

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**NÍVEIS SÉRICOS DE FATOR NEUROTROFICO
DERIVADO DO CÉREBRO, CITOCINAS E
BIOMARCADORES PERIFÉRICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E TESTES COGNITIVOS EM PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NA
INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA**

TESE DE DOUTORADO

MARTA MARIA OSORIO ALVES

Porto Alegre, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**NÍVEIS SÉRICOS DE FATOR NEUOTRÓFICO
DERIVADO DO CÉREBRO, CITOCINAS,
BIOMARCADORES PERIFÉRICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO E TESTES COGNITIVOS EM PACIENTES
COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NA
INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA**

MARTA MARIA OSORIO ALVES

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Porto Alegre, Brasil

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Osorio Alves, Marta Maria

NÍVEIS SÉRICOS DE FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO, CITOCINAS E BIOMARCADORES PERIFÉRICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO E TESTES COGNITIVOS EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA NA INFÂNCIA E NA ADOLESCÊNCIA / Marta Maria Osorio Alves. -- 2012. 128 f.

Orientador: Paulo Roberto Antonacci Carvalho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. fator neurotrófico derivado do cérebro. 2. leucemia linfoblástica aguda. 3. metotrexate. 4. déficit cognitivo. 5. neurotoxicidade. I. Antonacci Carvalho, Paulo Roberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

17/12/2012

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Waldir Veiga Pereira

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Thêmis Reverbel da Silveira

Programa de Pós Graduação da Criança e do Adolescente

Prof. Dr. Boaventura Antônio dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de doutorado ao meu marido Leandro, que sempre me apoia em minhas decisões e torna minha vida muito mais bonita e significativa. Às minhas filhas Karine, Daniela e Fernanda, razão de meu viver, que acreditam nas minhas capacidades, aumentam o meu entusiasmo e me enchem de alegria. Também ao meu querido genro Guilherme, que sempre participa das minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

“Um bebê sozinho não existe, ele é parte de uma relação” (Winnicott). Assim ocorre com uma tese de doutorado. Ela vai sendo construída pouco a pouco e várias pessoas são fundamentais para que ela se torne uma realidade.

Essa tese só foi possível com o envolvimento de professores e colegas a quem tenho que agradecer muito, além da importância do apoio, estímulo e carinho dos meus familiares.

Agradeço a todos que contribuíram para que ela se concretizasse, e de forma especial ao (a):

Meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho, que sempre acreditou que esse trabalho seria possível e sempre apoiou meus projetos. Sua orientação tranquila e segura me conduziu com sucesso.

Prof. Dra Liane Esteves Daudt, grande amiga e colega entusiasmada, que foi fundamental com suas idéias e na condução da pesquisa desde a sua semente, plantada num dia em que assistíamos a uma palestra do Prof. Dr. Flávio Kapczinski.

Prof. Dra Mariana Bohns Michalowski, colega e amiga de convivência nas atividades assistenciais e acadêmicas, assim como nas de lazer.

Prof. Dr. Flávio Pereira Kapczinski e Prof. Dra Clarissa Severino Gama, com sua competência inquestionável e entusiasmo contagiante, tornaram essa pesquisa possível no Laboratório de Psiquiatria Molecular.

Laboratório de Psiquiatria Molecular, fundamental para as dosagens dos marcadores estudados.

Membros da equipe de pesquisa do Laboratório de Psiquiatria Molecular, pela imensa participação no processamento da nossa pesquisa, em especial Laura Stertz e Pâmela Ferrari.

Psic. Dra Viviane Ziebell de Oliveira e Psic. Ana Lúcia Barros Gonçalves pela riqueza de suas contribuições e seu entusiasmo na avaliação cognitiva das crianças.

Dra. Cristina Toscani Leal Dornelles e Dra Maria Inês de Albuquerque Wilasco pela inestimável ajuda, tornando possível o início e continuação desse trabalho.

Residente Josemar Marchesan pelo auxílio nas coletas.

Queridos colegas e residentes do Serviço de Hematologia, anestesistas do CCA (Centro de Cirurgia Ambulatorial do HCPA) e enfermeiras do HCPA, que tanto colaboraram nas coletas das amostras.

FIPE: Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA, pelo auxílio financeiro, tornando possível dosar os marcadores.

GPPG, em especial, a estatística Vania Naomi Hirakata, pela paciência e bom humor com que conduziu as análises estatísticas desse trabalho.

Nutricionista Roberta Roggia Friedrich pela importante ajuda na formatação e revisão dessa tese.

Coletadores do HCPA pelo auxílio nas coletas de sangue.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

INTRODUÇÃO: taxas de sobrevivência para leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica ultrapassam 90%. Contudo, esse fato tem sido associado a um número crescente de sobreviventes em risco de toxicidade relacionada ao tratamento. Déficits cognitivos estão entre as seqüelas, mesmo que o tratamento não inclua radioterapia. Mecanismos específicos não estão completamente esclarecidos, mas o metotrexate (MTX), usado via intratecal para profilaxia da doença no sistema nervoso central, pode estar envolvido. O fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor*- BDNF) é essencial para as funções cognitivas e para a consolidação da memória, e níveis reduzidos dessa neurotrofina têm sido associados a déficits cognitivos. Aumento do estresse oxidativo e desregulação das citocinas também podem estar associados a déficits cognitivos. **OBJETIVOS:** O presente trabalho se propõe a estudar os níveis de BDNF, citocinas (IL-6 e IL-10), marcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas do ácido barbitúrico- TBARS- thiobabaturic acid reactive substances e conteúdo de proteína carbonil), e testes cognitivos durante o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, buscando relações entre esses e o tratamento com MTX intratecal, na tentativa de esclarecer os mecanismos dos déficits cognitivos apresentados pelos sobreviventes dessa doença. **MÉTODOS:** estudo de caso-controle aninhado numa coorte. Sessenta e dois espécimes de sangue foram coletados de 8 crianças e adolescentes com LLA durante o tratamento com um protocolo baseado no BFM 2002. Foram utilizadas amostras de sangue de um banco de controles já autorizado para pesquisa. Foram dosadas as concentrações séricas de BDNF, citocinas (interleucina 6 e 10), e conteúdo de proteína carbonil antes e 72 horas após a administração de MTX intratecal, ao diagnóstico, após a remissão completa, e no protocolo M (fases de altas doses de MTX). Foram aplicados WISC-III ou WIPPSI- R no diagnóstico e 6 meses após. **RESULTADOS:** Logo após o diagnóstico, os níveis séricos de BDNF foram mais baixos nos pacientes do que nos controles ($p < 0,001$), mas essa diferença desapareceu quando a doença foi controlada. Os níveis de BDNF e TBARS dos pacientes não se alteraram de forma significativa 72 horas após a administração

intratecal de MTX. O conteúdo de proteína carbonil foi mais baixo nos pacientes após a remissão. A IL-6 persistiu mais elevada nos pacientes do que nos controles mesmo no protocolo M, fase de doses elevadas de MTX ($p < 0,05$). Testes psicológicos para função cognitiva revelaram que houve uma redução dos QI totais em 6 meses, porém com permanência na média ou acima dessa, sendo que o TESTE para memória mostrou melhora, exceto para uma paciente. **CONCLUSÕES:** primeiro estudo que relaciona níveis de BDNF de crianças e adolescentes com LLA com o tratamento por MTX intratecal. A hipótese inicial não foi confirmada: o tratamento com MTX IT não reduziu o BDNF e não aumentou o TBARS em 72 horas. Foram encontrados níveis de BDNF diminuídos crianças com LLA em relação aos controles. Ao diagnóstico, os níveis de IL-6 e de IL-10 estavam significativamente mais elevados nos pacientes do que nos controles e a IL-6 permaneceu elevada. Os testes cognitivos mostraram uma redução dos QI totais em 6 meses, porém com permanência na média ou acima dessa. Os resultados desse estudo sugerem que não há alterações significativas nos níveis séricos de BDNF e TBARS após a administração intratecal de MTX. Sugerem também que existe uma redução dos níveis de BDNF na LLA, e um estado inflamatório persistente.

Palavras-chave: leucemia, estresse oxidativo, BDNF.

ABSTRACT

BACKGROUND: Overall survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) is above 90%. However this fact has been associated with a growing number of survivors at risk for treatment-related toxicity. Cognitive deficit are among these effects, even with no cranial radiation. Specific mechanisms are not fully understood, but intrathecal methotrexate (MTX), used for nervous system prophylaxis may be involved. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is essential for memory

consolidation and cognitive functions and reduced levels of this neurotrophin have been associated with cognitive deficits. Increased oxidative stress and cytokine deregulation also can be associated with such deficits. **OBJECTIVES:** the propose of this paper is to study BDNF levels, cytokines (IL-6 and IL-10), oxidative stress markers (thiobarbituric acid reactive substances- TBARS and protein carbonylation) and cognitive tests during pediatric ALL, searching relations between these and intratecal MTX treatment, trying to clear mechanisms involved in cognitive deficits that affect survivors. **METHODS:** Case-control study in a cohort. Sixty two samples of peripheral blood were obtained from 8 pediatric ALL patients during treatment with BFM-2002-based protocol and 40 samples of a control bank of pediatric sample already authorized. We measured serum concentrations of BDNF, TBARS, protein carbonylation, IL-6 and IL-10 before and after intratecal MTX at diagnosis, after complete remission and at M protocol (high MTX doses). A psychologist evaluated WISC-III or WIPPSI-R tests at diagnosis and 6 months later. **RESULTS:** At diagnosis, BDNF levels were lower in patients than in controls ($p < 0,001$), but this differences disappeared when the disease was under control. BDNF and TBARS levels in patients showed no significant changes 72 hours after intratecal MTX. Serum protein carbonylation was lower in patients after remission. IL-6 persisted higher in patients than in controls ($p < 0,05$) even after M protocol. WISC-III or WIPPSI-R showed that total IQs reduced after 6 months but persisted at average or above. WISC or WIPPSI-R subtest for memory showed improvement, except for one patient. **CONCLUSIONS:** first study correlating BDNF levels in children and adolescents with intratecal MTX treatment. Initial hypothesis was not confirmed: MTX treatment did not reduce BDNF and did not increase TBARS after 72 hours. This study suggests that there are reduced levels of BDNF in ALL and that treatment is effective in reversing this condition. Psychological tests revealed that memory and IQ was preserved 6 months later. Additionally, data suggest that there is a state of persisted inflammation.

KEYWORDS: leukemia, brain-derived neurotrophic factor, oxidative stress, methotrexate, cognitive functions

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Leucemia, subtipos.....	21
Figura 2 –	Regulação da expressão gênica e neuroplasticidade.....	43
Figura 3 –	Citocinas.....	59
Figura 4 –	BDNF Sérico: pacientes (nível inicial) e controles pareados por sexo e idade.....	73
Figura 5 –	BDNF inicial dos pacientes e BDNF dos controles.....	73
Figura 6 –	TBARS valor inicial dos pacientes e TBARS dos controles.....	74
Figura 7 –	BDNF (média durante o tratamento da LLA).....	77
Figura 8 –	Desempenho nos testes cognitivos (1).....	78
Figura 9 –	Desempenho nos testes cognitivos (2).....	78
Figura 10 –	Desempenho nos testes cognitivos (3).....	79
Figura 11 –	Desempenho nos testes cognitivos (4).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características da amostra.....	72
Tabela 2 –	Comparação das dosagens séricas de marcadores em pacientes e controles.....	74
Tabela 3 –	Dosagens séricas de BDNF e de TBARS antes e após MTX IT.....	75
Tabela 4 –	Dosagens séricas dos marcadores em pacientes no primeiro Protocolo M e dos controles.....	76
Tabela 5 –	Dosagens séricas dos marcadores em pacientes antes e após a remissão completa da doença.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AchE – Acetilcolina

BDNF – *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BFM – *Berlin-Frankfurt-Münster*

cAMP – *Cyclic Adenosine Monophosphate*

CAT – Catalase

CaMKII – *Calmodulin-dependent Protein Kinase II*

CD - *cluster of differentiation*

CPAP - *continuous positive airway pressure*

CREB – *cAMP Response Element-Binding Protein*

CSF – *Colony Stimulating Factor*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK – *Extracellular Signal Regulate Kinase*

FAB – *French-American-British*

GABA gama aminobutiric acid

GDNF – *Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*

GL-PX – *Glycerol 3-Phosphate Regulon of Escherichia coli*

GSH – *γ-glutamylcisteinilglicina* (forma reduzida)

HPA - hipotálamo-hipofisário- adrenal

IFN – Interferon

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC – Índice de Massa Corporal

IT - intratecal

LCR - líquido cefalorraquidiano

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LTM – *Long-Term Memory*

LTP – *Long-Term Potentiation*

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MDA – *Metilenedioxianfetamina*

MLD - memória de longa duração

MLL Mixed -Lineage Leukemia

MTHFR – *Metileno Tetrahydrofolato Redutase*

MTX – Metotrexate

NGF – *Nerve Growth Factor*

NT –Neurotrofina

OMS -Organização Mundial da Saúde

ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PC – *Phosphatidylcholine*

PI3-K – *Phosphatidylinositol 3-kinases*

PKA – Constante de Acidez

PLC – *Phospholipase C*

QI – Quociente de Inteligência

ROS – *Reactive Oxygen Substances*

SNC - sistema nervoso central

SOD – *Superoxide Dismutase*

STM - *short term memory*

TNF- *alfa tumor necrosis factor-alpha*

TBARS – *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TGF – *Transforming Growth Factor*

TNF – *Alfa Tumor Necrosis Factor*

TRK – *Tropomyosin-Related Kinase*

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

WISC – *Wechsler Intelligence Scale*

WPPSI-R – *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-Revised*

5-HT – 5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	21
2.2 METOTREXATE	29
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO	31
2.4 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CÉREBRO (BDNF).....	38
2.4.1 Aspectos Gerais	38
2.4.2 BDNF, Memória e Cognição	47
2.4.3 BDNF e Doenças Neuropsiquiátricas	52
2.4.4 BDNF e Estresse Oxidativo	53
2.4.5 BDNF e Onco- Hematologia.....	54
2.5 EXCITOTOXICIDADE E CITOCINAS.....	58
2.5.1 Relações entre bdnf e citocinas	58
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	61
4 OBJETIVOS.....	62
4.1 OBJETIVO GERAL	62
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	62
5 HIPÓTESE DE TRABALHO.....	63
6 MÉTODOS	64
6.1 DELINEAMENTO	64
6.2 AMOSTRA	64
6.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	64
6.4 FERRAMENTAS DE PESQUISA.....	65
6.4.1 Técnica da dosagem do BDNF	66

6.4.2 Técnica da dosagem das TBARS	67
6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	68
6.6 LOGÍSTICA.....	68
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	70
7 RESULTADOS.....	71
8 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE.....	100
APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	100
ANEXOS	101
ANEXO A – ARTIGO 1 – BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY MARKERS IN CHILDREN TREATING ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA	101
ANEXO B – ARTIGO 2 – EFFECTS OF INTRATHECAL METHOTREXATE ON SERUM BDNF (BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) LEVELS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)	118

1 INTRODUÇÃO

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em crianças, representando quase um terço de todas as neoplasias malignas pediátricas. A incidência anual da LLA nos Estados Unidos é de 3,7 a 4,9 casos por 100 000 crianças de zero a 14 anos de idade, com pico de incidência em crianças de 2 a 5 anos (VIKRAMJIT, 2012).

Os avanços no diagnóstico e tratamento permitiram que as taxas gerais de cura para crianças com LLA atingissem 90%, e a sobrevida livre de evento para os pacientes de alto risco, aproximadamente 65% (RIBERA & ORIOL, 2009).

Múltiplos fatores têm contribuído para essa melhora, incluindo a melhor compreensão da imunobiologia da LLA e da carga de doença, reconhecimento de santuários e integração da profilaxia pré-sintomática do sistema nervoso central (SNC), uso de drogas efetivas e intensificação do tratamento, delineamento dos fatores prognósticos com tratamentos adaptados à classificação de risco e melhoras nos cuidados de suporte (SEIBEL, 2008).

