briefly, proteins of all samples were adjusted to 0.1 - 0.2 mg/mL. 0.2 mL of intact cells were added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (ATC), 0.1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30 min at 27° C the absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE was calculated from the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content and the results are expressed as $\mu\text{mol/ h/ mg}$ of protein.

2.8. Activity of AChE in the presence of antineoplastic drugs (Metotrexate and Cytarabine) in vitro

The concentrations utilized for metotrexate *in vitro* were 0, 1, 3, 5, 8 and 12 μM . The concentrations utilized for cytarabine *in vitro* were 0, 1, 2, 20, 40 and 80 μM .

All concentrations used in vitro represented, approximately, the mean plasma values of the medications.

2.9. Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford [31] using bovine serum albumin as standard.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was done by the commercial SPSS package for Windows©. All the data are expressed as the mean \pm standard error. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by the Duncan's multiple test. Differences were considered significant when the probability was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Sample and viability

The percentage of disrupted lymphocytes was less than 5% after separation (data not shown). These results indicate that the cells were predominantly intact.

3.2. Hematological determinations

Table 1 presents the patient's general characteristics and blood cell count. The presence of blast cells was observed in the newly diagnosed group. White blood cell count, including lymphocytes was elevated in the newly diagnosed group and

platelet count was diminished in these patients. Hemoglobin and erythrocytes were decreased in the newly diagnosed and remission induction groups.

3.3. Whole blood AChE activity

Post-hoc comparisons made by Duncan's test revealed that the AChE activity in total blood was increased in the newly diagnosed group and reduced in the remission induction and remission maintenance groups, ($F(4,117) = 13.55$; $p < 0.001$), while it was not significantly different for the out-of-treatment group in relation to the controls (Figure 1).

3.4. Lymphocyte AChE activity

Lymphocyte AChE activity is shown in Figure 2. It can be observed that there was a significant difference between the patients and the controls. AChE activity was increased in the newly diagnosed group and reduced in the remission induction group when compared to controls ($F(4,117) = 10.96$; $p < 0.001$). No significant difference was observed between the out-of-treatment group and controls.

3.5. AChE activity in the presence of antineoplastic drugs (Methotrexate and Cytarabine) in vitro:

In vitro, concentrations ranging from zero to 12 μM for methotrexate and from zero to 80 μM for cytarabine were used. Methotrexate at the concentration of 8 μM inhibited AChE activity in both whole blood and lymphocytes. In whole blood, the

percentage of activity was 90% of control, and in lymphocytes was 94% of control (Figure 3).

Using cytarabine, the post hoc comparison by Duncan's test disclosed an inhibition only in lymphocyte AChE activity. At the concentration of 80 μMol the percentage of activity in the lymphocytes was 93% of control (Figure 4).

4. Discussion

ALL occurs in children as well as in adults. The incidence rate changes with age [1], but it is more prevalent and has a better prognosis in children. This disease is diagnosed on the basis of clinical history, physical examination and a complete hemogram. Patients with ALL can have a high, normal or low white blood cell count. The lymphoblasts replace the normal marrow elements, resulting in a marked decrease in the production of normal blood cells. Our results indicated that, anemia, thrombocytopenia, and neutropenia occur at varying degrees in patients newly diagnosed with ALL.

The putative involvement of AChE in the etiology of hematocytopenic disorders is of particular importance in view of multiple reports [32, 33, 34]. Our results show an increase in the whole blood and lymphocyte AChE activity in ALL patients, before the start of chemotherapy treatment, in other words, in the period where the ALL is in progression. This result can indicate that stimulation of lymphocytes activates the lymphocytic cholinergic system as evidenced by the increase of AChE activity. Furthermore, it may suggest the essential role played by AChE in the development of hematological disease, as previously described by Bukowska [35].

One important data observed is that our findings on AChE activity in cancer cells are in accordance with AChE expression verified by Soreq [34]. According to Soreq, AChE and BChE genes are amplified, mutated, and/or aberrantly expressed in a variety of human tumor types. These changes could be the result of chromosome breakage, since there is an unusually high frequency of chromosomal abnormalities in such tumors, particularly hemopoietic malignancies.

Moreover, our results are in accordance with Szelenyi [36], who describes a significant increase in AChE activity and mAChR expression in normal human peripheral blood lymphocytes as an early response to various stimuli. This author suggests that the higher initial AChE activity of cultured leukemic cell lines probably reflects their permanently activated state. On the other hand, according to Bartha [37], a mixed cell population derived from chronic leukemia patients had significantly lower enzyme activity than controls.

In this study, the lymphocyte AChE activity in the remission induction group, in the first phase of chemotherapy using multiple chemotherapeutic drugs, was reduced when compared to controls. In addition, this study revealed that the AChE activity in whole blood was reduced in both phases of treatment, the remission induction and remission maintenance groups. This reduction in enzyme activity may be due to immunosuppression induced by the chemotherapy treatment, since the literature reveals that many anticancer drugs can inhibit different enzymes in vitro and in vivo [23].

The decreased AChE activity found in lymphocytes and whole blood of patients under treatment means that such impairment affects the normal function of the immune system. Besides the impaired function of lymphocytes, the

immunodeficiency observed in ALL patients under treatment is also related to the cytotoxic effects induced by drugs used to achieve blast (immature lymphoid cells) remission [38].

Another important aspect to be discussed is that no significant difference was observed between the out-of-treatment and control groups for whole blood and lymphocyte enzyme activities. We suggest that these findings may be a consequence of the amount of time elapsed after the treatment, demonstrating that the treatment was in fact efficient.

When AChE activity was measured in the presence of methotrexate at the concentration of 8 μM *in vitro*, its activity was inhibited in both whole blood and lymphocytes. These results are in accordance with Kamal et al. [39] who investigated the interaction of antineoplastic drugs with human erythrocyte membrane-bound AChE and found an *in vitro* inhibition by the antineoplastic drug methotrexate. On the other hand, when cytarabine was present, an inhibition only occurred in lymphocyte AChE activity. However, information on the effect of cytarabine in AChE activity is rare.

Taken together, these findings suggest that cell activation is a key modulator of the non-neuronal cholinergic system. Thus, it is likely that a local lymphocytic cholinergic system is involved in regulating immune function. Changes in lymphocyte AChE activity, therefore, reflect immune deficiency related to cell dysfunction.

Moreover, blood AChE appears to be involved in the development of hematological disease. In addition, it is interesting that whole blood and lymphocyte AChE activities are modified by antineoplastic drugs. Accordingly, the non-enzymatic function of AChE could make it a novel investigative target for the clinical

management of cancer. Thus, we can suggest that future studies be carried out in order to determine the involvement of the enzyme in the immune response and in the development of cancer.

Acknowledgement

The authors wish to thank all the ALL patients and the professionals at the Hematology-Oncology Laboratory (HUSM) for their support.