Um marco importante ocorreu nos anos “60”, quando se iniciou o tratamento da leucemia do SNC e após, a profilaxia com irradiação craniana e quimioterapia intratecal para evitar a doença oculta. Nos anos “90”, começava a aplicação da biologia molecular e um sistema uniforme de classificação de risco. Um grupo de investigadores europeus de *Berlin, Frankfurt e Münster* criaram o protocolo BFM que usa uma terapia pós-indução (consolidação) com altas doses e múltiplos agentes. Essa abordagem resultou numa melhora significativa na sobrevida, especialmente para os pacientes com alto risco de recaída (SEIBEL, 2008).

O uso de tratamento adaptado ao risco melhorou as taxas de cura e, ao mesmo tempo, limitou a toxicidade da terapia (PUI & EVANS, 1998; SCHRAPPE et al, 2000; SILVERMAN et al, 2001).

Por outro lado, esses fatos estão levando a um número crescente de sobreviventes, que estão em risco de efeitos adversos do tratamento, comprometendo a saúde e a qualidade de vida. Um

desses efeitos adversos é o déficit cognitivo, que tem sido documentado em meta-análises recentes, como a de Campbell et al. (2007), Peterson et al. (2008) e Robinson et al. (2010).

O presente trabalho se propõe a estudar os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*- BDNF), citocinas e marcadores de estresse oxidativo durante o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, buscando relações entre esses e o tratamento com metotrexate intratecal, na tentativa de esclarecer os mecanismos dos déficits cognitivos apresentados pelos sobreviventes dessa doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A LLA é uma neoplasia maligna cuja etiologia permanece, em grande parte desconhecida, embora alguns casos se associem a síndromes genéticas (por exemplo, a Síndrome de Down) ou imunodeficiências congênitas (por exemplo, a Síndrome de Wiscott-Aldrich e a ataxia-teleangectasia) (PUI & EVANS, 1998).

Na LLA, uma célula progenitora sofre uma alteração genética, levando a uma proliferação sem controle, e parada na maturação de células progenitoras linfóides (linfoblastos) na medula óssea. Dependendo de onde a célula se desviou para uma proliferação descontrolada, o clone terá um padrão de antígenos/imunoglobulinas que podem ser determinados na citometria de fluxo. Esse fato determina que a LLA seja uma doença heterogênea, consistindo de vários subtipos que diferem marcadamente em sua resposta ao tratamento (PUI & EVANS, 1998). **Fig 1.**

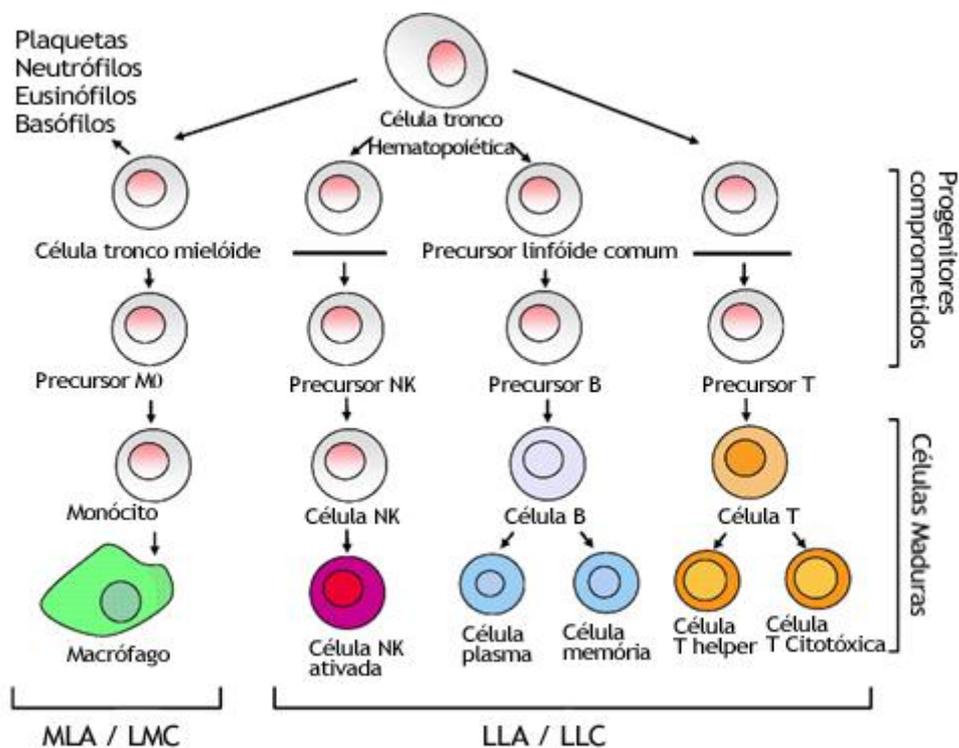


Fig 1. Leucemia, subtipos.

LMA Leucemia Mielóide Aguda, LMC Leucemia Mielóide Crônica, LLA Leucemia Linfoblástica Aguda, LLC leucemia Linfoblástica Crônica, NK *natural killer*.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a LLA como: pró B, B comum, pré-B e B madura (Burkitt). Esses subtipos refletem o estágio de maturação da célula leucêmica (VARDIMAN et al, 2009).

LLA B corresponde a 80 % das LLA na infância e envolve linfoblastos que têm a expressão na superfície de dois ou mais antígenos associados à linhagem B (CD 19, CD 20, CD 24, CD 22, CD 21 ou CD 79). CD 10 é comumente expressado, o que o torna um marcador diagnóstico útil. Obs: Na imunofenotipagem, cada antígeno recebe uma designação de acordo com a sua expressão: CD *cluster of differentiation* (CRAIG & FOON, 2008).

LLA T é identificada pela expressão de antígenos de superfície associados às células T, sendo que o CD3 é específico. CD2, CD7, CD5 também estão associados (CRAIG & FOON, 2008).

A abordagem contemporânea ao diagnóstico da LLA pediátrica requer uma gama extensa de procedimentos, incluindo morfologia, imunofenotipagem, citogenética e diagnóstico molecular, além da avaliação clínica (CRAIG & FOON, 2008).

O prognóstico na LLA depende de características clínicas e laboratoriais e do tratamento. A avaliação do risco inclui características clínicas (idade e contagem de leucócitos), características biológicas dos blastos leucêmicos, resposta à quimioterapia de indução e doença residual mínima. De acordo com esses critérios, os pacientes podem ser classificados em baixo risco, médio risco ou *standard*, alto risco e muito alto risco (SEIBEL, 2008).

Os pacientes são classificados como risco *standard* se a idade no diagnóstico estiver entre 1 a 9,9 anos, a contagem dos leucócitos for menor que 50.000 na apresentação, não houver características citogenéticas desfavoráveis e houver boa resposta à quimioterapia inicial, com menos de 5% de blastos na medula óssea em 15 dias 9 (SEIBEL, 2008).

Pacientes de alto risco não alcançam esses critérios ou tem envolvimento extramedular, que torna inapropriado para eles serem tratados como *standard* (SEIBEL, 2008).

Pacientes de muito alto risco têm características genéticas desfavoráveis (cromossoma Philadelphia, hipoploidia, rearranjo MLL) ou resposta muito pobre à quimioterapia inicial (doença residual mínima maior que 1%) (VIKRAMJIT, 2012).

Crianças com menos de um ano com leucemia aguda tem doença biologicamente distinta, com mau prognóstico. O prognóstico de pacientes com LLA-T tem sido, historicamente, pior que o dos pacientes com LLA-B (VIKRAMJIT, 2012).

O tratamento da LLA com quimioterapia de múltiplos agentes é dividida em quatro estágios: indução da remissão, consolidação, reindução ou re-intensificação e manutenção, incluindo tratamento direcionado ao SNC (BFM PROTOCOL, 2002).

Nos anos 1980, o grupo BFM (*Berlin-Frankfurt-Münster*) foi pioneiro nas estratégias iniciais de sucesso. Esse grupo demonstrou que indução e consolidação intensivas com uma combinação de agentes, seguida de uma fase de intensificação prolongada aumentou consideravelmente a sobrevida das crianças com LLA (SEIBEL, 2008).

O objetivo da indução é induzir uma remissão morfológica e restaurar a hematopoiese medular normal. As drogas utilizadas são a prednisolona (ou dexametasona), a vincristina, antraciclina, ciclofosfamida, asparaginase, citarabina, além do metotrexate intratecal (profilaxia ou tratamento da doença no SNC). Essa fase do tratamento resulta na remissão completa em mais de 95% (BFM PROTOCOL, 2002).

Na consolidação, busca-se a erradicação dos blastos leucêmicos residuais em remissão pelos critérios biológicos. O tratamento inclui 6-mercaptopurina e metotrexate intratecal e intravenoso (BFM PROTOCOL, 2002).

Na re-intensificação, aplica-se um regime de dexametasona, vincristina, doxorubicina, and L-asparaginase alternados com ciclofosfamida, citarabina, 6-tioguanina e metotrexate intratecal MTX IT (SEIBEL, 2008).

O Protocolo M inclui metotrexate (MTX) em altas doses por via intravenosa e intratecal. MTX é administrado na dose de 2g por metro quadrado por 24 horas repetido 4 vezes por 14 dias. MTX intratecal de 6 a 12 mg de acordo com a idade da criança e 6-mercaptopurina na dose de 25mg por metro quadrado por dia por 56 dias (SEIBEL, 2008).

No trigésimo terceiro dia do tratamento, se avalia se houve a remissão completa, isto é exame físico sem massas, menos de 5% de blastos na medula, líquido sem blastos (SEIBEL, 2008).

A manutenção para LLA, geralmente inclui mercaptopurina oral diária e MTX oral semanal. Essa é a fase mais longa, com duração de 24 a 36 meses de remissão completa contínua. Em alguns protocolos, pulsos adicionais de vincristina e corticosteróides podem ser adicionados (SEIBEL, 2008).

Refinamentos na terapia testados em ensaios clínicos pelos grupos cooperativos resultaram na cura da vasta maioria das crianças com LLA. Entre os itens alterados estão a intensificação prolongada e a redução na percentagem de crianças que recebem irradiação craniana (SEIBEL, 2008).

Complicações agudas, durante o tratamento, podem envolver todos os sistemas orgânicos e incluem: síndrome da lise tumoral, insuficiência renal, septicemia, sangramento, trombose, tiflíte, neuropatia, encefalopatia e convulsões (SEIBEL, 2008).

Após o tratamento, é necessário um acompanhamento prolongado porque os sobreviventes podem ter efeitos tardios, como neoplasia secundária, encefalopatia, cardiopatia, infertilidade, deficiência de hormônio do crescimento, transtornos do aprendizado e cognitivos, entre outros (SEIBEL, 2008).

O envolvimento do SNC está presente ao diagnóstico em cerca de 10% das crianças com LLA. Porém, sem profilaxia adequada, 50 a 75 % desenvolveriam doença no SNC. Isso ocorre porque a barreira hematoencefálica serve como uma barreira farmacológica; assim, as células leucêmicas podem permanecer no SNC apesar da terapia sistêmica. O uso rotineiro de profilaxia do SNC, incorporando quimioterapia intratecal (IT) e/ou radioterapia craniana reduziu essa incidência

para menos de 10% (JABBOUR et al, 2007). Geralmente, o MTX é iniciado no início da indução, intensificado durante a consolidação e continuado através da manutenção. Assim, a terapia precoce do SNC é crítica para eliminar doença clinicamente evidente ao diagnóstico e prevenir recaída no SNC em pacientes sem doença franca do SNC (JABBOUR et al, 2007).

O uso de tratamento adaptado ao risco melhorou as taxas de cura e, ao mesmo tempo, limitou a toxicidade da terapia (PUI & EVANS, 1998; SCHRAPPE et al, 2000; SILVERMAN et al, 2001).

Por outro lado, esses fatos estão levando a um número crescente de sobreviventes, que estão em risco de efeitos adversos do tratamento, comprometendo a saúde e a qualidade de vida.

Relatos na literatura indicam que, aproximadamente 75% dos sobreviventes apresentam uma ou mais efeitos tardios (CARDOUS-UBBINK et al, 2004). Os mais comuns são os que envolvem crescimento e desenvolvimento, incluindo velocidade linear do crescimento, desenvolvimento intelectual e maturação sexual (ADAN et al, 2001). Um estudo recente sobre adultos sobreviventes de câncer pediátrico encontrou que 62% apresentam pelo menos uma condição crônica sendo que 25% essa condição é grave ou ameaçadora da vida, que pode se manifestar anos após (OEFFINGER et al, 2006).

A coorte *Childhood Cancer Survivor (CCSS)* proporciona o maior e mais completo estudo da saúde dos sobreviventes de LLA na infância e aponta os sobreviventes de LLA como um dos grupos de maior alto risco para a mortalidade e morbidade (MERTENS et al, 2001).

Meta-análises recentes tem demonstrado que os sobreviventes de LLA na infância apresentam déficits significativos em funções neurocognitivas, incluindo função executiva, memória verbal e visuoespacial, e atenção (ROBINSON et al, 2010). Esses déficits podem resultar na inabilidade para, efetivamente, regular sua atenção e emoções, para se engajar na solução de problemas complexos, podendo ser um fator negativo no ajuste psicossocial (ROBINSON et al, 2010).

Comparados com seus irmãos, os sobreviventes de câncer na infância tem um risco 10 vezes maior de apresentar déficits cognitivos graves, e uma chance, significativamente, menor de completar o segundo grau na escola ou cursar uma universidade (OEFFINGER et al, 2006). Na vida adulta, a frequência de dificuldades nas áreas de eficiência em tarefas, memória e regulação emocional é 50% mais elevada entre os sobreviventes de câncer pediátrico comparados aos seus irmãos (KADAN-LOTTICK et al, 2010).

Os mecanismos para as alterações cognitivas induzidas pela quimioterapia são pouco conhecidos. Contudo, vários mecanismos candidatos têm sido propostos. Uma das hipóteses tem sido de que esses déficits se desenvolvem como resultado de agentes quimioterápicos (por dano direto ou através do aumento do estresse oxidativo ou ainda induzindo alterações hormonais), radioterapia e/ ou corticosteróides. Ahles e Saykin (2007) sugerem que fatores de risco genéticos compartilhados para o desenvolvimento do câncer e problemas cognitivos, incluindo bombas de efluxo de baixa eficácia, déficits nos mecanismos de reparo do DNA e/ou resposta imune desregulada, associados ao efeito da quimioterapia possam contribuir para o declínio cognitivo em pacientes após o tratamento.

Existem controvérsias que persistem na história natural das sequelas tardias do tratamento do câncer, por exemplo, a dúvida do que causa o declínio no funcionamento neurocognitivo, que é observado tanto nos sobreviventes de LLA, quanto nos de tumores do SNC (PALMER et al, 2001).

Uma das hipóteses é de que o tratamento (ou a doença) prejudica um processo psicológico elementar, como aspectos da atenção, memória ou aprendizado, que são críticos para o desenvolvimento posterior e aquisição de habilidades adicionais (PALMER et al, 2001; SCHATZ et al, 2000). A outra hipótese é de que o tratamento possa ter iniciado um processo fisiológico que causa dano neuronal contínuo (RICCARDI et al, 1985) ou haveria uma excitotoxicidade continuada (KISHI et al, 2003; LIPTON & ROSENBERG, 1994; QUINN et al, 1997), ou uma disfunção neural prolongada das células precursoras (MONJE et al, 2002).

Estudos adicionais são necessários, pois existem implicações no tratamento e também formas de terapia possíveis para aliviar os efeitos tardios, como estratégias neuroprotetoras como aumentar o BDNF com antidepressivos, exercícios, dietas (DRACHTMAN et al, 2002; QUINN et al, 1997) durante ou logo após o tratamento, ou estratégias educacionais preventivas (ANDERSON et al, 2000; MOORE et al, 2000).

Meta-análises tem confirmado que os sobreviventes de LLA podem apresentar déficits cognitivos. Moleski (2000) publicou uma revisão da literatura sobre as consequências da quimioterapia IT, incluindo 33 estudos de 1981 a 1997. Esses foram quase unânimes nos seus achados sobre as diferenças significativas nas habilidades neurocognitivas entre os grupos de sobreviventes e os grupos-controle. Os achados mais robustos nos déficits foram na atenção e memória não verbal. Os fatores de risco encontrados foram: a baixa idade, o sexo feminino e possivelmente a intensidade do tratamento.

Campbell et al. (2007), em meta-análise com 28 estudos, demonstraram que os sobreviventes de LLA consistentemente apresentam déficits cognitivos significativos no funcionamento intelectual, aquisição acadêmica e de habilidades neurocognitivas quando comparados a grupos de controle.

Outra meta-análise com 13 estudos apoia a ocorrência de sequelas neuropsicológicas e acadêmicas em sobreviventes de LLA tratados somente com quimioterapia, sem irradiação craniana. Os autores encontraram que os tamanhos de efeito médios foram, significativamente, diferentes do zero para múltiplos domínios da inteligência e aquisição acadêmica, velocidade de processamento, memória verbal e alguns aspectos do funcionamento executivo e habilidades motoras finas, indicando funcionamento pior em sobreviventes de LLA (PETERSON et al, 2008).

Um estudo na Finlândia com 64 sobreviventes de LLA avaliados numa média de 20 anos após o diagnóstico concluiu que os mesmos obtiveram escores significativamente mais baixos sem testes neuropsicológicos, especialmente nos tratados com irradiação craniana (HARILA et al, 2009).

O *Childhood Cancer Survivor Study* tem documentado um aumento significativo do risco de desempenho acadêmico baixo, depressão e redução da qualidade de vida dos sobreviventes comparados aos irmãos (MITBY et al, 2003; ZEBRACK et al, 2004).

Felizmente, há evidências de que a incidência de prejuízo severo está diminuindo com a redução do uso de irradiação crânio-espinhal em favor da quimioterapia intratecal para a profilaxia do SNC (KINGMA et al, 2002; WABER et al, 2001). Contudo, ainda são observados efeitos neurotóxicos tardios (definidos como sinais e sintomas crônicos ou anormalidades radiológicas que aparecem ou progridem meses a anos após o término do tratamento.) (BROWN et al, 1992; MULHERN et al, 1991; UEBERALL et al, 1997) e podem ter impacto considerável na qualidade de vida dos sobreviventes de câncer e suas famílias.

Os déficits ocorrem principalmente nos processos básicos de atenção e funcionamento executivo, enquanto a função intelectual global está, relativamente, preservada (BUIZER et al, 2009).

A radioterapia craniana foi apontada como responsável pelos déficits neurocognitivos e acadêmicos entre os sobreviventes. O efeito é maior quando essa terapia é administrada em crianças mais jovens. Esse tratamento pode causar desmielinização, especialmente, em áreas com maior concentração de mielina, por exemplo, o córtex frontal, sendo que na maioria dos protocolos atuais, a radioterapia foi reduzida (COUSENS et al, 1988).

Porém, a quimioterapia intratecal também é potencialmente neurotóxica, especialmente, o MTX. A fisiopatologia não está completamente compreendida, mas provavelmente é multifatorial. Teorias predominantes são baseadas em alterações das vias metabólicas do folato, resultando em desmielinização, produção de aminoácidos excitatórios e prejuízo da síntese de serotonina e dopamina (BUIZER et al, 2009). A deficiência de folato leva a um aumento dos níveis de homocisteína, sensibilizando o neurônio ao estresse oxidativo (COLE & KAMEN, 2006).

Sobreviventes de LLA na infância podem apresentar déficits neurocognitivos sutis após o tratamento, mesmo na ausência de irradiação craniana (PETERSON et al, 2008). Os déficits estão,

especialmente, presentes nos processos neuropsicológicos básicos de atenção e funcionamento executivo, enquanto a função intelectual global está, relativamente, preservada (BUIZER et al, 2009). Há indicações de que os déficits estão associados a desempenho acadêmico baixo e problemas de comportamento. Sexo feminino e idade baixa ao diagnóstico parecem ser fatores de risco para pior prognóstico neurocognitivo. Existe indicação de que o tratamento mais intensivo se relacione ao mau prognóstico neurocognitivo, mas são necessários mais estudos avaliando fatores de risco relacionados ao tratamento (HARILA et al., 2010). Estudos em adultos sobreviventes são importantes para a compreensão dos efeitos tardios do tratamento.

2.2 METOTREXATE

O metotrexate (MTX) é a droga mais comumente usada em onco-hematologia para a profilaxia e tratamento do SNC. Praticamente todos os protocolos para leucemia e linfoma contêm MTX, seja como droga única ou combinada. Faz parte do tratamento das leucemias de linhagens linfóide e mielóide. Seu mecanismo de ação é a depleção do folato, um substrato necessário para a replicação celular (KWONG et al, 2009).

O MTX IT é absorvido, sistemicamente, em pequenas quantidades, postulando-se que isso ocorra, em grande parte, via reabsorção normal do líquido no plexo coróide. São sugeridos dois tipos de reabsorção sistêmica do MTX: rápida e lenta. Além disso, os níveis teciduais de MTX atingidos após a administração IT pode ser até mais alta que o MTX oral na mesma dosagem. Assim, toxicidade tecidual significativa pode resultar de MTX IT frequente ou quando o MTX sistêmico é administrado concomitantemente. Como o MTX é excretado principalmente via renal, a toxicidade sistêmica é exacerbada em pacientes com função renal prejudicada, nos quais a meia vida do MTX absorvido sistemicamente do líquido pode atingir 19-44 horas, levando a níveis tóxicos. O ácido folínico é usado após o MTX para resgate. Em pacientes pediátricos, o MTX é usado em doses

ajustadas para a idade. Em pacientes acima de 13-14 anos, a dose mais comum é de 12-12,5 mg por dose (38). Poucos, se algum, protocolos usam o MTX IT mais do que duas vezes por semana. Uso mais frequente tem sido associado à toxicidade pulmonar fatal (KWONG et al, 2009).

Por via intratecal (IT), o MTX é eliminado de forma bifásica, com meia-vida de 4,5 h e 14 horas. Isso deve ser considerado quando se prescreve MTX sistêmico concomitante, pois quantidades significativas de MTX administrado sistemicamente entram no líquido céfalo-raquidiano (LCR), podendo resultar em toxicidade se o “*timing*” se sobrepuser ao MTX IT (KWONG et al, 2009).

O MTX pode reduzir a proliferação celular e a densidade da substância branca no hipocampo e pode contribuir para a produção de déficits cognitivos (SEIGERS et al, 2009).

Para elucidar a fisiopatologia, Liy et al usaram um modelo que mimetiza o MTX IT profilático em roedores, injetando MTX através da cisterna magna de ratos e encontraram redução na memória espacial, sem alteração na atividade geral e coordenação motora (LI et al, 2010).

Madhyastha et al. (2002) também investigaram disfunção cognitiva em ratos após administrações múltiplas intra-cerebroventriculares de MTX. Concluíram que a droga produziu convulsões, déficit de memória e aprendizado, e reduziu concentrações de 3 monoaminas cerebrais: norepinefrina, dopamina e serotonina. Encontraram que a zona CA4 do hipocampo fora severamente afetada pela droga. Propuseram que a causa da disfunção cerebral foi a alteração das monoaminas e que essa disfunção envolveria efeitos citotóxicos do MTX no tecido cerebral.

Semelhantes às crianças tratadas para leucemia, ratos que receberam MTX desenvolveram déficits cognitivos concomitantes a alterações esperadas na fisiologia do folato (LI et al).

A administração aguda e crônica do MTX pode produzir déficits de memória espacial, sem alterar significativamente a memória visual, a exploração geral, a atividade e a coordenação motora (LI et al, 2010).

A MTHFR (5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase) é uma enzima que metaboliza o folato e resulta em níveis reduzidos do mesmo em resposta ao MTX e em níveis aumentados de

homocisteína e excitoxina. O Polimorfismo MTHFR-677-T tem sido associado a desfechos clínicos mais favoráveis e pode ser um fator importante nos efeitos neurocomportamentais tardios (KISHI et al, 2003).

Melhor entendimento da fisiopatologia da neurotoxicidade relacionada ao tratamento da LLA poderia levar a estratégias para aliviar sintomas e prevenir sua ocorrência.

Os mecanismos da neurotoxicidade permanecem em grande parte desconhecidos, mas alguns têm sido implicados: inflamação, dano oxidativo, e respostas autoimunes (BISEN-HERSH et al, 2011).

Biomarcadores periféricos relacionados ao estresse oxidativo e à inflamação e neurotrofinas podem revelar toxicidade, sendo úteis para estudar as sequelas neurológicas, como os déficits cognitivos (KAPCZINSKI et al, 2011).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um distúrbio no balanço pró-oxidativo/anti-oxidativo a favor do primeiro, levando a um dano potencial. Pode resultar da redução dos níveis de antioxidantes ou do aumento de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (SIES, 1997).

As espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen substances*) são essenciais para a função das células, porém, o excesso dessas espécies causa dano oxidativo ao DNA, lipídios (membranas das células e organelas) e proteínas (enzimas e receptores). Por isso, níveis adequados de defesas antioxidantes são necessários para contrabalançar os efeitos dessas espécies (ARUOMA, 1998).

Alterações oxidativas de proteínas podem levar a diversas consequências funcionais, como a inibição de atividades enzimáticas ou de ligação, susceptibilidade aumentada à agregação ou

proteólise, aumento ou redução da captação pelas células ou imunogenicidade alterada (SHACTER, 2000).

O estresse oxidativo pode induzir peroxidação lipídica e carbonilação proteica pela inativação de enzimas antioxidantes (SHACTER, 2000).

Exemplos de antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), o glutatião e o α -tocoferol. A SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água (SINGH et al, 2009).

O glutatião é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. A glutatona peroxidase é uma enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, fazendo parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular. Sua atividade depende da glutatona reduzida (GSH) (SINGH et al, 2009).

O α -tocoferol ou vitamina E é uma vitamina lipossolúvel que atua como antioxidante no nível da síntese do pigmento hemo, que é uma parte essencial da hemoglobina (RIGOTTI, 2007).

Os marcadores da oxidação proteica são úteis para avaliar estresse oxidativo *in vivo*. O conteúdo de proteína carbonil é gerado através da clivagem oxidativa de proteínas, sendo o marcador de oxidação proteica mais usado (CHEVION et al, 2000). O conteúdo de proteína carbonil tem vantagem sobre os produtos de peroxidação lipídica porque as proteínas são geralmente mais estáveis, além de se formar mais cedo e ficar no sangue por mais tempo do que outros parâmetros como o dissulfato de glutatião e o malondialdeído. Modificações oxidativas de enzimas e proteínas estruturais tem um importante papel na etiologia e/ou progressão de diversas patologias humanas. A identificação de proteínas oxidadas deve oferecer marcadores diagnósticos novos e informação para o estabelecimento de terapias antioxidantes eficazes (DALLE-DONNE et al, 2003).

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ou substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico constituem uma medida confiável da peroxidação lipídica.

As células leucêmicas produzem maiores quantidades de ROS do que as células não leucêmicas, pois estão em estado de bloqueio oxidativo repetido. Além disso, a quimioterapia se associa a um aumento dos radicais livres e a uma redução da capacidade antioxidante (BATTISTI et al, 2008).

O estresse oxidativo é, provavelmente, a causa mais frequente de dano ao DNA em neurônios (AHLES & SAYKIN, 2007).

O SNC é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo pela alta taxa de consumo de oxigênio e elevados níveis de lipídios poli-insaturados o que favorece o dano, além de defesas antioxidantes modestas. Níveis aumentados de estresse oxidativo neuronal produzem efeitos deletérios na transdução dos sinais, na plasticidade estrutural e na resiliência celular (GAMA et al, 2008).

Crianças tratadas para LLA recebem uma combinação quimioterápica em que muitos componentes estão associados à produção de radicais livres. Numa pesquisa com 103 crianças recentemente diagnosticadas com LLA, foram estudadas concentrações plasmáticas de antioxidantes (vitamina A, vitamina E e carotenóides), oxygen radical absorbance capacity (ORAC) e 8-Oxo-dG (DNA oxidized base 8-oxodeoxyguanosine) no diagnóstico, 3 e 6 meses após o diagnóstico. Pacientes com níveis mais elevados dessas substâncias apresentaram toxicidade reduzida, melhor qualidade de vida, menor índice de infecção, e menos atraso no tratamento (KENNEDY et al, 2005).

Biomarcadores do estresse oxidativo (por exemplo, fosfatidilcolina oxidada) no líquido têm sido correlacionados com a intensidade do tratamento com MTX, sugerindo uma associação com toxicidade aguda do SNC (MIKETOVA et al, 2005).

O estresse oxidativo é um fator de risco para déficit cognitivo. Djuric et al. (2008) cita um trabalho conduzido no México (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al, 2006) com 104 idosos da área

urbana e 84 da área rural. Os primeiros apresentaram níveis plasmáticos de TBARS mais elevados do que os idosos de áreas rurais, que eram similarmente saudáveis e realizavam quantidade equivalente de exercícios físicos. Ambos os grupos foram submetidos à avaliação cognitiva através do *Mini Mental State Examination*. Os achados foram associados com risco quase 5 vezes mais alto de desenvolver déficit cognitivo em áreas urbanas (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al, 2006).

Um estudo feito no Arizona (EUA) investigou o estresse oxidativo como um possível mecanismo de dano ao SNC induzido por quimioterapia, dosando componentes oxidados e não oxidados de fosfatidilcolina no líquido de 21 crianças com LLA de baixo e alto risco. Esse é o fosfolípido mais prevalente nas membranas celulares do SNC. Os resultados apoiam a hipótese de que os níveis mais elevados de fosfatidilcolina oxidada seriam observados nas fases mais intensivas do tratamento (consolidação) e no grupo de pacientes com LLA de alto risco. Os achados fornecem evidência preliminar para o estresse oxidativo induzido por quimioterapia nos fosfolípidos da membrana celular do SNC (MIKETOVA et al, 2005). Caron et al. (2009), em Memphis (EUA), examinaram 88 crianças com diagnóstico recente de LLA, dosaram fosfolípidos oxidados no líquido, e as seguiram por 3 anos, realizando testes neurocognitivos e avaliando relatos de funções executivas fornecidos pelos pais. Os resultados mostraram uma associação entre estresse oxidativo aumentado e funções executivas prejudicadas dois anos mais tarde. Crianças mais jovens demonstraram menos habilidade para organizar materiais no seu ambiente e níveis mais elevados de fosfatidilcolina no líquido: $r(48)=0,28, p<0,05$ e $r(48)=-0,27, p<0,05$ respectivamente. Concluem que os achados enfatizam a importância de monitorar déficit cognitivo em crianças tratadas para LLA, e que crianças com desenvolvimento menos avançado do SNC são mais vulneráveis.

Stenzel et al. (2010) estudaram os níveis de componentes oxidados e não oxidados de fosfatidilcolina (PC) no líquido de 87 crianças com LLA no diagnóstico, indução e consolidação; foi realizada uma avaliação comportamental após a consolidação e no final da quimioterapia. Os resultados revelaram associação significativa entre a reatividade fisiológica (PC alta vs. Baixa) e desfechos comportamentais (alta vs baixa patologia). A alteração da fração oxidada de PC elevada

foi preditiva de problemas com agressão no final do tratamento e adaptabilidade após a consolidação. Hiperatividade também variou em relação às frações oxidadas e não oxidadas. Esses achados sugerem que alterações comportamentais ocorrem precocemente no curso da quimioterapia e que o aumento dos marcadores de estresse oxidativo no líquido durante a indução e a consolidação podem auxiliar a prever certos problemas comportamentais futuros.