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

References

- [1] Plasschaert SLA, Kamps WA, Vellenga A, Vries EGE, De Bont ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? *Cancer Treat Rev* 2004;30:37-51
- [2] Sinnott D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. *Fam Cancer* 2006;5:35–47
- [3] Igarashi S, Manabe A, Ohara A, et al. No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol* 2005;23:6489-6498
- [4] Schuler D, Szende B. Apoptosis in acute leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 661-666
- [5] Lin CW, Taghi M, Jilani I, et al. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002;26:551-559

- [6] Zhang XL, Komada Y, Zhou YW, et al. Inhibition of interleukin-2 receptor (CD25) expression induced on T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:41
- [7] Mazzur B, Szczepanski T, Karpe J, Sonta-Jakimczyk D, Bubala H, Torbus M. Decreased number of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2006;30:33-36
- [8] Ikeda, C., Morita I, Mori A, et al. Phorbol ester stimulates acetylcholine synthesis in cultures endothelial cells isolated from porcine cerebral microvessels. *Brain Res* 1994;665:147-152
- [9] Masturzo P, Salmona M, Nordstrom O, Consolo S, Ladinski H. Intact human lymphocyte membranes respond to muscarinic receptor stimulation by oxotremorine with marked changes in microviscosity and an increase in cyclic GMP. *FEBS Lett* 1985;192:194-198
- [10] Rinner I, Schauenstein K. The parasympathetic nervous system takes part in the immuno-neuroendocrine dialogue. *J. Neuroimmunol* 1991;34:165-172
- [11] Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 2003;72:2101-2109
- [12] Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, Amenta F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 2002;132:147-155
- [13] Maslinski W. Cholinergic receptors of lymphocytes. *Brain Behav Immun* 1989;3:1-14
- [14] Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and Therapeutics* 2000;86:29-48

- [15] Appleyard ME. Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends Neurosci* 1992;15:485-490
- [16] Milatovic D, Dettbarn WD. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;136:20-28
- [17] Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB, et al. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem Res* 2000;25:949-955
- [18] Silman J, Sussman L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'nonclassical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:293-302
- [19] Greenfield S, Vaux DJ. Parkinson's disease, Alzheimer's disease and motor neurone disease: identifying a common mechanism. *Neuroscience* 2002;113:485-492.
- [20] Small DH, Michaelson S, Sberna G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 1996;28:453-483
- [21] Onganer PU, Djamgoz MBA, Whyte K, Greenfield SA. An acetylcholinesterase-derived peptide inhibits endocytic membrane activity in a human metastatic breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:415-420
- [22] Al-Jafari AA. The toxicological effect of cyclophosphamide on acetylcholinesterase activity. *Toxicol Lett* 1993;66:125-131
- [23] Al-Jafari AA, Duhaiman AS, Kamal MA. Inhibition of human acetylcholinesterase by cyclophosphamide. *Toxicology* 1995;96:1-6
- [24] Al-Jafari AA, Al-Khwyter F, Kamal MA, Alhomida AS. Kinetics for Camel (*Camelus dromedarius*) retina acetylcholinesterase inhibition by methotrexate in vitro. *Jpn J Pharmacol* 1996;72:49-55

- [25] Protocolo GBTLI LLA-99, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.
- [26] Böyum 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;97:77-89
- [27] Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Deerfield Beach 1983.
- [28] Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95
- [29] Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold D, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Chim Clin Acta* 1999;288:73-90
- [30] Fitzgerald BB, Costa LG. Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 1993;20:210-216
- [31] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:218-254
- [32] Deutsch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34 hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp Hematol* 2002;30:1153-1161
- [33] Lapidot-Lifson Y, Prody CA, Ginzberg D, Meytes D, Zakut H, Soreq H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in

blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis.

Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:4715-4719

[34] Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H. A role for cholinesterases in tumorigenesis?

Cancer Cells. 1991;3:511-516

[35] Bukowska B. Acetylcholinesterase-apoptosis induction, role in neurological diseases and leukemia. Postepy Biochem 2005;51(2):154-561

[36] Szelényi J, Páldi-Haris P, Hollán S. Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. Immunol Lett 1987;16:49-54

[37] Bartha E, Szelényi JG, Hollán SR. Acetylcholinesterase (AChE) activity of lymphocytes in chronic lymphoid leukemia (CLL). Leuk Res 1982;6(6):861-864

[38] Brotdman DH, Rosenthal DW, Redner A, Lanzkowski P, Bonagura V. Immunodeficiency in children with acute lymphoblastic leukemia after completion of modern aggressive chemotherapeutic regimens. J Pediatr 2005;146:654-661

[39] Kamal MA, Nasim FH, Al-Jafari AA. In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase (EC3.1.1.7) by an antineoplastic drug methotrexate Mol Cell Biochem. 1996;159(1):47-53

Table 1: General characteristics of patients

| General characteristics | | Newly diagnosed | Remission Induction | Remission Maintenance | Out of treatment |
|---|--------|-------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|
| Age range (years) | | 3-17 | 3-19 | 3-20 | 4-20 |
| Sex | Male | 7 | 9 | 15 | 12 |
| | Female | 5 | 6 | 10 | 8 |
| Risk | LR | 6 | 3 | 13 | 9 |
| | HR | 6 | 12 | 12 | 11 |
| Type | B | 7 | 11 | 21 | 15 |
| | T | 5 | 4 | 4 | 5 |
| Hematological features in blood | | | | | |
| WBC (10^3 mm^3) | | 63.0 ± 31^a | 4.7 ± 1.4^b | 3.7 ± 0.3^b | 6.9 ± 0.3^b |
| Lymphocytes (10^3 mm^3) | | 10.8 ± 4.0^a | 1.5 ± 0.4^b | 1.4 ± 0.1^b | 2.7 ± 0.1^b |
| Hb (g/dl) | | 6.9 ± 0.7^a | 7.2 ± 0.6^a | 13.2 ± 0.2^b | 11.2 ± 0.3^c |
| Platelets (10^3 mm^3) | | 57.5 ± 13.2^a | 187.4 ± 36.5^b | 232.6 ± 20.3^b | 254.0 ± 14.4^b |
| Erythrocytes (millions/mm ³) | | 2.38 ± 0.2^a | 2.4 ± 0.2^a | 3.3 ± 0.2^b | 4.7 ± 0.2^c |
| Blasts (10^3 mm^3) | | 22.6 ± 10.5 | - | - | - |

HR: high recurrence risk, LR: low recurrence risk, WBC: white blood cell count, Hb: hemoglobin.

Data are presented as mean \pm S.E.

Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig 1.