Na Polônia, outro estudo também contemplou o estudo do estresse oxidativo em 38 crianças com LLA, dosando 8-isoprostano no líquido, que aumentou no 59º dia de tratamento e permaneceu elevada durante a consolidação, quando a capacidade antioxidativa total média reduziu de forma importante. Os autores concluíram que esse estudo indica que a neurotoxicidade do tratamento *standard* pode se relacionar ao estresse oxidativo (PROTAS et al, 2010).

Partindo da idéia de que o tratamento para LLA se associa à produção de radicais livres, um estudo na *Columbia University* de Nova York, em 103 crianças diagnosticadas com LLA concluiu que os níveis de antioxidantes e de estresse oxidativo parecem se relacionar com a duração e complicações do tratamento. Vitamina A e E, carotenóides totais, 8-oxo-deoxiguanosina e capacidade antioxidante total se alteraram do diagnóstico até 6 meses de tratamento. Pacientes com níveis mais elevados dessas substâncias tiveram menos reduções de dose, menor número de quadros infecciosos, melhor qualidade de vida, menos atraso nos esquemas quimioterápicos, toxicidade reduzida e menor tempo de hospitalização (KENNEDY et al, 2005).

Com seu trabalho, El-Sabagh et al. (2011) concluíram que há evidências de níveis elevados de dano oxidativo e níveis reduzidos de antioxidantes em pacientes com LLA, sugerindo uma possível ligação entre esses dois importantes parâmetros nesse tipo de câncer.

Em Israel, Mazor D et al. (2008) estudaram o impacto do estresse oxidativo na LLA e em tumores sólidos pediátricos. Na LLA, os pacientes são submetidos a protocolos de quimioterapia continuada e agressiva e os pacientes com tumores sólidos recebem esquemas menos intensivos. A amostra consistiu de 7 crianças com LLA e 6 crianças com tumores sólidos, dosando níveis de tiol e habilidade de redução férrica no plasma (capacidade antioxidante). Concluíram que ambos os

grupos tinham status antioxidante prejudicado, porém, crianças com LLA tinham mais estresse oxidativo e status antioxidante mais baixo, levando à morte celular e maior sensibilidade das células tumorais ao tratamento, com desfechos melhores em paciente com LLA.

Crianças com LLA estão sujeitas a um protocolo quimioterápico agressivo e contínuo, enquanto crianças com tumores sólidos recebem um tratamento menos agressivo (MAZOR et al, 2008).

Além disso, evidências têm demonstrado que os distúrbios do metabolismo pelo estresse oxidativo são características comuns das células tumorais, podendo ocorrer alterações nos antioxidantes ou aumento das espécies reativas de oxigênio (BATTISTI et al, 2008).

Por outro lado, os radicais livres tem sido implicados na patogênese da leucemia. Singh et al. (2001), na Índia, estudaram o grau de peroxidação lipídica como um marcador da atividade da doença em 15 pacientes com LLA e 20 controles saudáveis, pareados por idade e sexo. Níveis de malonaldeído (MDA) foram mais elevados nos pacientes que se encontravam na fase ativa da doença, quando comparados com os níveis dos pacientes que já estavam em remissão. Concluíram que os níveis séricos de MDA na leucemia podem ter valor para o diagnóstico e como preditivo de recaída.

Está bem estabelecido que oxidantes têm um papel nos vários estágios da carcinogênese. A produção de ROS é inevitável em células que usam o metabolismo aeróbico; porém essas substâncias podem ser tanto benéficas quanto prejudiciais aos sistemas vivos. Podem agir em defesa a agentes infecciosos e em sistemas sinalizadores celulares. Porém, altas concentrações de ROS podem ser mediadores de danos a biomoléculas como o DNA proteínas e lipídios, levando a disfunção e morte celular (CERUTTI et al, 1994).

Battisti et al. (2008) também sugerem um envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da LLA. Eles encontraram aumento do dano oxidativo e redução dos níveis de antioxidantes em pacientes com LLA. Estudaram 80 crianças com LLA em Santa Maria (RS) divididas em 4 grupos: diagnosticadas recentemente, na indução da remissão, manutenção da remissão e fora de

tratamento, além de um grupo controle de 50 crianças normais. Encontraram conteúdo de proteína carbonil e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico aumentados em relação aos controles no primeiro grupo, isto é, em pacientes recém-diagnosticados, e eram mais elevados nesse do que no grupo dos pacientes em tratamento. No grupo fora de tratamento, os níveis de antioxidantes retornaram ao normal, indicando a regressão da doença como resultado do tratamento. Com esses dados, e apoiadas em outros artigos com resultados semelhantes, elas sugerem que o estresse oxidativo não parece ser o resultado da quimioterapia, mas pode ter envolvimento na patogênese da leucemia. Assinalam que o conteúdo de proteína carbonil pode ser irreversível, já que esse parâmetro está elevado no grupo fora de tratamento.

As mesmas autoras, (BATTISTI et al, 2009) concluíram que a acetilcolinesterase (AChE) tem um papel essencial no desenvolvimento da LLA. Partindo da idéia de que está bem estabelecido que a AchE presente no sangue e nos linfócitos tem funções não colinérgicas, incluindo desenvolvimento de câncer e contribuição na regulação de funções imunes. Battisti et al. (2009) investigaram a atividade dessa enzima em pacientes com LLA. Estudaram 72 crianças com LLA e 50 controles normais. As crianças com leucemia foram divididas em 4 grupos: recentemente diagnosticadas, na indução da remissão, na manutenção da remissão e fora do tratamento. Determinaram a atividade da AchE no sangue total e nos linfócitos desses pacientes. Os resultados mostraram que, no sangue total, essa atividade estava aumentada no grupo recém-diagnosticado e reduzida no grupo da indução e da manutenção em relação ao grupo controle. Nos linfócitos, estava aumentada nos recém- diagnosticados e reduzida somente no grupo da indução da remissão, em relação aos controles. As autoras concluíram que a atividade da AchE estava alterada nos pacientes com LLA e que esse fato pode estar relacionado fato com o papel essencial da AchE no desenvolvimento da doença hematológica e sua contribuição na regulação da função imune.

Sarmiento-Ribeiro et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia das leucemias linfóides e seu envolvimento nas recaídas leucêmicas. Para isso, estudaram 52 pacientes, 36 antes da quimioterapia e 16 após o tratamento.

Encontraram redução da atividade do SOD (superoxide dismutase) e da GL-PX (glutatião peroxidase) nos paciente com LLA antes do tratamento. Redução dos níveis de GHS (glutatião) e vitamina E nos pacientes não tratados com leucemia crônica e um aumento na formação das peroxidases nos dois tipos de leucemia, quando comparados a controle pareados. Nos pacientes recaídos, houve uma redução na geração dos peróxidos, o que pode se dever a um aumento nas defesas não enzimáticas, glutatião e vitamina E. Concluíram que os dados do estudo sugerem um envolvimento do estresse oxidativo na leucemia linfóide aguda e crônica, e na recaída.

Al-Tonbary et al. (2011) encontraram aumento do estresse oxidativo e apoptose em 50 crianças com LLA no diagnóstico e no final da fase de indução. Dosaram malondialdeído e capacidade antioxidativa total.

Os resultados de um estudo realizado em episódios de mania em pacientes bipolares sugerem que o aumento do estresse oxidativo tenha uma associação com níveis reduzidos de BDNF (KAPCZINSKI et al, 2008).

Considerando que dados da literatura sugerem que o exercício físico e a restrição calórica podem reduzir a incidência e a severidade dos transtornos neurológicos, Santin et al. (2011), no Brasil, estudaram o efeito da dieta e exercício físico em 40 ratos adultos, encontrando que ambos, juntos ou combinados, reduzem o estresse oxidativo no hipocampo. Eles encontraram uma redução no conteúdo de proteína carbonil, mas não detectaram alterações nos TBARS. Concluíram que esses dados poderiam ser usados como estratégia na prevenção de doenças neurodegenerativas.

2.4 FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE CÉREBRO (BDNF)

2.4.1 Aspectos Gerais

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*- BDNF), é um polipeptídeo com peso molecular de 13,6 kDa e 119 aminoácidos que pertence à família das neurotrofinas de proteínas sinalizadoras (COWANSAGE et al, 2010).

Por sua vez, as neurotrofinas (NT), juntamente com o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF *Glial cell-derived neurotrophic factor*) constituem os fatores neurotróficos (COWANSAGE et al, 2010).

As neurotrofinas são sintetizadas primariamente como proteínas precursoras 30–35 kDa ou pro-neurotrofinas, que são clivadas por pro-convertases, gerando proteínas maduras (COWANSAGE et al, 2010).

As neurotrofinas regulam a sobrevivência e a diferenciação dos neurônios durante o desenvolvimento, mas evidências crescentes indicam que elas também estariam envolvidas em várias funções na vida adulta, além dos processos de neuroplasticidade (COWANSAGE et al, 2010).

Em 1953 ocorreu a descoberta do fator de crescimento neuronal (NGF – *nerve growth factor*) que era conhecido como o protótipo do fator neurotrófico por muitas décadas.

Quase trinta anos após, foi isolado o BDNF, em neurônios de porcos. A partir de então, foram identificados membros adicionais da família das neurotrofinas: a NT-3 a NT-4 e a NT-5 (LESSMANN et al, 2003).

Décadas após, foram descobertos os receptores das neurotrofinas, que são os receptores tirosina quinase TrkA, TrkB e TrkC. O BDNF se liga, com alta afinidade, ao TrkB (tropomyosin-related kinase B). Os receptores Trk têm, como característica, a presença de domínios tirosina-kinases desencadeadores da transdução de sinais intracelulares (WALZ et al, 2000).

O BDNF é a neurotrofina mais vastamente distribuída no SNC (MURER et al, 2001) e tem capacidade de regular diversas funções biológicas, tais como crescimento axonal e conectividade, mediação do processo de sobrevivência e apoptose neuronal, além de participar na resposta local a

diversos estressores neuronais e ambientais. Regula a neuroplasticidade, a expressão gênica, a função sináptica e a cognição no cérebro adulto (QIAN et al, 2007).

O BDNF é um potente modulador da plasticidade sináptica (COWANSAGE et al, 2010), está envolvido não somente no neurodesenvolvimento, mas também na neuroproteção (PANDEY et al, 2008), tem importante papel no aprendizado e memória (YAMADA et al, 2002).

No início da fase fetal, o BDNF é importante para a formação e maturação dos neurônios em geral. Na fase adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (POST, 2007). O BDNF tem produção aumentada no ser humano até por volta dos 40 anos, apresentando queda após essa idade (KATOH-SEMBA et al, 2007). As modificações na expressão do BDNF podem ocorrer por uma série de respostas a eventos, tais como crises epiléticas e hipóxia cerebral (MARINI et al, 2007; TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004), uso de glicocorticoides (KUMAMARU et al, 2008), esteróides sexuais (BEGLIUOMINI et al, 2008) (e exercícios físicos (LOU et al, 2008).

O gene que codifica o BDNF localiza-se no braço curto do cromossomo 11 e tem estrutura genômica complexa com pelo menos 4 regiões promotoras de sua transcrição. O mesmo conta com múltiplos elementos reguladores e promotores que se expressam de modo diferente em tecidos centrais e periféricos. A expressão do BDNF é regulada pela atividade neuronal ou por hormônios periféricos (NEVES-PEREIRA et al, 2002).

Após a transcrição, o pró-BDNF é levado ao retículo endoplasmático, sendo então envolto pelo transgolgi e empacotado em vesículas secretórias. As vesículas podem ser agrupadas para liberação espontânea ou, mais frequentemente, liberadas frente a um estímulo (CHEN et al, 2006). O pró-BDNF secretado por neurônios (substância negra, amígdala, hipotálamo, cerebelo e córtex cerebral), e células de Schwann (produtoras de mielina), é posteriormente convertido em BDNF maduro por proteases extracelulares, tais como plasmina e fator ativador de plasminogênio extracelular (PANG & LU, 2004).

O BDNF é considerado uma molécula essencial no mecanismo de formação de potenciação de longa duração (LTP= long term potentiation), mecanismo essencial na aprendizagem e memória. A LTP é um aumento duradouro na resposta excitatória pós-sináptica que resulta da ação de um estímulo repetido de mesma intensidade e duração (MONTEGGIA et al, 2004).

O processo de um estímulo na membrana sináptica promove a ativação da adenilato ciclase (AC), que converte o ATP no segundo mensageiro AMPc. O estímulo repetido promove a translocação para o núcleo da subunidade catalítica, da PKA (proteína cinase A) que recruta, desta forma, a MAPK (mitogen-activated protein kinase). No núcleo, a PKA e MAPK fosforilam e ativam a AMPc responsivo ao CREB (cAMP response element binding) e removem a ação repressiva do CREB-2, um inibidor do CREB-1. O CREB-1, por sua vez, ativa vários alvos, entre eles o BDNF que acaba por ocasionar mudanças estruturais que resultam no crescimento de novas conexões sinápticas (BRAMHAM & MESSAOUDI, 2005; LOU et al, 2008).

A ação do BDNF ocorre através de sua ligação aos receptores denominados Trk-B, promovendo uma cascata de sinalizadores intracelulares e de transcrição em vários sistemas neuroquímicos (MAPK, PI3-K, PLC) (REICHARDT, 2006).

O p75 é outro receptor das neurotrofinas e parece atuar como co-receptor que modula a sinalização dos receptores Trk.

A ativação do Trk-B/p75 promove e suprime, respectivamente, o crescimento dendrítico, assim como uma potenciação ou depressão sináptica. Esse balanço entre as ligações BDNF-TrkB e pró-BDNF-p75 é importante para as alterações das estruturas sinápticas e densidade das espículas dendríticas (LOU et al, 2005) e, portanto, fundamental para a chamada plasticidade sináptica.

Estudos em camundongos têm elucidado a importância do BDNF, principalmente através da remoção genética de uma cópia do gene que o codifica (modelos animais “knock-out”) (PATTERSON et al, 1996).

A supressão gênica completa do BDNF (BDNF -/-) impede o conceito de progredir o desenvolvimento além da fase embrionária. A depleção do BDNF após o nascimento ocasiona

extrema dificuldade de aprendizado e memória. A depleção na vida adulta, por sua vez, ocasiona em diminuição da LTP. Consistentemente com tais dados, camundongos BDNF +/- são incapazes de se orientarem em labirintos, apresentam diminuição de neurogênese e tamanho do hipocampo (LEE et al, 2002), assim como uma variedade de alterações neuroquímicas e comportamentais incluindo diminuição de serotonina (5-HT) em associação com agressividade e hiperfagia (LYONS et al, 2012).

Influências ambientais, agudas ou crônicas, também podem afetar os níveis cerebrais de BDNF, além das variações genéticas. Interessantemente, Roceri et al. (2004) observaram que um dia de privação materna em ratos resulta em diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo. Esses autores também concluíram que o estresse prolongado resulta em déficits persistentes no hipocampo e regiões corticais. Kikusui et al. (2009) encontraram que a falta de interação mãe-bebê durante a fase tardia da lactação leva a um aumento na síntese de corticoesterona por 2 dias e uma redução na síntese de BDNF em roedores machos; além disso, essa falta de interação, transitoriamente, inibe a proliferação de células do hipocampo e a sobrevivência de machos e fêmeas, embora esse efeito seja mais pronunciado nos machos. Os resultados de um estudo no Brasil sugerem que a privação materna produz alterações no comportamento, nos níveis circulantes de ACTH e de neurotrofinas, alterações essas que podem contribuir para doenças relacionadas ao estresse, como a depressão; eles encontraram níveis reduzidos de BDNF na amígdala de ratos com privação materna (REUS et al, 2011).

A maioria dos efeitos do BDNF são mediados através do receptor tirosina kinase de alta afinidade, isto é, o receptor TrkB. BDNF ligado ao TrkB induz dimerização, fosforilação e ativação do domínio tirosina kinase intracelular. Esses eventos iniciam várias cascatas complexas intracelulares de transdução de sinais que, subsequentemente, induzem respostas biológicas (COROMINAS et al, 2007).

Quando um agonista se liga ao TrkB, ocorre uma dimerização do receptor, seguida de uma autofosforilação dos resíduos tirosina intracelulares. Esses resíduos são atingidos por diversas

proteínas intracelulares que ativam proteínas G e cascatas sinalizadoras, como a via MAPK (mitogen-activated protein kinase), a PI3K (phosphoinositol-3kinase), a PLC- γ (Phosphoinositide phospholipase C- γ), e a CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II). Por último, ocorre a indução da transcrição e um exemplo primário é a CREB ([cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element-binding protein], como mostra a **Figura 1**.

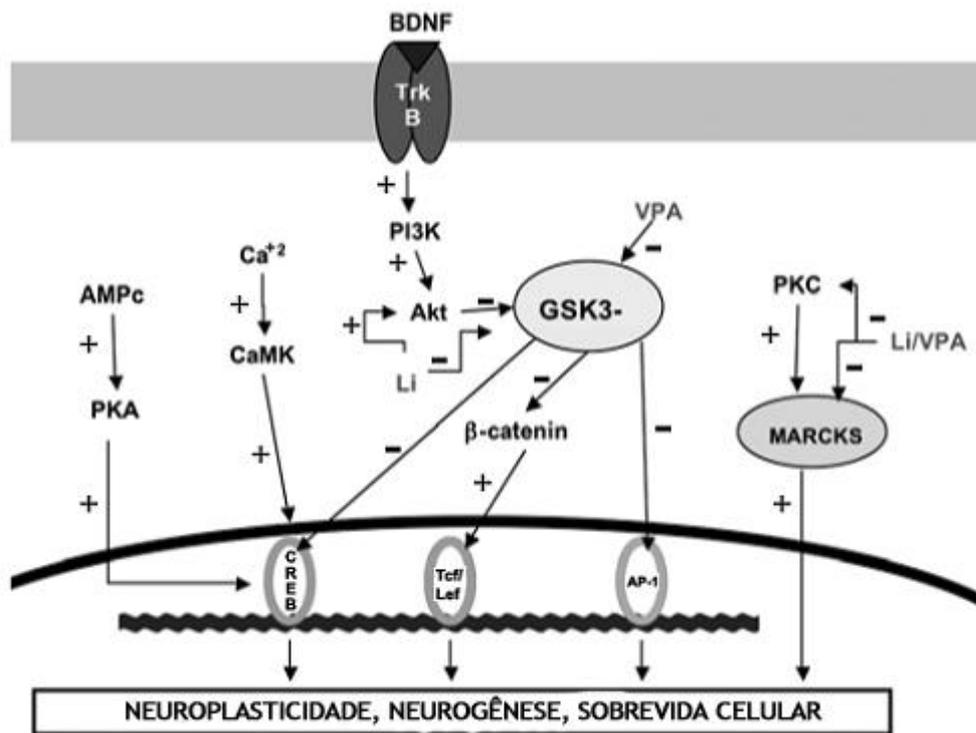


Figura 2 – Regulação da expressão gênica e neuroplasticidade

CREB-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CaMKII calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, cAMP-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), PI3K phosphoinositol-3kinase, MAPK -mitogen-activated protein kinase,

Modificado de SOSSIN & BARKER, 2007.

O BDNF é um mediador chave da plasticidade sináptica e neuronal em adultos. Induz alterações duradouras na composição sináptica, expressão de canais de íons e produção de neurotransmissores em estruturas neuronais do cérebro (BALDELLI et al, 2002).

A expressão do BDNF e do TrkB mRNA varia em função do desenvolvimento, da idade e da performance cognitiva, e também de acordo com as áreas do SNC. O BDNF é altamente expressado no córtex cerebral e no hipocampo, áreas ligadas à regulação da memória e das emoções (KAPCZINSKI et al, 2009).

Geralmente, o BDNF mRNA é *up-regulated* pelo glutamato, acetilcolina e serotonina e *down-regulated* pelo GABA ácido gama-amino-butírico, um neurotransmissor inibitório (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004)

Os níveis séricos de BDNF incluem o BDNF livre e o BDNF estocado nas plaquetas. Como esse último não é liberado no plasma, os níveis séricos de BDNF são mais de 100 vezes os níveis plasmáticos (LOMMATZSCH et al, 2005b).

Quantidades significativas de BDNF são armazenadas nas plaquetas humanas circulantes (como refletido pelos altos níveis séricos de BDNF) enquanto níveis baixos são encontrados no plasma humano (FUJIMURA et al, 2002; LOMMATZSCH et al, 2005b).

O BDNF sérico em humanos deriva da degranulação das plaquetas (FUJIMURA et al, 2002; RADKA et al, 1996). As plaquetas não produzem BDNF por si próprias, mas adquirem, ativamente, o BDNF do sistema nervoso central após atravessarem a barreira hematoencefálica (FUJIMURA et al, 2002; LOMMATZSCH et al, 2005b). Assim, um conteúdo anormal de BDNF na circulação sanguínea pode indicar uma produção alterada de BDNF no cérebro (LASKE et al, 2006; LOMMATZSCH et al, 2005b; SHIMIZU et al, 2003). Por isso, o BDNF sérico poderia ser um candidato potencial como biomarcador periférico in vivo no acompanhamento de terapias neuroprotetoras (BORRELL-PAGES et al, 2006; MARX, 2005).

O transporte de BDNF nas plaquetas representa uma característica única da fisiologia do BDNF humano. As plaquetas adquirem e armazenam quantidades substanciais de BDNF, o que resulta em altos níveis de BDNF no soro. Em contraste, os níveis plasmáticos representam o BDNF circulante livre. Os níveis de BDNF no plasma reduzem significativamente com a idade e peso, enquanto os das plaquetas não reduzem. Quando pareados para peso, não há diferenciação

significativas entre os sexos em relação aos níveis plasmáticos, porém, as mulheres têm níveis plaquetários de BDNF significativamente mais baixos do que os homens (LOMMATZSCH et al, 2005b).

O BDNF plaquetário não é produzido pelas plaquetas, nem pelos seus precursores. Ele é ativamente adquirido pelas plaquetas a partir de fontes externas e liberado por estimulação agonista. Plaquetas são sistemas de transporte de BDNF. Esses achados corroboram o postulado de que as plaquetas representam uma boa estimativa da secreção média de BDNF pelos diversos órgãos do corpo (CIAMMOLA et al, 2007).

Há evidências de que os níveis de BDNF no sangue periférico se relacionam às concentrações de BDNF no sistema nervoso central (KAREGE et al, 2002). Isso faz sentido com o achado de que o BDNF prontamente atravessa a barreira hematoencefálica (PAN et al, 1998). Provavelmente, existe um nível estável entre a periferia e o cérebro (PANDEY et al, 2010). Assim, os níveis séricos podem ser uma medida mais direta e representativa da atividade periférica e, conseqüentemente, central do BDNF (KAREGE et al, 2005).

A concentração sérica do BDNF aumenta nos primeiros anos de vida, tem um pequeno pico ao redor dos 30 anos e reduz levemente ao longo da vida adulta.

Num estudo com ratos adultos, foi encontrada uma alteração circadiana no BDNF sérico semelhante à do córtex, indicando uma possível associação com as funções corticais.

Investigações recentes analisaram a hipótese de uma possível variação noturna de BDNF circulante em humanos do sexo masculino. Uma correlação com o ritmo circadiano do cortisol também foi pensada, já que tanto o BDNF quanto o cortisol estão envolvidos na manutenção das funções cerebrais (BEGLIUOMINI et al, 2008).

A atividade física e a restrição dietética exercem efeitos neurotrópicos e modulam positivamente os níveis de BDNF.

Tem sido sugerido que o BDNF possa estimular a produção de proteínas envolvidas na adaptação celular ao estresse, crescimento e reparo, neurogênese, aprendizado e memória e

sobrevida celular. Há evidências de que o aumento do BDNF no plasma ou nos tecidos tenha potencial terapêutico (MANNI et al, 2005).

Thoenen (1995) sugere que o BDNF sérico é positivamente associado à contagem de plaquetas e negativamente associado ao IMC e à idade.

El-Gharbawy et al. (2006) concluíram que o BDNF sérico é mais baixo em crianças e adolescentes extremamente obesos do que nos de peso normal.

Várias linhas de evidência apoiam que o BDNF tenha um papel essencial no comportamento alimentar e que alterações no sistema neurotrófico participam na susceptibilidade para anorexia nervosa e bulimia nervosa (RIBASES et al, 2005). Estudando associação entre BDNF e medidas de adiposidade, os autores encontraram que não havia associações significativas entre univariadas BDNF log e adiposidade medida pelo índice de massa corporal (IMC), IMC-escore Z, ou massa de gordura. No entanto, em uma análise da contabilidade de covariância para a idade, sexo, raça, status puberal, e contagem de plaquetas, BDNF foi menor nas crianças com excesso de peso (média \pm sd, $39,8 \pm 24,8$ vs $47,0 \pm 25,4$ ng/dl, $P = 0,03$).; em análises de regressão múltipla com BDNF log como variável dependente, o IMC ($P = 0,03$), IMC-Z ($P = 0,01$) e gordura corporal ($P < 0,02$) foram todos negativamente associados com BDNF, uma vez que a idade, o estado puberal e a contagem das plaquetas contagem foram incluídos no modelo. A ingestão de uma refeição não alterou significativamente, o BDNF 1 hora mais tarde ($p=0,26$).

É possível que os níveis circulantes de BDNF se alterem por uma demanda neuronal, já que os neurônios podem adquirir BDNF da periferia (STAATS et al 2005).

Pacientes com síndrome da apnéia obstrutiva, frequentemente, demonstram disfunção cognitiva persistente, apesar do tratamento com *Continuous Positive Airway Pressure* (CPAP). Staats et al. (2005) estudaram o BDNF durante o tratamento com CPAP para a síndrome da apnéia obstrutiva. Os achados mostram que o tratamento efetivo com CPAP causa impacto nos níveis circulantes de BDNF reduzindo rapidamente os níveis, porém seus experimentos com culturas celulares não encontraram redução na liberação espontânea de BDNF pelos monócitos após o

tratamento. Os autores concluem que o tratamento com CPAP está associado com a redução das concentrações de BDNF circulante, mas não com uma redução da secreção de BDNF. Eles levantam a hipótese de que esse fenômeno reflete uma demanda neuronal aumentada para BDNF durante o tratamento, já que os neurônios podem adquirir BDNF periférico para alterar a atividade neuronal e a transmissão sináptica. Níveis circulantes reduzidos de BDNF nesse período crítico de tempo poderiam interferir com o desempenho cognitivo. Eles concluem que deveria ser especulado se o BDNF circulante não reflete a *performance* cognitiva básica, mas sim a habilidade de reagir a uma demanda não usual (STAATS et al, 2005).

Os níveis plaquetários podem ser alterados sob demanda. O pulmão adulto é uma importante fonte de BDNF. Foi demonstrado que a inflamação alérgica das vias aéreas aumenta a produção local de BDNF. Assim, as concentrações aumentadas de BDNF nas plaquetas poderia refletir uma captação aumentada de BDNF pelos pulmões inflamados (LOMMATZSCH et al, 2005a). Os autores trazem evidências de que os corticóides inalatórios podem efetivamente suprimir a produção de BDNF. Porém o significado desses achados no contexto dos complexos mecanismos pelos quais os corticóides afetam a obstrução das vias aéreas necessita ser estudado (LOMMATZSCH et al, 2005a).

Partes do cérebro adulto retêm a habilidade de adquirir novos neurônios de células-tronco neurais através da neurogênese. As neurotrofinas ajudam a estimular e a controlar a neurogênese, sendo que o BDNF é uma das mais ativas (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004).

2.4.2 BDNF, Memória e Cognição

O BDNF age em certos neurônios do SNC e periférico, auxiliando neurônios existentes e encorajando o crescimento e a diferenciação de novos neurônios e sinapses. Ele é ativo no

hipocampo e no córtex frontal, que são áreas vitais no aprendizado, memória e pensamento (SHERWOOD & LO, 1999).

A via de sinalização neurotrofina-trk tem proeminência no campo da neurobiologia. A ativação da TrkB pelo BDNF é chave para o aumento da excitação atividade-estimulada dos neurônios, que é necessário para o desenvolvimento e manutenção da memória (YAMADA et al, 2002).

O BDNF está associado aos processos de memória e cognição devido à sua participação na neurogênese no hipocampo. A proliferação de células no giro dentado do hipocampo adulto dá origem a novos neurônios envolvidos na memória e aprendizado, e necessitam de fatores neurotróficos, tais como o BDNF para nutrir esse processo de neurogênese adulta (EGAN et al, 2003).

Níveis reduzidos de BDNF no cérebro humano estão associados a déficits cognitivos, desempenho prejudicado da memória e depressão (CHEN et al, 2001; EGAN et al, 2003).

A plasticidade neuronal mediada pelo BDNF tem sido demonstrada ser essencial para as funções cognitivas e para a consolidação da memória, sendo crítico para a produção da memória de longa duração (MLD) (YAMADA et al, 2002).

A MLD depende da síntese “de novo” e da ação do BDNF no hipocampo (BEKINSCHTEIN et al, 2008). Esses autores demonstraram que a persistência da memória de longa duração (MLD) requer uma síntese proteica tardia e uma fase BDNF-dependente no hipocampo. Também mostraram que a descarga intrahipocampal de BDNF reverte o déficit de memória causado pela inibição da síntese proteica hipocampal. Um achado importante desses autores é de que o BDNF, ele mesmo, induz a persistência da memória, transformando um traço não duradouro de MLD numa memória persistente de um modo dependente do ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*). Assim o BDNF não é apenas necessário, mas suficiente para induzir uma fase tardia pós-aquisição no hipocampo, essencial para a persistência do armazenamento da MLD (BEKINSCHTEIN et al, 2008).

Estudos identificaram os mecanismos celulares através dos quais o BDNF promove LTP (*long-term potentiation*), um dos mecanismos importantes para a memória e o aprendizado. Demonstraram que níveis de neurotrofina podem ser elevados através de modulação de transmissão glutaminérgica e forneceram evidências de que esse aumento pode ser usado para restabelecer plasticidade sináptica induzida por atividade em modelos animais de déficit cognitivo e proteger os neurônios do hipocampo de insulto isquêmico (GALL et al, 2009).

O treinamento de aprendizado e a formação de memória de curto ou longo prazo induzem *up-regulation* do BDNF mRNA no hipocampo, enquanto a privação de BDNF endógeno resulta no prejuízo do aprendizado e da memória espaciais em ratos adultos (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004).

A restrição dietética pode induzir a expressão do BDNF no giro dentado e o BDNF pode suprimir a produção de oxi-radicais, estabilizar a função mitocondrial e proteger os neurônios de vários insultos; a restrição dietética, então, pode aumentar a plasticidade neuronal (COLEMAN, 2005). Uma intervenção dietética realizada em 67 pacientes esquizofrênicos concluiu que os pacientes submetidos a uma dieta hipocalórica apresentavam níveis séricos de BDNF, significativamente, mais elevados ($p=0,0023$) do que aqueles que não receberam dieta hipocalórica (GUIMARÃES et al.,2008).

Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos aumenta os níveis de BDNF mRNA e a neurogênese no hipocampo do rato adulto (BAJ et al, 2012). Hormônios, como os glicocorticóides, inibem a proliferação no giro dentado e *down-regulate* a expressão de BDNF mRNA (Schaaf et al 1998).

No hipotálamo, o BDNF pode ajudar a restabelecer as reservas hipotalâmicas hormonais após um transtorno homeostático ou facilitar a liberação hormonal para o sistema porta na eminência mediana, isto é, o compartimento de liberação. No hipotálamo, o BDNF também participa nas funções neurovegetativas, por exemplo, controlando a ingesta alimentar ou a atividade física, duas funções que parecem intimamente relacionadas. Todas essas alterações podem

contribuir para a resiliência do cérebro para se adaptar através da alostase (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004).