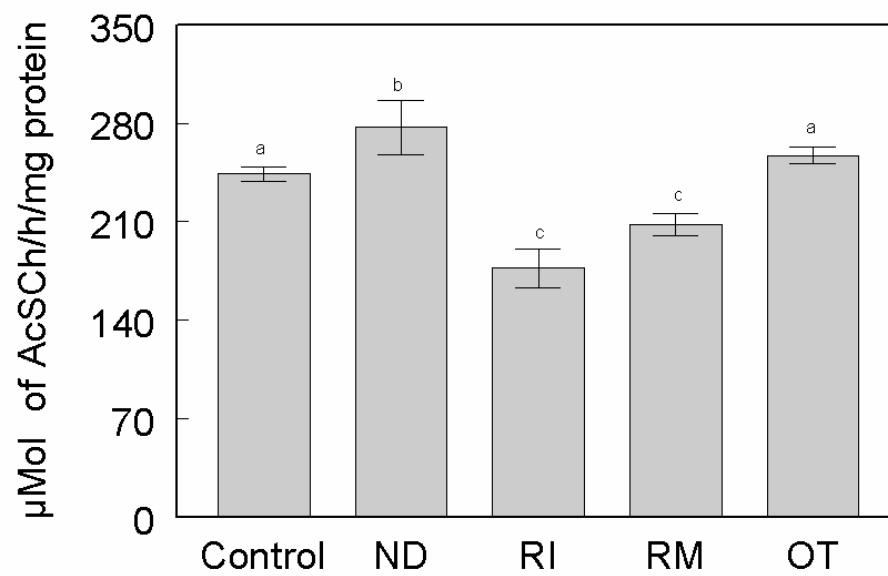


Fig 2.

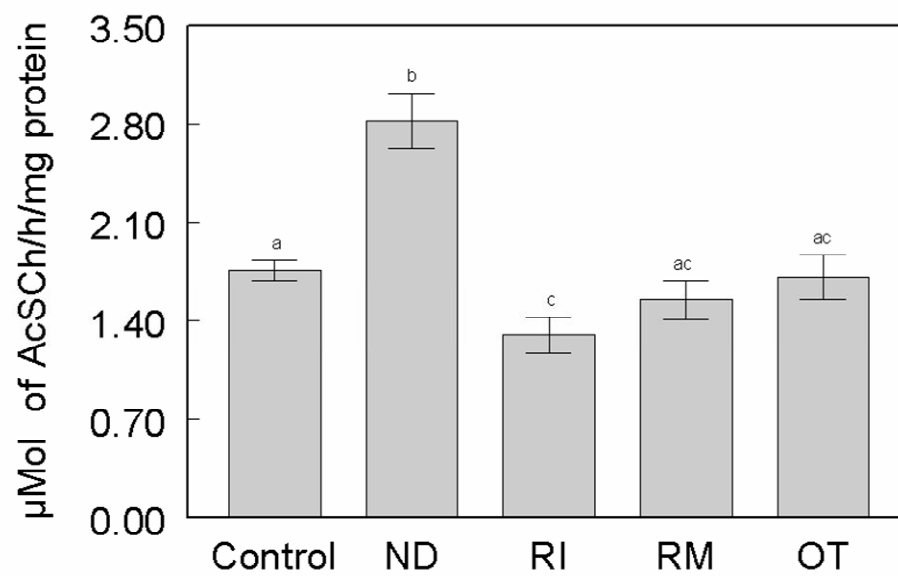


Fig 3.

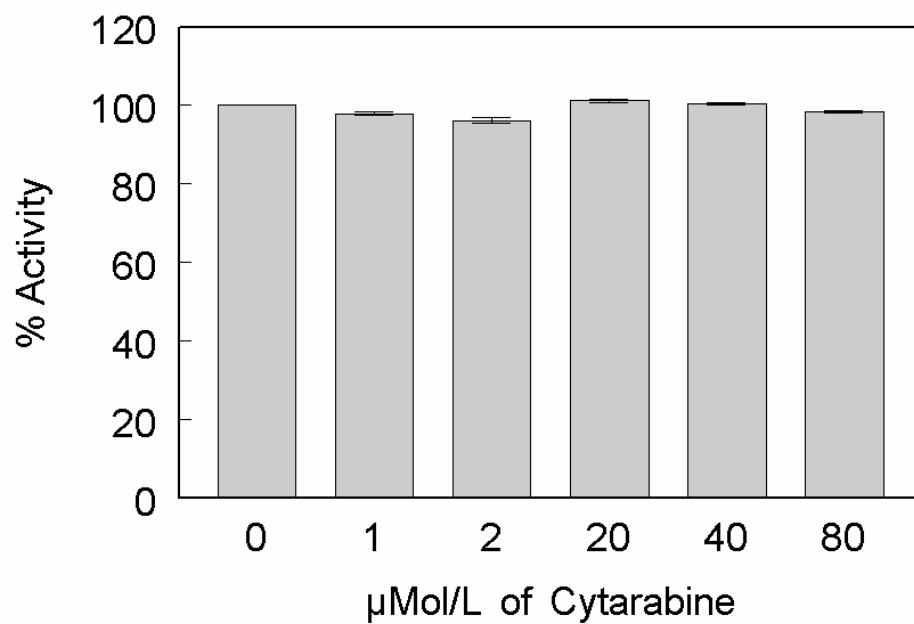


Fig 4.

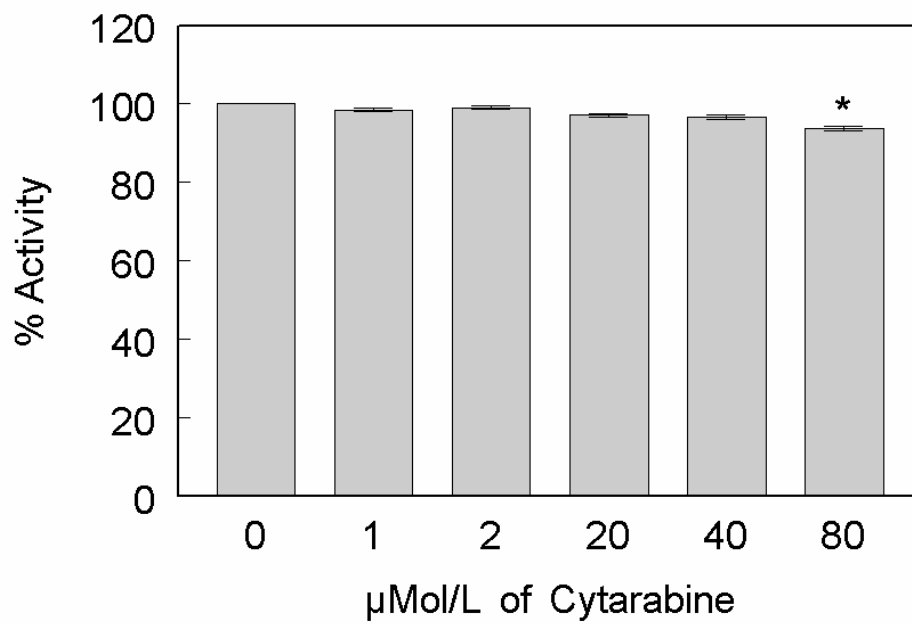


Fig 5.