Com os avanços nas neurociências e estudos em estresse, existe agora um maior entendimento das vias e mecanismos intracelulares envolvidos nessas ações. Maior compreensão dos eventos celulares e moleculares confirma o papel protetor do BDNF. Em adição às múltiplas ações do BDNF no cérebro, em condições fisiológicas e patológicas, o resultado global da pesquisa sugere um papel dessa molécula na capacidade de resiliência do cérebro, oferecendo novas esperanças para as estratégias de tratamento para potencializar a eficácia do BDNF no cérebro (TAPIA-ARANCIBIA et al, 2004).

Mustafa et al. (2008) encontraram que a quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU) causou uma redução significativa dos níveis de BDNF no hipocampo de ratos adultos e uma alteração da memória espacial desses roedores. Esses achados ilustram a utilidade de modelos animais de *'chemobrain'*, isto é *chemotherapy-induced cognitive dysfunction*, para o entendimento dos mecanismos envolvidos no declínio do desempenho cognitivo e memória, associados à quimioterapia.

Pensa-se que o armazenamento da memória ocorra por uma modificação estrutural das conexões sinápticas e crescimento neuronal. De acordo com essa idéia, o BDNF aumenta o número de espinhas dendríticas dos neurônios piramidais CA1 (BEKINSCHTEIN et al, 2008). Armazenamento prolongado da informação é uma característica fundamental do cérebro. Memórias podem durar por horas (*short-term memory*, STM) ou por dias, semanas e até por toda vida (*long-term memory*, LTM). LTM requer, enquanto a STM não necessita, uma expressão gênica e um processo de estabilização dependente da síntese proteica, chamado consolidação, que ocorre em áreas restritas do cérebro, particularmente no hipocampo. Dependendo da força e/ou saliência da informação a ser lembrada, as LTMs podem persistir por somente 24-48 horas ou por muitos dias ou semanas. Para uma LTM se tornar duradoura, as alterações devem persistir após a aquisição para o traço se tornar imune ao *turnover* molecular. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos

moleculares que fazem algumas LTM persistirem mais que as outras (MARTINEZ-MORENO et al, 2011).

O BDNF regula a estrutura e função neuronais. Em particular, isso é crítico para a plasticidade sináptica e o processamento da memória no cérebro adulto. De fato, o BDNF induz e é suficiente para *long-term potentiation* (LTP) no hipocampo, uma forma de plasticidade sináptica, que se pensa possa estar na base da formação da LTM. Recentemente, os autores descreveram a necessidade de uma fase tardia da síntese proteica e expressão do BDNF no hipocampo, 12 horas após o treinamento, para a persistência da LTM consolidada. Os autores encontraram que, bloqueando a expressão e a função do BDNF no hipocampo, durante um período crítico de tempo, causa um déficit na persistência da memória, sem afetar a formação da LTM, indicando que a síntese do BDNF durante essa fase tardia dependente de síntese proteica, é crucial para a persistência do armazenamento da memória. Os autores investigaram se o BDNF é suficiente para a persistência da memória e se ele pode, por si, promover a persistência do armazenamento da LTM. Dado que o BDNF ativa vários efetores sinalizadores, incluindo o ERK, eles examinaram os mecanismos da persistência da LTM induzida pelo BDNF (MARTINEZ-MORENO et al, 2011).

Baker et al. (BAKER et al, 2010) estudaram o efeito do exercício aeróbico em indivíduos com déficit cognitivo leve, encontrando que os efeitos do tratamento no BDNF plasmático foram paralelos aos do cortisol. O BDNF está ligado à glicoregulação e à sensibilidade à insulina e é altamente regulado pela atividade do eixo HPA (hipotalâmico-hipofisário-adrenal). Intervenções, como exercício aeróbico, que alteram marcadamente a atividade do eixo HPA podem ter o potencial de oferecer benefícios clinicamente significativos.

Os mecanismos para as alterações cognitivas induzidas pela quimioterapia são pouco conhecidos. Contudo, vários mecanismos candidatos têm sido identificados. Ahles e Saykin (2007) sugerem que fatores de risco genéticos compartilhados para o desenvolvimento do câncer e problemas cognitivos, incluindo bombas de efluxo de baixa eficácia levando a um aumento na exposição a toxinas no cérebro, déficits nos mecanismos de reparo do DNA e/ou resposta imune

desregulada, associados ao efeito da quimioterapia possam contribuir para o declínio cognitivo em pacientes após o tratamento.

2.4.3 BDNF e Doenças Neuropsiquiátricas

Os níveis de BDNF em sido amplamente estudados em doenças neurológicas e psiquiátricas (GAMA et al, 2008; KAPCZINSKI et al, 2009; KAPCZINSKI et al, 2008; KAUSER-SANT'ANNA et al, 2009; MACHADO-VIEIRA et al, 2007; PANDEY et al, 2010; TRAMONTINA et al, 2009)

A redução dos níveis de BDNF tem sido implicada na fisiopatologia de vários transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos. Pensa-se que alterações na sua expressão podem contribuir para algumas patologias tais como depressão, doença bipolar, epilepsia, doença de Alzheimer e de Parkinson (ZUCCATO & CATTANEO, 2009).

Tramontina et al. (2009) num estudo prospectivo de 10 pacientes bipolares, encontraram que o BDNF estava diminuído durante a mania, comparado aos controles e que a diferença deixava de ser significativa após o tratamento do episódio agudo de mania. Ocorreu um aumento agudo do BDNF após o tratamento. Os achados sugerem que as alterações nos níveis de BDNF possam estar associadas com a resposta ao tratamento na mania aguda.

A expressão do BDNF no SNC é modificada por vários tipos de insulto ao cérebro (estresse, isquemia, atividade convulsiva, hipoglicemia) e, com exceção de situações muito traumáticas, o funcionamento cerebral é resiliente ao estresse, e capaz de plasticidade adaptativa, sendo que as neurotrofinas podem agir como mediadores da plasticidade (SHIEH et al, 1998).

Gonul et al. (GONUL et al, 2005) encontraram níveis basais de BDNF significativamente mais baixos em pacientes deprimidos comparado aos controles. Tratamento com 8 semanas de

antidepressivos aumentou significativamente os níveis séricos de BDNF que se tornaram semelhantes aos controles. Pandey et al. (2010) encontraram resultados similares.

Estudos sugerem que o BDNF contribui para a epileptogênese. Ele aumenta a excitabilidade neuronal, a atividade epiléptica aumenta a expressão de BDNF mRNA e de proteína, e recentes estudos demonstraram que, interferindo no sinal de transdução do BDNF se pode inibir o desenvolvimento do estado epiléptico *in vivo* (BINDER et al, 2001).

Os níveis séricos de BDNF estão reduzidos em pacientes esquizofrênicos (GRILLO, 2005), autistas (AL-AYADHI, 2011; KATOH-SEMBA et al, 2007), e aumentados em crianças e adultos com a síndrome de Down (NELSON, 2006; DOGLIOTTI et al ,2010).

O BDNF está envolvido no neurodesenvolvimento e também na neuroproteção. (PANDEY et al, 2010)

Como o BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica em ambas as direções, é produzido também nas células periféricas, como os linfócitos (PAN et al, 1998). Então, Pandey et al. (2010), concluem que os níveis séricos baixos encontrados nos pacientes com Doença Bipolar pediátrica podem se dever, não somente à redução na produção cerebral, mas também à redução da produção de BDNF na periferia (ie, redução de mRNA nos linfócitos pode também ser um dos fatores responsáveis pela redução de BDNF no cérebro desses pacientes).

2.4.4 BDNF e Estresse Oxidativo

A expressão do BDNF é sensível a alterações da disponibilidade do oxigênio, sugerindo que o BDNF possa estar envolvido nas respostas adaptativas ao estresse oxidativo (WANG et al, 2006).

Um estudo publicado no *European Journal of Neuroscience*, em 2004, encontrou que o estresse oxidativo pode interagir com o sistema BDNF para modular a plasticidade neurosináptica e a função neurocognitiva. Assim, os estudos parecem revelar um mecanismo pelo qual os eventos

classicamente relacionados à manutenção do balanço energético da célula, como o estresse oxidativo, podem interagir com os eventos moleculares que modulam a plasticidade neuronal e comportamental (WU et al, 2004).

Outro estudo sugere que alterações no estado oxidativo podem estar associadas a níveis reduzidos de BDNF em indivíduos com doença bipolar, embora uma relação causal não possa ser inferida (KAPCZINSKI et al, 2008).

A restrição dietética pode induzir a expressão do BDNF no giro dentado e o BDNF pode suprimir a produção de oxi-radicais, estabilizar a função mitocondrial e proteger os neurônios de vários insultos; a restrição dietética, então, pode aumentar a plasticidade neuronal (COLEMAN, 2005).

2.4.5 BDNF e Onco- Hematologia

As neurotrofinas, originalmente identificadas devido à sua habilidade de promover sobrevivência neuronal, são críticas ao desenvolvimento e sobrevivência de múltiplos tecidos extra-neurais. As células de todas as linhagens hematopoiéticas, assim como o estroma da medula óssea, expressam neurotrofinas e seus receptores (LAURENZI et al, 1998). Estudos são necessários para avaliar se a expressão é acompanhada de síntese das proteínas correspondentes. Mas é tentador especular se o BDNF e/ou NT-4 derivado dos granulócitos possam agir como fatores de crescimento hematopoiéticos (LABOUYRIE et al, 1999).

BDNF e TrkB são expressos pelos linfócitos T e B e também pelas células endoteliais e plaquetas (DONOVAN et al, 2000; KIM et al, 2004).

No sistema imunológico, as neurotrofinas influenciam todas as fases do desenvolvimento linfocitário, incluindo o crescimento e sobrevivência das células T e B, o desenvolvimento da memória imunológica e a produção de imunoglobulina (PEARSE et al, 2005).

O BDNF é uma neurotrofina que age como fator de crescimento no desenvolvimento do sistema nervoso ao ativar seu receptor (TrkB). Por outro lado, essa via BDNF/TrkB vem sendo relacionada a processos oncogênicos não-neuronais, sendo investigada sua relação com a progressão tumoral e ao prognóstico da doença (PRUSCH et al, 2011).

O TrkB promove uma vantagem de crescimento e pode proteger da quimioterapia (EGGERT et al, 2001). Esse autor estudou um grupo de crianças com tumor de Wilms, concluindo que a expressão aumentada de TrkB no tumor estava associada a mau prognóstico.

Uma das vias que sabidamente previnem contra a apoptose é a cascata de sinalização promovida pela ligação do BDNF ao seu receptor TrkB (BDNF/TrkB) (BARDE, 1994).

Existe evidência crescente para o envolvimento dos receptores TrkB na leucemogênese, e dos receptores TrkC e TrkA na Leucemia Mielóide Aguda (LI et al, 2009).

Pesquisadores na Alemanha sugerem que os Trks tem um importante papel na leucemogênese, expandindo conceitos atuais e encorajando a avaliação futura de sinalização de receptores das neurotrofinas como terapia-alvo na leucemia. Li et al. (2009), num estudo prospectivo com 94 adultos, demonstraram que células de leucemia aguda frequentemente expressam Trk e BDNF. Além disso, estabeleceram uma correlação clara entre o padrão de expressão do Trk e a classificação FAB (French-American-British) de leucemia. Encontraram que pacientes que co-expressavam TrkB e BDNF tiveram pior prognóstico. Descobriram que a sinalização TRK é importante para a manutenção das células leucêmicas in vitro. Li et al. (2009) sugerem que terapia-alvo na atividade enzimática da TrkB e seus efetores *downstream* pode ser benéfico no tratamento de tumores sólidos e leucemias.

O TrkB é, frequentemente, superexpresso no neuroblastoma, o tumor sólido mais frequente na infância, originado nas células primitivas do sistema nervoso simpático (EDSJO et al, 2003; LI et al, 2010).

Estudos recentes indicam que a expressão de TrkB contribui para a patologia tumoral (THIELE et al, 2009). Atualmente, tem sido demonstrado que Trks regulam importantes processos em células não neuronais e, além do seu impacto nos tumores de origem neural, podem contribuir para a patogênese de carcinomas, mielomas, tumores prostáticos e neoplasias linfóides.

Os Trks podem ter tanto um papel bom quanto mau na oncogênese. Os pacientes com neuroblastoma cujos tumores expressam níveis elevados de TrkA ou TrkC tem um melhor prognóstico, enquanto aqueles cujos tumores expressam níveis elevados de TrkB tem um prognóstico pior. Contudo, a expressão de TrkC se associa a um melhor prognóstico em meduloblastoma (THIELE et al, 2009).

Quando não há translocação nem mutação nos Trks, persistem dúvidas: eles funcionam como marcadores do desenvolvimento ou marcadores tumorais, ou eles tem um papel fisiopatológico na biologia das células tumorais?

A ativação neurotrofina-Trk faz a mediação dos sinais de sobrevivência e estimula a neurogênese e a migração em neurônios normais; então, esses mesmos processos podem ser explorados pelas células tumorais para sobreviverem a insultos citotóxicos ou para metastatizarem. As células tumorais de neuroblastoma que expressam TrkB, quando tratados com BDNF, são menos sensíveis a drogas citotóxicas, sobrevivem sob condições de fatores de crescimento limitantes e mostram invasibilidade aumentada e aumento na produção de VEGF. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) é uma proteína sinalizadora produzida pelas células que estimula a vasculogênese e a angiogênese (THIELE et al, 2009).

Geiger e Peeper (2007) encontraram que o TrkB, o receptor do BDNF, protege a célula contra *anoikis* (morte celular programada induzida por *detachment*) em diferentes linhas de células epiteliais e através da espécie, por um mecanismo que requer a ativação da via da

phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B. Tem sido sugerido que a resistência à *anoikis* é um pré-requisito para que células cancerosas metastatizem. Esses autores descobriram que a super-expressão de TrkB torna as células epiteliais não malignas resistentes à *anoikis* e altamente tumorigênicas; após a inoculação subcutânea em ratos, células expressando TrkB formaram tumores altamente invasivos e metastáticos.

Após a descoberta do envolvimento dos Trks na biologia do câncer, tem sido postulado que a inibição da atividade do Trk possa ser benéfica no *setting* da clínica oncológica. A maioria das estratégias tem tido como objetivo atingir o domínio Trk TK. Atualmente, não há inibidores seletivos para TrkA ou TrkB. Os primeiros inibidores a atingirem ensaios clínicos são Cephalon's CEP-751 and CEP-701(Lestaurtinib) (LI et al, 2009).

Quando o TrkC e/ou TrkA está significativamente expresso, o neuroblastoma é de melhor prognóstico, correlacionando-se com a sobrevivência do paciente. Já quando o TrkB ,ativado pelo BDNF, está fortemente expresso, encontramos-nos diante de um quadro altamente desfavorável para a sobrevivência do paciente (SCHRAMM et al, 2005).

Os receptores Trk foram, originalmente, identificados como proto-oncogenes nos carcinomas de cólon e de tireóide e, mais tarde, na leucemia mielóide. A expressão de TrkB tem sido demonstrado aumentar o potencial metastático, suprimindo a *anoikis* e tem sido implicado na patogênese de um número de tumores neuronais e não neuronais, incluindo o neuroblastoma,o meduloblastoma, o tumor de Wilms, os adenocarcinomas de pulmão, tireóide, próstata e pâncreas. O TrkB tem sido encontrado em linfomas de células B e em linfócitos transformados pelo vírus Epstein Barr. Contudo, o significado dessa expressão não tem sido determinado (LI et al, 2009).

Rodrigues FO (dissertação de mestrado 2012 UFRGS) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Serviço de Oncologia Pediátrica) encontrou níveis reduzdos de BDNF em crianças com leucemia (RODRIGUES FO, 2012).

2.5. EXCITOTOXICIDADE E CITOCINAS

2.5.1 Relações entre BDNF e citocinas

Têm surgido hipóteses de que a etiologia dos efeitos neurocomportamentais tardios da quimioterapia esteja associada à desregulação dos fatores excitotóxicos e citocinas/quimiocinas (SHIN et al, 2000).