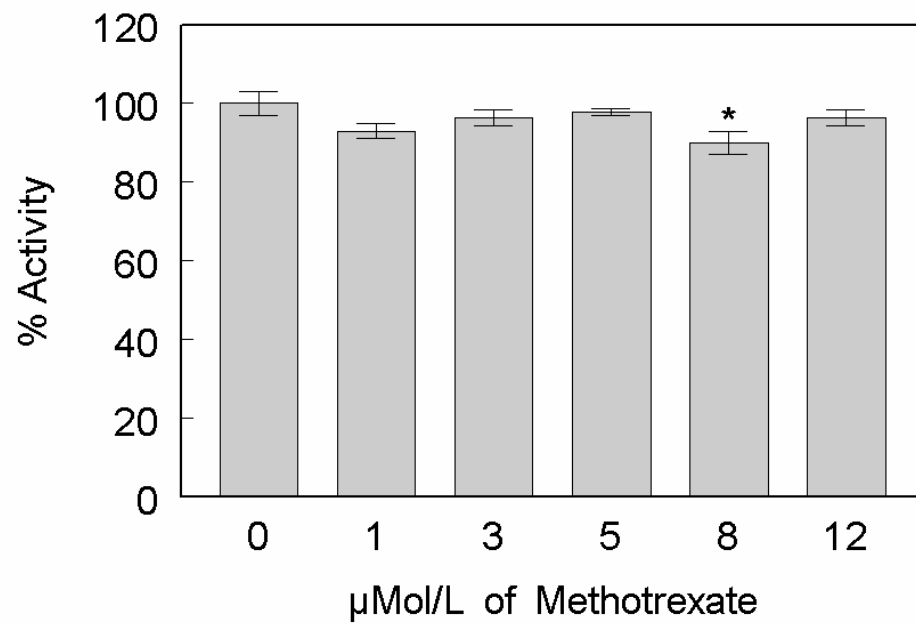


Fig 6.

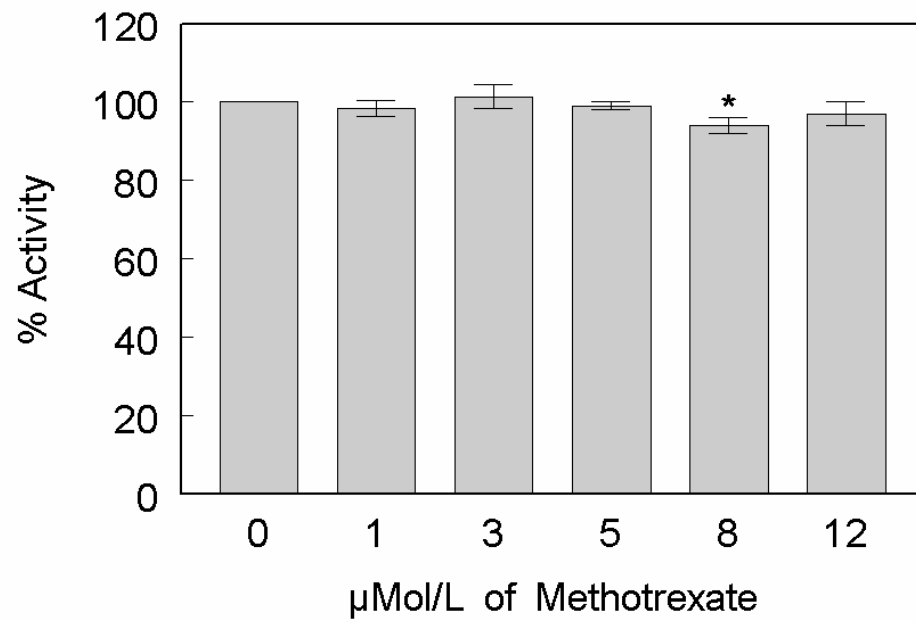


Fig. 1. Total blood AChE activity in ALL patients. Patients were divided into: newly diagnosed (ND, n=12), remission induction (RI, n=15), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig. 2. Lymphocyte AChE activity in ALL patients. Patients were divided into: newly diagnosed (ND, n=12), remission induction (RI, n=15), remission maintenance (RM, n=25) and out-of-treatment (OT, n=20) groups. Controls consisted of 50 healthy subjects. Each column represents mean \pm S.E. Duncan's multiple range test: groups that show different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Fig. 3. Total blood AChE activity in the presence of different concentrations of cytarabine. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean \pm S.E. (* $p < 0.05$).

Fig. 4. Lymphocyte AChE activity in the presence of different concentrations of cytarabine. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean \pm S.E. (* $p < 0.05$).

Fig. 5. Total blood AChE activity in the presence of different concentrations of methotrexate. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean \pm S.E. (* $p < 0.05$).

Fig. 6. Lymphocyte AChE activity in the presence of different concentrations of methotrexate. All experiments were repeated at least three times and similar results were obtained. Each column represents mean \pm S.E. (* $p < 0.05$).

4 DISCUSSÃO

A LLA é mais prevalente e possui um melhor prognóstico na população pediátrica. É uma desordem maligna caracterizada pelo acúmulo de precursores linfocíticos chamados blastos. Na LLA, ocorre um desequilíbrio entre os processos de apoptose e de proliferação celular, havendo uma maior sobrevivência das células clonais malignas, além de um aumento na suas taxas de proliferação. Estudos têm demonstrado que alterações nas defesas antioxidantes e aumento na produção de espécies reativas acompanham o processo de desenvolvimento do câncer. Além disso, outros autores sugerem o importante envolvimento da enzima acetilcolinesterase na etiologia de desordens hematopoiéticas (Lapidot-Lifson et al., 1989; Soreq et al., 1991).

Segundo Al-Gayyar et al. (2007), as células leucêmicas produzem uma maior quantidade de espécies reativas do que as células normais o que leva a um maior dano oxidativo. No entanto, informações sobre a atividade das enzimas antioxidantes na LLA são contraditórias. Além disso, na literatura ainda não há um estudo comparando o perfil oxidativo de pacientes com LLA antes, durante e após a quimioterapia.

O presente estudo mostrou níveis de MDA aumentados tanto no grupo recém diagnosticado, quanto no grupo da indução da remissão. Nos pacientes dos grupos manutenção e fora de tratamento, os níveis de MDA foram menores do que nos grupos recém diagnosticados e em indução da remissão, porém ainda mais altos que no grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com Al-Gayyar et al. (2007), Drabko et al. (2006) e Hunnisett et al. (1995) que investigaram este marcador em pacientes com leucemia crônica, leucemia aguda e em pacientes que fizeram transplante de medula óssea, respectivamente.

Há poucos estudos investigando o nível de oxidação protéica em pacientes com leucemia. Popadiuk et al. (2006) não encontraram alterações neste marcador quando analisaram estes níveis em crianças com tumores malignos. Em nosso estudo, os níveis de carbonilação protéica estão aumentados em todos os grupos de pacientes. Portanto, a carbonilação de proteínas parece ser uma lesão mais duradoura, já que este parâmetro foi elevado em todos os grupos, incluindo no grupo fora de tratamento. Estes dados podem também sugerir que as lesões oxidativas

estão envolvidas com a patogenia da doença e não ser resultado do tratamento quimioterápico.

Considerando as defesas antioxidantes enzimáticas do organismo, os dados da literatura em pacientes com câncer são controversos. Nossos resultados demonstram níveis diminuídos de SOD e CAT nos pacientes com LLA recém diagnosticados e durante o tratamento quimioterápico. Estes dados podem indicar um distúrbio no papel protetor das enzimas estudadas, o que pode ser resultado da acumulação excessiva de espécies reativas que acompanha o câncer. Oltra et al. (2001) e Senturker et al. (1997) também encontraram atividade da SOD e CAT diminuídas em pacientes com leucemia. Portanto, estes resultados sugerem que na doença em estudo, ocorrem alterações no sistema enzimático antioxidante, o que pode interferir na remoção dos radicais livres e na proteção do organismo frente ao estresse oxidativo.

Quando foram analisadas as defesas antioxidantes não enzimáticas, tióis não protéicos e vitamina E, os resultados deste trabalho demonstraram níveis diminuídos nos pacientes com LLA. Com relação aos tióis em plasma, os níveis foram reduzidos antes e durante o tratamento quimioterápico, já em eritrócitos, os níveis foram diminuídos somente durante a quimioterapia. Evidências prévias sobre o papel dos tióis não protéicos, principalmente da GSH, nas leucemias são conflitantes. Silber et al. (1992) analisando os níveis de GSH em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica encontraram níveis diminuídos, já Oltra et al. (2001) encontraram níveis aumentados deste antioxidante em linfócitos destes mesmos pacientes.

Neste trabalho, os níveis de vitamina E foram diminuídos nos grupos de pacientes recém diagnosticados e no grupo da indução da remissão, resultado similar também foi encontrado por Singh et al. (2005) em pacientes com leucemia mielóide crônica. Dessa forma, os antioxidantes não enzimáticos também se encontram alterados na LLA, o que pode sugerir uma depleção nestes mecanismos de proteção frente às altas concentrações de espécies reativas formadas.

Outro importante fato a ser discutido é que em pacientes fora de tratamento todas as defesas antioxidantes analisadas, tanto enzimáticas quanto não enzimáticas, retornaram aos valores normais, ou seja, não houve diferença entre este grupo e o grupo controle. Sugere-se que este fato ocorreu em consequência do

tempo transcorrido após o final da quimioterapia, demonstrando a eficiência do tratamento.

O envolvimento da AChE na etiologia de desordens hematopoiéticas tem sido estudado por outros autores (Deutsch et al., 2002; Soreq et al., 1991). Nossos resultados indicam um aumento na atividade desta enzima tanto em sangue total quanto em linfócitos de pacientes do grupo recém diagnosticado. Estes resultados podem indicar uma estimulação do sistema colinérgico presente nos linfócitos, evidenciado pelo aumento na atividade da AChE, e refletir o estado ativado destas células. Além disso, pode sugerir o papel essencial desta enzima no desenvolvimento das doenças hematológicas.

Neste estudo, a atividade da AChE nos pacientes dos grupos indução e manutenção da remissão também se mostrou alterada. Quando analisada em linfócitos, a atividade da enzima se mostrou diminuída somente em pacientes do grupo da indução da remissão. Já em sangue total, a atividade foi reduzida nos dois grupos em tratamento quimioterápico. Essa redução pode ter sido devido à imunossupressão induzida pelos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento. No grupo de pacientes fora de tratamento, a atividade da AChE voltou aos níveis próximos ao grupo controle, talvez devido à completa remissão da doença em estudo.

A atividade da AChE foi medida na presença das drogas, metotrexato e citarabina, utilizadas na quimioterapia. Nossos resultados mostraram que estas drogas foram capazes de inibir a enzima em concentrações próximas ao pico de concentração plasmática. Este achado está de acordo com os estudos realizados por Kamal et al. (1996) que analisando a interação da droga metotrexato com a AChE eritrocitária encontraram uma inibição na atividade da enzima.

Os resultados deste trabalho caracterizam a persistência do estresse oxidativo na LLA, o que pôde ser evidenciado pelo aumento nos níveis de danos oxidativos e pela diminuição das defesas antioxidantes. Além disso, as maiores diferenças encontradas nos parâmetros de estresse oxidativo analisados foram entre o grupo recém diagnosticado e o grupo controle, o que pode indicar uma relação entre estas modificações e o desenvolvimento da LLA. Por outro lado, este trabalho indica uma alteração na atividade da enzima AChE sangüínea nos pacientes com

LLA, o que pode estar relacionado com a participação desta enzima no desenvolvimento das desordens hematopoiéticas.

Nossos resultados representam uma importante contribuição no estudo do perfil oxidativo de pacientes com LLA antes, durante e após o tratamento quimioterápico. Porém, mais estudos são necessários para confirmar se as alterações encontradas são causa ou conseqüência do desenvolvimento da LLA. Com relação à enzima AChE, sugere-se que as suas funções não enzimáticas podem ser um novo alvo de investigação para determinar o seu envolvimento na resposta imune e no desenvolvimento do câncer.