Um processo inflamatório no SNC, que leva à morte neuronal tem sido implicado na etiologia e fisiopatologia de várias transtornos que afetam o cérebro, como a depressão maior, a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. A resposta inflamatória é mediada pela microglia, células imunes do SNC, que normalmente respondem ao dano neuronal e removem as células danificadas por fagocitose. A ativação da microglia é uma característica importante da patologia cerebral. Quando ativada, a microglia secreta mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A microglia ativada também ativa os astrócitos que, então, rompem a barreira hematoencefálica. A ativação crônica da microglia, por sua vez, pode causar dano neuronal através de liberação de citocinas, proteinases e outras substâncias (DHEEN et al, 2007).

Marcadores específicos da inflamação sistêmica, como as citocinas, tem sido identificados como importantes mediadores dos processos neurodegenerativos e neuroplásticos (DHEEN et al, 2007).

Citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos envolvidos na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos e macrófagos. As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNFa e TNFb), e fator de transformação de crescimento (TGF b) (NAOUM, 2001).

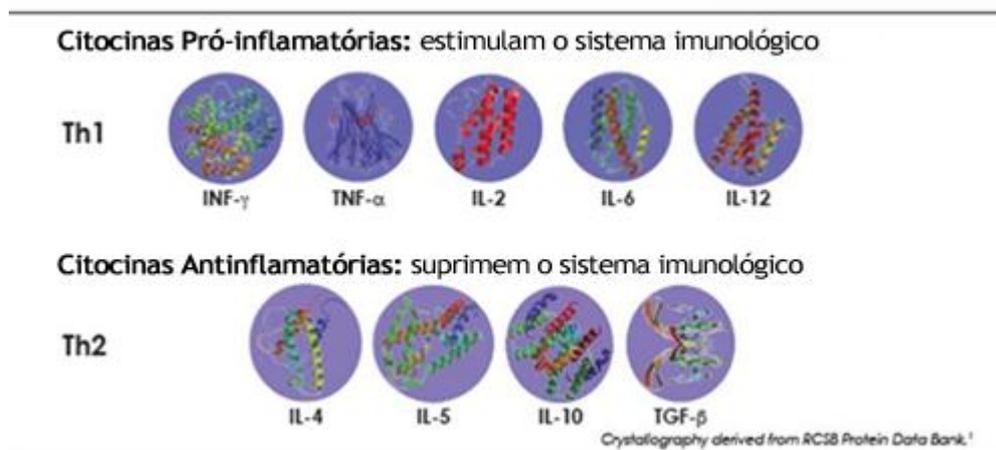


Figura 3- Citocinas

INF-gamma: interferon gamma, TNF-alfa: *tumor necrosis factor alfa*, IL: interleucina, TGF-beta: *transforming growth factor beta*.

Adaptado de Collins JJ Systemic Enzyme Support.org.

Algumas dessas proteínas, como a IL-6, tem papel crítico nos processos fisiológicos, como a função cognitiva (WRIGHT et al, 2006). Aumento das citocinas pró-inflamatórias foi associado a prejuízo do aprendizado espacial em estudos pré-clínicos (LARSON & DUNN, 2001).

A IL-6 pode ter ação pró-inflamatória potente e apresenta propriedades tanto neurodegenerativas como neuroprotetoras. Pode proteger contra insultos excitotóxicos e isquêmicos, promovendo o crescimento dos axônios e aumentando o número de sinapses (BAUNE et al, 2012).

Níveis elevados de IL-6 têm sido associados, com frequência, à Doença de Alzheimer e também ao risco dessa doença, mas não em todos os estudos (COMBARROS et al, 2009).

A redução dos níveis de BDNF e o aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 tem sido implicados na fisiopatologia da depressão, e essa tem sido associada à disfunção cognitiva, pelo menos em relação à memória de longa duração (JEHN et al, 2006).

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, tem uma ação imunossupressora específica e um importante papel na regulação imune, estando, frequentemente, *up-regulated* em vários tipos de câncer. O papel biológico da IL-10 no câncer é muito complexo. A presença dessa citocina em

metástases avançadas, a correlação positiva entre a IL-10 e a progressão da doença indica um papel crítico no microambiente tumoral (SATO et al, 2011).

Excitotoxicidade é uma injúria neuronal causada por liberação excessiva de neurotransmissores glutamato e aspartato, causando dano às células nervosas e gliais, e ocorre em diversas doenças neurológicas (LESSMANN et al, 2003).

O aumento das neurotrofinas tem a função prioritária de proteger os neurônios da excitotoxicidade (LESSMANN et al, 2003).

A neuroproteção pelo BDNF contra a morte celular apoptótica glutamato-induzida parece ser mediada pela via fosfatidilinositol (ALMEIDA et al, 2005).

Esse e outros estudos trazem evidências de que o BDNF pode ter propriedades neuroprotoras e anti-apoptóticas, podendo amenizar as ações das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF alfa). A redução do BDNF pode contribuir para a vulnerabilidade ao impacto deletério das citocinas (KAUER-SANT'ANNA et al, 2009).

Tem sido sugerido que um balanço entre níveis de citocinas e neurotrofinas esteja associado com apoptose (morte celular programada) (NAGATSU et al, 2000).

BDNF e citocinas parecem cooperar na sinalização intracelular (BROUWERS, 2005).

A habilidade da IL-6 em apoiar a sobrevivência dos neurônios sensoriais embrionários *in vitro* depende da presença do BDNF e a indução do BDNF em neurônios sensoriais adultos lesionados depende da presença de IL-6 (MURPHY et al, 2000).

Sob condições inflamatórias, a presença do BDNF pode limitar a injúria imunológica no cérebro (BRIETZKE & KAPCZINSKI, 2008).

No caso da doença bipolar, o aumento das citocinas pró-inflamatórias pode ser parte da doença ou representar uma resposta adaptativa a um insulto (ie, o início da doença). A resposta inflamatória pode ser efetiva no início da doença, como indicado pelo aumento da IL-10. A redução do BDNF pode contribuir para a vulnerabilidade ao impacto deletério das citocinas (KAUER-SANT'ANNA et al, 2009).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os avanços no tratamento têm levado a um número crescente de sobreviventes de LLA, porém sequelas neurocognitivas tem sido relatadas numa proporção significativa desses, mesmo quando o tratamento não inclui radioterapia.

Identificamos uma carência de estudos relacionados ao efeito do tratamento com metotrexate intratecal nos níveis de BDNF, havendo uma necessidade de pesquisas que possam identificar tratamentos e/ou medidas preventivas para esse problema.

Melhor entendimento da fisiopatologia da neurotoxicidade relacionada ao tratamento da LLA poderia levar a estratégias para fazer a triagem, prevenir a ocorrência e buscar soluções para o manejo desses efeitos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF: *brain derived neurotrophic factor*), biomarcadores inflamatórios (IL-6 e IL-10) e de estresse oxidativo (TBARS e conteúdo de proteína carbonil) em pacientes pediátricos com LLA submetidos à quimioterapia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os níveis séricos de BDNF, biomarcadores inflamatórios (IL-6 e IL-10) e de estresse oxidativo (TBARS e conteúdo de proteína carbonil) e citocinas séricas no diagnóstico, antes e 72 horas após o tratamento com metotrexate intratecal, após a remissão completa e na fase de altas doses de MTX (protocolo M), comparando-os com controles.

Investigar a associação entre a aplicação do metotrexate intratecal e os níveis séricos de BDNF (até 1 hora antes e 72 horas após a aplicação).

5 HIPÓTESE DE TRABALHO

- Os níveis de BDNF no sangue periférico estariam reduzidos após a aplicação intratecal de metotrexate.
- A redução de BDNF poderia estar relacionada às alterações cognitivas descritas em pacientes tratados para leucemia na infância, pois o BDNF é considerado uma molécula essencial no mecanismo de formação de potenciação de longa duração (LTP= *long term potentiation*), mecanismo essencial na aprendizagem e memória.

6 MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO

Estudo de caso - controle aninhado num estudo de coorte.

6.2 AMOSTRA

Sessenta e dois espécimes de sangue colhidos de 8 crianças com o diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda comum, de dois a 13 anos de idade (4 do sexo masculino e 4 do sexo feminino) que internaram no Hospital de Clínicas de Porto Alegre , em tratamento com esquema baseado no protocolo BFM (*Berlin-Frankfurt-Münster*), que inclui a aplicação de quimioterapia intratecal com metotrexate. A inclusão dos pacientes foi consecutiva, de setembro de 2010 a setembro de 2011.

Os espécimes de sangue dos controles (crianças normais) foram disponibilizados de um banco de amostras coletadas para outro estudo, e autorizadas para uso em pesquisas.

6.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

- Considerando a hipótese nula: os níveis séricos de BDNF antes da aplicação intratecal de metotrexate será semelhante aos níveis séricos de BDNF 72 horas após a aplicação, e a hipótese alternativa: os níveis séricos de BDNF antes do metotrexate serão diferentes dos níveis séricos 72 horas após o metotrexate.

- Considerando um tamanho de efeito de 0,6, um poder de 80%, um nível de significância de 5%, é necessário obter 24 pares de amostras de soro.
- Considerando as perdas possíveis o n calculado é de 30 pares de amostras de soro.
- O cálculo foi realizado no WINPEPI v.11.1.

6.4 FERRAMENTAS DE PESQUISA

- a) Dosagens de BDNF, TBARS, conteúdo de proteína carbonil, interleucinas IL6 e IL 10 no sangue periférico (soro) imediatamente antes e 72 horas após aplicação da quimioterapia intratecal com MTX.
- b) Aplicação de testes: WISC III (*Wechsler Intelligence Scale*) apropriado para a faixa etária de 6 anos e 11 meses a 16 anos e 11 meses, e WPPSI-R (*Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-Revised*) ou Escala de Inteligência de Wechsler para a Idade Pré-Escolar e Primária - Edição Revista, desenvolvida para crianças de 2 anos e 6 meses a 7 anos e 3 meses (CRUZ, 2005).

O WISC-III é formado por diversos subtestes que avaliam diferentes aspectos da inteligência, sendo o desempenho das crianças nesses subtestes resumidos em três medidas que oferecem estimativas da capacidade intelectual das mesmas, a saber: QIs Verbal, Execução e Total. O teste é composto por 13 subtestes organizados em dois grupos: Verbais e Perceptivos-motores ou de Execução, que são aplicados nas crianças em ordem alternadas, ou seja, um subteste de Execução e depois um subteste verbal e vice-versa. Os Subtestes Verbais são compostos pelos itens: Informação, Semelhanças, Aritmética, Vocabulário, Compreensão e Dígitos, enquanto que os subtestes de Execução são formados pelos itens: Completar Figuras, Código, Arranjo de Figuras, Cubos, Armar Objetos, Procurar Símbolos e Labirintos (CRUZ, 2005).

A WPPSI-R é constituída por seis subtestes de realização (perceptivo-motores) e por seis subtestes verbais. Os subtestes de realização são: Composição de Objetos, Figuras Geométricas, Quadrados, Labirintos, Completamento de Gravuras, Tabuleiro dos Animais (subteste opcional). Os subtestes verbais são: Informação, Compreensão, Aritmética, Vocabulário, Semelhanças Frases Memorizadas (subteste opcional) (CRUZ, 2005).

Os resultados obtidos nos subtestes permitem calcular três escalas compósitas: QI Verbal, QI de Realização, QI da Escala Completa (CRUZ, 2005).

Para as dosagens bioquímicas, quatro mililitros de sangue foram retirados de cada indivíduo por punção venosa ou aspiração de cateter em um tubo sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado imediatamente a 3000xg por 5 minutos e o soro mantido congelado a -80 °C até a avaliação.

6.4.1 Técnica da dosagem do BDNF

Os níveis séricos do BDNF foram medidos por meio de um ensaio ELISA, usando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon-EUA); as placas (96 poços cada) foram revestidas por 24 h com as amostras em uma diluição 1:2 em diluentes adequados, sendo então lavadas quatro vezes com tampão, adição de anticorpos monoclonais de coelho anti-BDNF (diluído 1:1000 com diluente de amostra) e incubado por 3 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem, foi realizada uma segunda incubação com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (diluído 1:1000) por 1 hora em temperatura ambiente. Após a adição da enzima estreptavidina, substrato e solução para término da reação, foi determinada a concentração de BDNF (absorbância medida em 450 nm). A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica (DO) e a concentração de BDNF. A sensibilidade do ensaio para BDNF foi de 7,8 pg/mL (7,8-500 pg/mL). Os resultados são expressos em pg/mL.

6.4.2 Técnica da dosagem das TBARS

Os níveis de peroxidação lipídica foram dosados pelo método de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) usando o kit de ensaio TBARS (*Cayman Chemical Company, Ann Arbor*), de acordo com as instruções do fabricante. Nesse método, a quantificação dos produtos de peroxidação lipídica é realizada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que é a análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído e outros aldeídos de baixo peso molecular) que a reação com o 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) forma bases Schiff. Esses complexos exibem coloração e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm. Os resultados são expressos em uM de MDA (malondialdeído).

6.4.3 Técnica de dosagem do Conteúdo de proteína carbonil

O dano oxidativo às proteínas foi analisado pela determinação dos grupos carbonil (método *PCC-carbonyl content in proteins*) ou conteúdo de proteína, como descrito previamente por Levine e colegas (LEVINE et al, 1990). Nessa, as proteínas são precipitadas pela adição de TCA 20%, resolubilizado em dinitrophenylhidrazine (DNPH) e a absorvância é lida num espectrofotômetro a 370 nm. Os valores são expressos em nmol/mg de proteína.

6.4.4 Técnica de Dosagem das Citocinas

Os níveis de citocinas nas amostras de soro foram determinados pelo CBA *Human Enhanced Sensitivity Flex Set System* (BD) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras de soro e uma curva padrão de zero (controle negativo) a 200 000 fg/mL de IL-6, IL-10 e TNF-alfa foram cobertas pcom o *Capture Beads* of de interesse (IL-6, IL-10, TNF-a) por 2 horas. Após, nós adicionamos *Human Detection Reagent (Part A)* e misturamos bem para cada ensaio e cobrimos por 2 horas a temperatura ambiente. Após a lavagem, o *Enhanced Sensitivity Detection Reagent (Part B)* foi adicionado e as amostras foram incubadas por 1 hora. Uma lavagem final foi realizada e as amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACSCalibur. A concentração final das citocinas foi calculada usando o programa Excel para Macintosh. Os valores são expressos em fg/mL.

6.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

- idade do paciente no diagnóstico de LLA;
- concentrações séricas de BDNF, TBARS, conteúdo de proteína carbonil e citocinas;
- resultados das avaliações cognitivas com WISC e WIPPSI-R.

6.6 LOGÍSTICA

Os pacientes foram recrutados após diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, de forma consecutiva, de setembro de 2010 a setembro de 2011. Foi realizada uma entrevista com os pais para esclarecimentos sobre a pesquisa e assinatura do termo de consentimento.

Amostras de sangue foram coletadas antes da aplicação intratecal e 72 horas após cada

aplicação. As coletas de dados e de sangue para exames foram realizadas na unidade de internação do 3º Leste (Oncologia pediátrica) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Centro de Cirurgia Ambulatorial (CCA) ou na unidade de coleta de exames da zona 14 do HCPA.

Cada paciente é submetido a 8 aplicações intratecais ao longo do seu tratamento, porém nesses estudo, não foi possível acompanhar todos os pacientes até o final do tratamento. A coleta foi interrompida quando foram obtidos 31 pares ou 62 amostras de sangue.

A aplicação do MTX IT era realizada no CCA do HCPA, sob anestesia geral.

A coleta de sangue, até 2 horas antes da aplicação do MTX IT, era realizada pela enfermeira, através do cateter central, pelo coletador, sempre simultaneamente aos exames de rotina, ou pelo anestesista, evitando a coleta dolorosa.

A coleta após a aplicação do MTX IT, 72 horas após, era realizada pela enfermeira da unidade de internação, através do cateter central (se o paciente estivesse internado), durante a coleta de exames de rotina, ou pelo coletador da zona 14, durante a coleta de exames de rotina (no caso de já ter tido alta hospitalar).