5 CONCLUSÕES

- Os danos oxidativos aos lipídeos e proteínas, representados pelos níveis de MDA e conteúdo de carbonilação protéica, respectivamente, indicam o aumento da formação de espécies reativas, as quais estão associadas ao dano biológico celular presente na LLA. Além disso, os níveis de danos oxidativos elevados nos pacientes recém diagnosticados sugerem que estas lesões oxidativas estejam envolvidas na patogenia da LLA e não sejam resultado da quimioterapia.
- A diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas, verificada através da medida da atividade da SOD e CAT, tanto em pacientes recém diagnosticados quanto em pacientes com LLA em tratamento, sugere a existência de um desequilíbrio nas defesas antioxidantes, o que pode interferir na remoção das espécies reativas e na proteção do organismo frente ao estresse oxidativo. Possivelmente, o metabolismo antioxidante esteja danificado em consequência do aumento na produção de espécies reativas que acompanha a LLA.
- Os níveis dos antioxidantes não-enzimáticos avaliados (tióis não protéicos e vitamina E) estão reduzidos em pacientes com LLA, antes e durante o tratamento, o que pode indicar a depleção destes antioxidantes frente às altas concentrações de espécies reativas formados durante este período. Já em pacientes fora de tratamento, os níveis destes antioxidantes voltaram aos valores normais, o que pode sugerir a eficiência do tratamento quimioterápico.
- A atividade da acetilcolinesterase, tanto em linfócitos quanto em sangue total, aumentada em pacientes recém diagnosticados e diminuída nos pacientes em tratamento para LLA, sugere que há uma disfunção do sistema colinérgico em nível periférico acompanhando esta doença.
- Os medicamentos citarabina e metotrexato utilizados no tratamento quimioterápico alteraram a atividade da acetilcolinesterase, de modo que foi observada uma inibição na atividade desta enzima em algumas concentrações utilizadas, o que pode ser um interessante ponto a ser estudado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEM, A.; NORDOBERG, A.; SLANINA, P. A muscarinic receptor type in human lymphocytes: a comparison of ^3H -QNB binding to intact lymphocytes and lysed lymphocyte membranes. **Life Science**, v. 38, p. 1359–1368, 1986.

AL-GAYYAR, M. M.; EISSA, L. A.; RABIE, A. M.; EL-GAYAR, A. M. Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, p. 409-417, 2007.

AL-JAFARI, A. A. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from human erythrocyte by cisplatin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 27, p. 965 -970, 1995.

AL-JAFARI, A. A.; KAMAL, M. A.; DUHAIMAN, A. S. The mode of inhibition of human erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase by cisplatin in vitro. **Journal of enzyme inhibition**, v. 8, p. 281 -289, 1995.

ARRIGO, A. P. Gene expression and thiol redox state. **Free radical biology & medicine**, n. 27, p. 936-944, 1999.

BAKAN, N.; TAYSI, S.; YILMAZ, O.; BAKAN, E.; KUSKAY, S.; UZUN, N.; GUNDOGDU, M. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia, **Clinica Chimica Acta**, v. 338, p. 143-149, 2003.

BALASUBRAMANIAN, A.S. Have cholinesterases more than one function? **Trends in neurosciences**, v. 7, p. 467-468, 1984.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova** v. 29, p. 113, 2006.

BARTOLINI, M.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 407-416, 2003.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free radical biology & medicine**, v. 32, p. 797– 803, 2002.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free theory of aging matures. **Physiological reviews**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BENNEDITO, G. Drogas que afetam o Sistema Nervoso Parassimpático e Gânglios Autônomos. In: O'Neill, J. O., Doukas, P. H. **Farmacologia Clínica**: Guanabara Koogan (1997)

BEZERRA, F. J. L.; REZENDE, A. A.; RODRIGUES, S. J.; ALMEIDA, M. G. Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico como Indicador da Peroxidação Lipídica em Ratos Tratados com Sevoflurano. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, p. 640 – 649, 2004.

BHATIA, S. Late effects among survivors of leukemia during childhood and adolescence. **Blood cells, molecules & disease**, v. 31, p. 84-92, 2003.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **La Presse médicale**, v. 15, p. 1174-1184, 2002.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; KELLY, F.J.; SALONEN, J.T.; NEUZIL, J.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **The American journal of clinical nutrition**, v. 76, p. 703-716, 2002.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. **Free radical research**, v. 33, p. 99-108, 2000.

CLINICA LILI. Disponível em: <www.clinicalili.org/.../imagenes/15mar2004.jpg>

DASGUPTA, J.; SANYAL, U.; Das, S. Vitamin E: its status and role in leukemia and lymphoma. **Neoplasma**, v. 40 (4), p. 235-240, 1993.

DAVIES, S. M.; ROSS, J.A. Childhood cancer etiology: recent reports. **Medical and pediatric oncology**, v. 32, p. 49–51, 1999.

DAVIS JÚNIOR, W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. **Perspectives in Pharmacology**, v. 296, p. 1-6, 2001.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical journal**, v. 324, p. 1-18, 1997.

DEL CASTILLO, J.; DE MELLO, W.C.; MORALES, T. The physiological role of acetylcholine in the neuromuscular system of *Ascaris lumbricoides*. **Archives internationales de physiologie et de biochimie**, v. 71, p. 741–757, 1963.

DEUTSCH, V. R.; PICK, M.; PERRY, C.; GRISARU, D.; HEMO, Y.; GOLAN-HADARI, D.; GRANT, A.; ELDOR, A.; SOREQ, H. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34 hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation **Experimental Hematology**, v. 30, p. 1153–1161, 2002.

DONNE, I. D.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DRABKO, K.; BOJARSKA-JUNAK, A.; KOWALCZYK, J. Activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase and concentrations of malonyldialdehyde, vitamin E, total antioxidant status and extracellular cytokines concentrations in children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL). **Medycyna wieku rozwojowego**, v. 10, p. 861-868, 2006.

EMORY UNIVERSITY. Disponível em: < http://www.chemistry.emory.edu/ach_inactivation.htm>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of experimental biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GAYNON, P.S. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. **British journal of haematology**, v. 131, p. 579–587, 2005.

GEORGE, K. M.; MONTGOMERY, M. A.; SANDOVAL, L. E.; THOMPSON, C. M. Examination of cross-antigenicity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using anti-acetylcholinesterase antibodies. **Toxicology Letters**, v. 126, p. 99-105, 2001.

GRIFMAN, M.; GALYAM, N.; SEIDMAN, S. e SOREQ, H. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 13935–13940, 1998.

GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O. Cellular and Clinical implications of ,glutathione. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 625-634, 2000

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in biology and medicine. 3^a Ed. Oxford, New York (2000) 543 p.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1504, p. 196-219, 2001.

HUNNISETT A, DAVIES S, MCLAREN-HOWARD J, GRAVETT P, FINN M, GUERET-WARDLE D. Lipoperoxides as an index of free radical activity in bone marrow transplant recipients. Preliminary observations. **Biological trace element research**, v. 47, p. 125-32, 1995.

KAMAL, M. A.; AL-JAFARI, A. A. Estimation and correlation of IC₅₀ with time for the inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by cisplatin. **Cellular Pharmacy** v. 3, p. 45-48, 1996.

KAMAL, M. A.; NASIMB, F. H.; AL-JAFARI, A. A. Human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by cisdiamminediaquaplatinum (II): a novel kinetic approach. **Cancer Letters** v. 138, p. 115-119, 1999.

KAROUI, H.; HOGG, H. N.; FREJAVILLE, C.; TORDO, P.; KALYANARAMAN, B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite—ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, p. 6000–6009, 1996.

KASHYAP, M. K.; YADAV, V.; SHERAWAT, B. S.; JAIN, S.; KUMARI, S.; KHULLAR, M.; SHARMA, P. C.; NATH, R. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005 .

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & therapeutics**, v. 86, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life Science**, v.72, p. 2101-2109, 2003.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis, **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 44, p. 239–267, 2004.

LANDIS, G. N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation, **Mechanisms of ageing and development**, v. 126, p. 365–379, 2005.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C. A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: Correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis (acute myeloid cell anomalies/cholinesterase gene family/thrombocytopoietic disorders/progenitor cell differentiation/leukemia-related gene amplification). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 4715-4719, 1989.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microciologia médica e imunologia. 4^a ed. Porto Alegre, ARTMED, 1998.

LIN, C.W.; TAGHI, M.; JILANI, I.; NEUBERG, D.; PATEL, K.; KANTARJIAN, H.; ANDREEFF, M.; ESTROV, Z.; BERAN, M.; KEATING, M.; ESTEY, E.; ALBITAR, M. Proliferation and apoptosis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**. 26: 551-559, 2002.

LINUS PAULING INSTITUTE AT OREGON STATE UNIVERSITY. Disponível em: < www.lpi.oregonstate.edu/selenium/gsh>.

LOEWI, O. Über humerole übertragbarkeit der herznervenwirkung. I. Mitteilung. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 189, p. 239–242, 1921.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia, Propedêutica e Clínica**. 3° ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 2003.

MALDONADO, P.A.; NEGRINI, L.A.; KAIZER, R.R.; ZANIN, R.F.; ARAÚJO, M.M.; BATTISTI,V.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. Oxidative status in patients submitted to conization and radiation treatments for uterine cervix neoplasia. **Clinica chimica acta**, v. 366, p. 174-178, 2006.

MANTOVANI, G.; MACCIO, A.; LAI, P.; MASSA, E.; GHIANI, M.; SANTONA, M. C. Cytokine activity in cancer-related anorexia/-cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate. **Seminars in oncology**, v. 25, p. 45–52, 1998.

MARCO, N.; GIMFERRER, E.; MESTRES, J.; UBEDA, J.; MARTINO, R.; ALTÉS, A.; ROYO, M. T. Vitamin E serum levels in patients with leukemia, lymphoma and myeloma. **European journal of epidemiology**, v. 13, p. 853-854, 1997.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progress in neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595–603, 1999.

MAZUR, B.; SZCSEPANSKI, T.; KARPE, J.; SONTA-JAKIMCZYK, D.; BUBALA, H.; TORBUS, M. Decreased number of CD4+ T lymphocytes in peripheral blood after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. 30: 33-36, 2006.

MC CORD J. M.; FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of biological chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MELLANBY, H. The identification and estimation of acetylcholine in three parasitic nematodes (*Ascaris lumbricoides*, *Litomosoides carinii*, and the microfilariae of *Dirofilaria repens*). **Parasitology**, v. 45, p. 287–294, 1955.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical journal**, v. 219, p. 273-275, 1984.

MISAKI, K.; TAKITANI, K.; OGIHARA, T.; INOUE, A.; KAWAKAMI, C.; KUNO, T.; KAWAMURA, N.; MIYAKE, M.; NAKAGAWA, T.; TAMAI, H. Alpha-tocopherol content and alpha-tocopherol transfer protein expression in leukocytes of children with acute leukemia. **Free Radical Research**, v. 37, p. 1037-1042, 2003.

MOBASHERI, M.B.; MODARRESSI, M.H.; SHABANI,M.; ASGARIAN, H.; SHARIFIAN, R.A.; VOSSOUGH, P.; SHOKRI. F. Expression of the testis-specific gene, TSGA10, in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Leukemia Research**, v. 30, p. 883–889, 2006.

MOLICA S, VACCA A, LEVATO D, MERCHIONNE F, RIBATTI D. Angiogenesis in acute and chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia Research**, v. 28, p. 321-324, 2004.

MORSCH, A. L. B. Atividade da enzima NTPDase em linfócitos de pacientes em tratamento para leucemia linfoblástica aguda (LLA): alterações na hidrólise do ATP e ADP extracelulares. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

NIZRI, E.; ADANI, R.; MESHULAM, H.; AMITAI, G.; BRENNER, T. Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and cholinergic activity as potential drugs for neuroinflammatory impairments. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 46-50, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OBERLEY, L.W. Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 84, p. 147–153, 1988.

OLIVEIRA, R.B.; ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v.25, p.976-984, 2002.

OLTRA, A. M.; CARBONELL, F.; TORMOS, C.; IRADI, A.; SAEZ, G. T. Antioxidant enzyme activities and production of MDA and 8-oxo-dg in chronic lymphocytic leukemia. **Free radical biology & medicine**, v. 30, p. 1286-1292, 2001.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2nd, Oxford, p 432-482, 2001

PLASSCHAERT, S.L.A.; KAMPS, W.A.; VELLENGA, A.; VRIES, E.G.E.; DE BONT, E.S.J.M. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia: a question of maturation? **Cancer treatment reviews**, v. 30, p. 37-51, 2004.

POPADIUK, S.; RENKE, J.; WOŹNIAK, M.; KORZON, M. Plasma protein peroxidation as a marker of oxidative stress intensity and antioxidant barrier activity in children who have completed treatment for neoplastic diseases. **Medycyna wieku rozwojowego**, v.10, p. 849-54, 2006.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, F. V.; MELLO, M. C. GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry Internacional**, v. 41, p. 291-299, 2002.

PRINCÍPIOS BÁSICOS SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA. Disponível em: <imunologia.uac.fmed.uc.pt/public/artigos/Respostalunitaria.pdf>

PROTOCOLO GBTLI LLA-99, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.

RAKONCZAY, Z.; HORVÁTH, Z.; JUHÁSZ, A.; KÁLMÁN, J. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. **Chemical- Biological Interactions**, v.157-158, p. 233-238, 2005.

RAND, J. D. Acetylcholine. Program in Molecular, Cell and Developmental Biology, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK 73104 USA, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Dependência e abuso de fármacos. In: Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (Ed). *Farmacologia*. Elsevier, Sao Paulo, Brasil, p. 674-695, 2004.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F. J.; MUNOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C. J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. **Breast cancer research and treatment**, v. 80, p. 105–114, 2003.

SCHULER, D.; SZENDE, B. Apoptosis in acute leukemia. **Leukemia Research**. 28: 661-666, 2004.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, V.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMANN, T., e TAYLOR, P. Primary structure of Torpedo Californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature (London)**, v. 319, p. 407-409, 1986.

SENTUËRKER, S.; KARAHALIL, B.; INAL, M.; YILMAZ, H.; MUËSLUËMANOGLU, H.; GEDIKOGLU, G. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. **FEBS letters**, v. 416, p. 286-90, 1997.

SHACTER E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug metabolism reviews**, v. 32, p. 307-326, 2000.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 916-921, 1999.

SILBER R, FARBER CM, PAPADOPOULOS E, NEVRLA D, LIEBES L, BRUCK M, ET AL. Glutathione Depletion in Chronic Lymphocytic Leukemia B Lymphocytes. **Blood**, v. 80, p. 2038-2043, 1992.

SILMAN, J.L.; SUSSMAN. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'nonclassical' functions and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, p. 293–302, 2005.

SILVA, P. *Farmacologia*. 1998. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1314p

SINGH V, KHARB S, GHALAUT PS, GUPTA S. Serum vitamin E in chronic myeloid leukaemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 44, p. 378-85, 2005.

SINNETT, D.; LABUDA, D.; KRAJINOVIC, M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. **Familial cancer**, v. 5, p. 35-47, 2006.

SMALL, D. H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 28, p. 453–483, 1996.

SOREQ H, LAPIDOT-LIFSON Y, ZAKUT H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v. 3, p. 511-516, 1991.

SOREQ, H.; PATINKIN, D.; LEV-LEHMAN, E.; GRIFMAN, M.; GINZBERG, D.; ECKSTEIN, F.; ZAKUT, H. Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 7907–7911, 1994.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 2, p. 294-302, 2001.

STAMLER, J. S.; SLIKVA. A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 1-30, 1996.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California: A prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.

SZELÉNYI, J.; PÁLDI-HARIS, P.; HOLLÁN, S. Changes in the cholinergic system of lymphocytes due to mitogenic stimulation. **Immunology letters**, v. 16, p. 49-54, 1987.

TACHIKAWA, H.; IGARASHI, M.; NISHIHARA, J.; ISHIBASHI, T. Ab initio model study on acetylcholinesterase catalysis: potential energy surfaces of the proton transfer reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v. 79, p. 11–23, 2005.

TAYEBATI, S. K.; CODINI, M.; GALLAI, V.; MANNINO, F.; PARNETTI, L.; RICCI, A.; SARCHIELLI, P.; AMENTA, F. Radioligand binding assay of M1–M5 muscarinic

cholinergic receptors subtypes in peripheral blood lymphocytes. **Journal of neuroimmunology**, v. 99, p. 224–229, 1999.

TAYEBATI, S.K.; EL-ASSOUAD, D.; RICCI, A.; AMENTA, F. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of neuroimmunology**, v. 132, p. 147-155, 2002.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. **Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R.W.; Molinoff, P. B. (Ed.). Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA, p. 214-242, 1999.

TERRITORIO SCUOLA. Disponível em: <http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/89/SEM_lymphocyte>.

THERIAULT, A.; CHAO, J-T.; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. **Clinical biochemistry**, v. 32, p. 309-319, 1999.

TIAN, L.; CAI, Q.; WEI, H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. **Free radical biology & medicine**, v. 24, p. 1477, 1998.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOIB, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **FEBS Letters**, v. 358, p. 1-3, 1995.

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. Disponível em: < http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/Biofvirtual/Tema-ImN/ImpNerv.htm>.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VIELE, C.S. Diagnosis, treatment, and nursing care of acute leukemia. **Seminars in oncology nursing**. 19: 98-108, 2003.

WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F. e LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **The American journal of physiology**, v. 149, p. 549-51, 1947.

WESSLER, I. K.; KIRKPATRICK, C. J. The non-neural cholinergic system: an emerging drug target in the airways. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 14, p. 423-434, 2001.

YOTNDA, P.; MINTZ, P.; GRIGORIADOU, K.; LEMMONIER, F.; VILMER, E.; LANGLADE-DEMOYEN, P. Analysis of T cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells. **Experimental Hematology**. 27: 1375-1383, 1999

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e práticas**. 1 ed. São Paulo, ATHENEU, 2004.

ZANIN, R. F. Hidrólise extracelular de ATP e ADP pela enzima NTPDase 1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superóxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free radical Biology Medicine**, v. 33, p. 337-349, 2002.

ZHANG, X.L.; KOMADA, Y.; ZHOU, Y.W.; CHEN, T.X.; SAKAI, H.; AZUMA, E.; IDO, M.; SAKURAI, M. Inhibition of interleukin-2 receptor (CD25) expression induced on T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. **Cancer immunology immunotherapy**. 44: 41, 1997.

ZHOU, F.L.; ZHANG, W. G.; SU, Z. X.; MENG, X.; TIAN, W. Relationship between oxidative stress and depression in patients with acute leukemia. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.14, p. 872-875, 2006.

7 ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM está desenvolvendo o projeto de pesquisa “ESTUDO DO PERFIL OXIDATIVO E AVALIAÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)”, através da mestrandia Vanessa Battisti, orientada pela prof^a Vera Maria Morsch. Este projeto tem como objetivo avaliar a atividade de componentes sanguíneos em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e em indivíduos controles, livres de qualquer patologia, com a finalidade de colaborar para um melhor entendimento desta doença, além de proporcionar mais informações aos pacientes, já que estes terão acesso aos resultados da pesquisa.

Será realizada uma coleta de sangue (punção venosa) para obtenção de soro e plasma. O desconforto se resume à picada da agulha, sendo que após a coleta o local poderá ficar dolorido ou arroxado, mas não requer nenhum cuidado especial voltando ao normal em poucos dias. Todo material utilizado para a coleta será descartável e/ou desinfetado. Este estudo não envolve risco adicional de vida ou contaminação aos pacientes. As amostras serão tratadas de acordo com os protocolos experimentais estabelecidos.

Fica garantido que os dados coletados ficarão sob responsabilidade do pesquisador e que os mesmos serão utilizados apenas para fins científicos, sem que o paciente seja identificado, garantindo assim o anonimato.

A participação deste estudo é livre e voluntária, sendo que não haverá nenhuma forma de compensação financeira ou custos para o participante. A recusa na participação não leva nenhum prejuízo ou comprometimento dos cuidados médicos aos pacientes.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que estou de acordo em participar deste projeto de pesquisa, livre de qualquer constrangimento, pois fui informado de forma clara e detalhada dos objetivos e dos procedimentos que serão realizados. Fui igualmente informado da garantia de receber respostas a qualquer dúvida que ainda puder ter sobre assuntos relacionados com a pesquisa, e da liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízo de qualquer ordem.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, eu _____ estou de acordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, ____ de _____ 200__.

Nome Paciente

Assinatura-Responsável pelo paciente

Identidade

Identidade

(nos casos em que o paciente for menor de 18 anos)

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Prof^a Dr^a orientadora Vera Maria Morsch, 3220 8665, ou com Vanessa Battisti (pesquisadora), 055 3221 6630.