As amostras de sangue eram encaminhadas, imediatamente após a coleta, para o laboratório de Psiquiatria Molecular, onde eram preparadas e congeladas para que posteriormente fossem realizadas as dosagens. As dosagens séricas foram todas realizadas com o mesmo kit e de forma simultânea, tanto para os pacientes como para os controles, cujas amostras já estavam congeladas. O pareamento dos controles foi realizado após todas as coletas dos casos. Os espécimes de sangue de crianças normais (controles) foram extraídos de um banco de amostras autorizado para pesquisas.

A contagem de plaquetas foi avaliada em conjunto com as dosagens do BDNF.

Os testes cognitivos (WISC e WIPPSI) foram realizados logo após o diagnóstico e 6 meses após o mesmo por psicóloga ligada ao Serviço de Psicologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versão 18.0. Os dados são apresentados como média ou mediana e desvio-padrão. Comparações entre os grupos foram feitas usando o teste t de Student, Mann Whitney ou Wilcoxon.

Foi considerado um poder estatístico de 80% e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Protocolo do presente estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pela Comissão Científica e de Pesquisa em Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 09-530).

Foi solicitado aos pais ou responsáveis pelos pacientes, concordância da participação no estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

As amostras dos controles foram extraídas de um banco de amostras coletado para outra pesquisa, porém com autorização dos pais dos pacientes para uso das mesmas em estudos posteriores.

7 RESULTADOS

As características da amostra encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Características da amostra

Características	Pacientes	Controles
Idade	2–13 anos	4–16 anos
Sexo		
Masculino	4 (50%)	19 (47,5 %)
Feminino	4 (50%)	19 (52,5 %)

OBS: 100% dos pacientes tiveram o diagnóstico de LLA comum da infância com SNC negativo. Todos iniciaram o tratamento com protocolo baseado no BFM 2002.

No diagnóstico, os níveis séricos de BDNF encontrados foram mais baixos nos pacientes do que nos controles ($p < 0,001$), enquanto os níveis de IL-6 e IL-10 foram mais elevados nos pacientes do que nos controles ($p < 0,05$). No diagnóstico, os níveis de TBARS não tiveram diferença significativa entre os pacientes e controles (**Figura 2,3,4 e Tabela 2**).

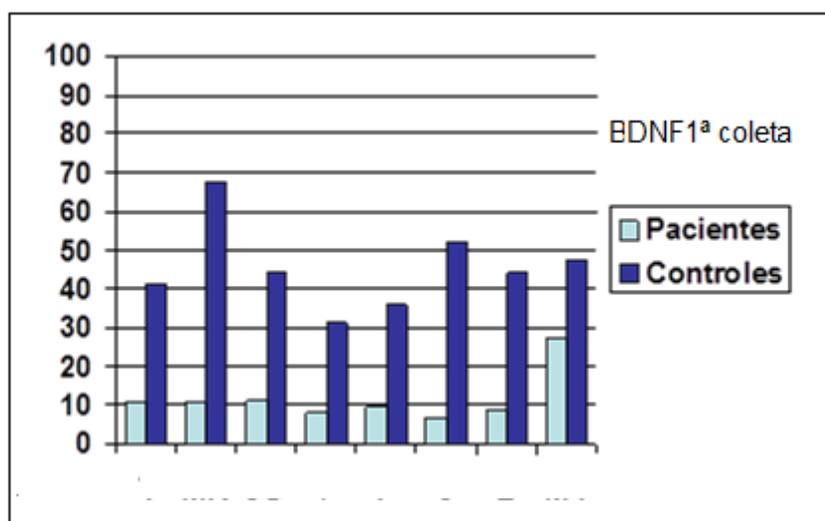
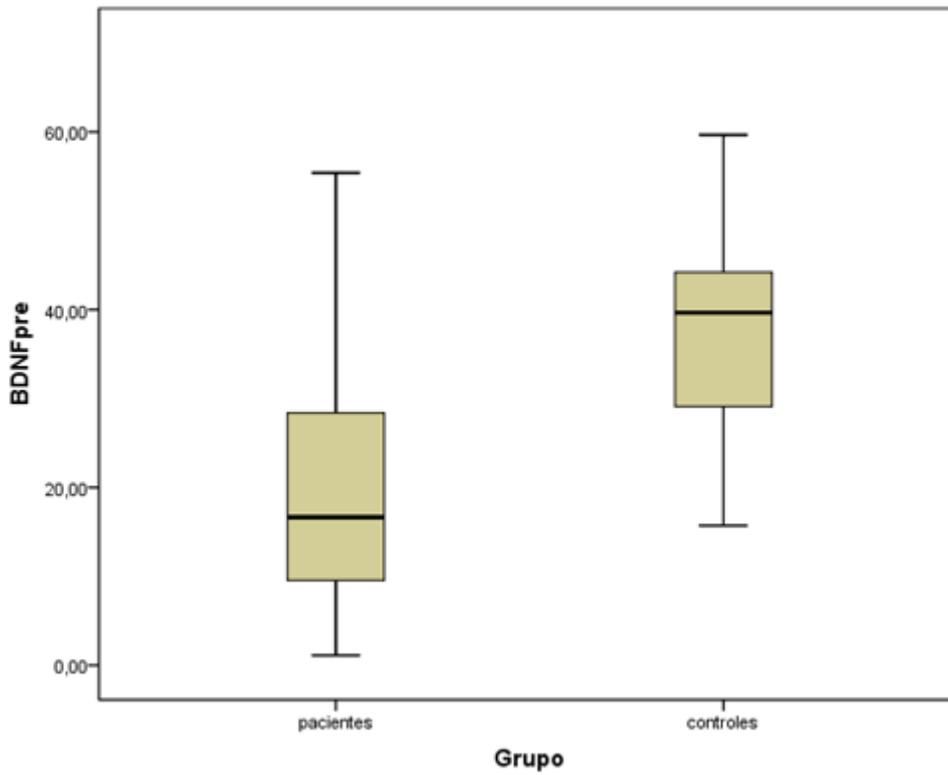
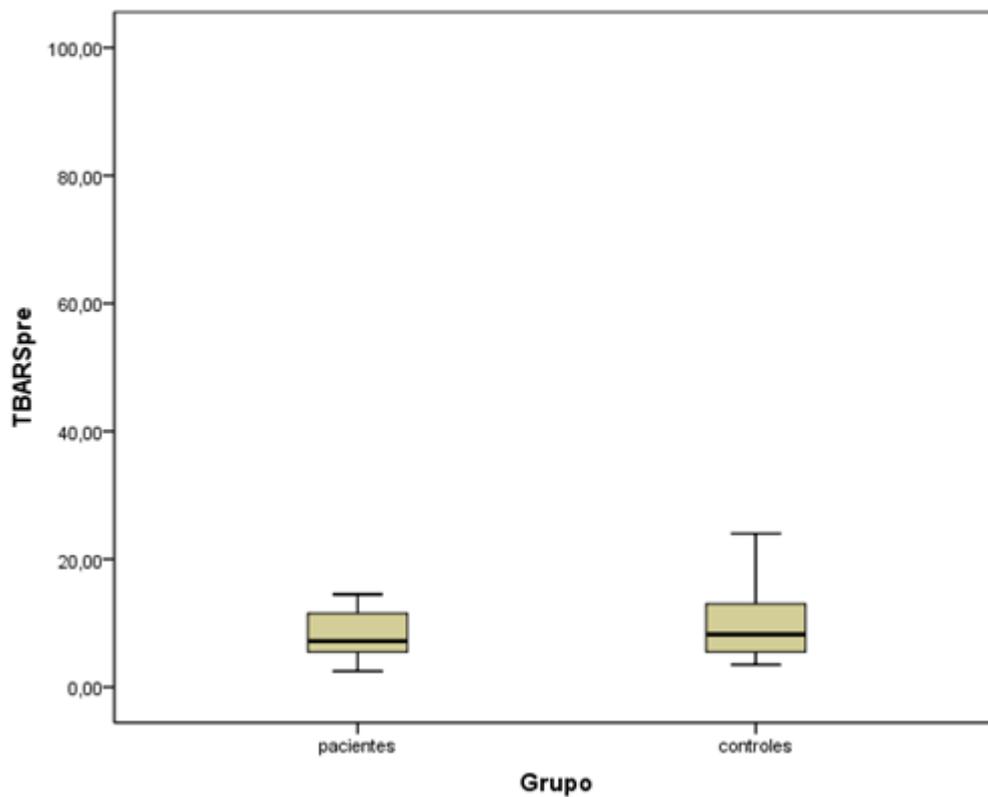


Figura 4 – BDNF Sérico (pg/ml): pacientes (nível inicial) e controles pareados por sexo e idade



BDNF- brain derived neurotrophic factor (pg/ml)

Figura 5 – BDNF inicial dos pacientes e BDNF dos controles



TBARS- thiobarbituric acid reactive substances(uM de MDA)

Figura 6 – TBARS valor inicial dos pacientes e TBARS dos controles

Tabela 2 – Comparação das dosagens séricas de biomarcadores em pacientes ao diagnóstico de LLA e em controles

Variáveis	Pacientes	Controles	p
BDNF	n= 32	n=40	
	média=18,94±12,04	média=37,49±11,84	<0,001
	IC(95%)=16,47–21,40	IC(95%)=33,70–41,28	
	mediana=13,69	mediana=39,67	
TBARS	n=32	n=40	
	média=11,36±9,79	média=9,77±5,64	0,955
	IC(95%)=9,37–13,36	IC(95%)=7,97–11,58	
	mediana=8,50	mediana=8,25	
IL-6	n= 31	n=36	
	745,08 (P50)	355,97 (P50)	0,002
	IC(95%)=138,43–22856,10	IC(95%) =121,82–1750,99	
IL-10	n= 29	n=34	
	588,69 (P50)	374,96 (P50)	0,032
	IC(95%)=104,63–11546,54	IC(95%)=97,94–1226,50	
Carbonil	n=32	n=39	
	0,144 (P50)	0,154 (P50)	0,405
	IC (95%)=0,062–0,284	IC (95%)=0,052–0,288	

BDNF - *brain derived neurotrophic fator*; TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*; IL-10 - interleucina 10; IL-6 - interleucina -6, IC- interval de confiança, P50- percentil 50.

Nesse estudo, os níveis séricos de BDNF e TBARS nos pacientes, antes e 72 horas após cada aplicação intratecal de MTX não mostraram alterações significativas, como mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Dosagens séricas de BDNF e de TBARS antes e após MTX IT (n=31)

Variáveis	mediana	IC (95%)	p
BDNF			
antes	16,64	9,41-28,49	
após	13,11	8,31-29,89	0,652
TBARS			
antes	7,19	5,50-12,00	
após	9,00	6,71-12,50	0,992

BDNF - *brain derived neurotrophic fator*; TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*. MTX IT- metotrexate intratecal. IC- intervalo de confiança

Comparando os pacientes, antes e após a remissão completa, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de BDNF, TBARS, IL-6 e IL-10, mas o conteúdo de proteína carbonil foi mais baixo após a remissão completa do que no diagnóstico, como na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Comparação das dosagens séricas dos biomarcadores em pacientes antes e após a remissão completa da doença (n=31)

Variáveis	Basal		Após RC		p
	mediana	IC (95%)	mediana	IC (95%)	
BDNF	9,62	7,69–15,12	23,59	8,13–31	0,345
TBARS	13,75	7,50–23,01	9,50	5,50–11,00	0,600
IL-6	4144,33	588,33–1387,50	2107,83	615,19–2765,97	0,600
IL-10	998,11	340,22–7106,06	711,35	386,18–861,11	0,715
Carbonil	0,186	0,147–0,218	0,144	0,101–0,156	0,046

Wilcoxon Test

BDNF - *brain derived neurotrophic fator*; TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*; IL-10 - interleucina 10; IL-6 - interleucina -6. RC-remissão completa, IC- intervalo de confiança

Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis séricos dos controles e dos pacientes quando esses estavam no primeiro **protocolo M** do protocolo baseado no BFM 2002 (fase de doses elevadas de metotrexate), exceto para IL-6 (interleucina pró-inflamatória) que permanecia mais elevada nos pacientes (**Tabela 5**).

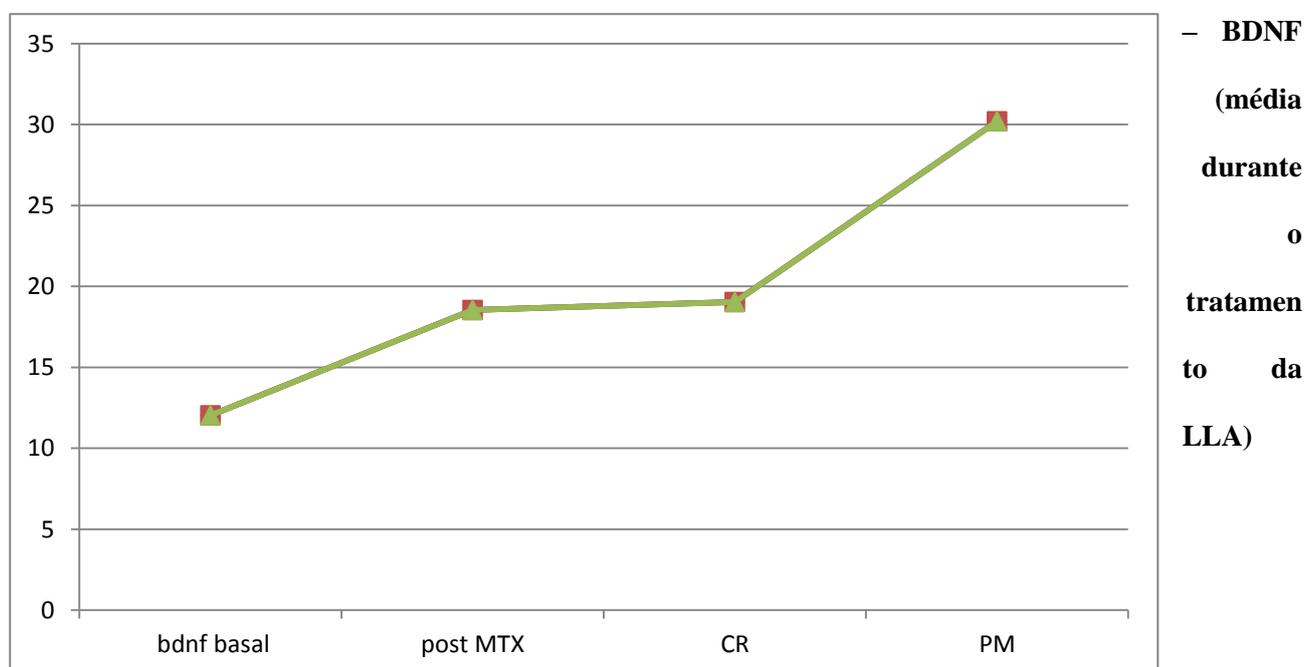
Tabela 5 – Dosagens séricas dos marcadores em pacientes no primeiro Protocolo M e dos controles

Variáveis	1º Protocolo M mediana (IC 95%)	Controles mediana (IC 95%)	P
BDNF	30,19±7,10*	37,49 ±11,84*	0,151
TBARS	7,50 (4,37–17,37)	8,25 (5,50–13,25)	0,683
IL-6	1426,46 (373,99–2287,34)	355,97 (239,56–665,60)	0,034
IL-10	546,55 (331,51–1372,31)	374,96 (197,26–555,46)	0,125
Carbonil	0,15 (0,094–0,177)	0,171 (0,122–0,171)	0,463

* Desvio Padrão

Protocolo M - fase de consolidação da remissão com altas doses de metotrexate; BDNF - *brain derived neurotrophic factor*; TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*; IL-10 - interleucina 10; IL-6 - interleucina -6, IC- intervalo de confiança

A **Figura 7** mostra que a média dos valores do BDNF aumentou durante o tratamento.

**Figura 7 – BDNF (média durante o tratamento da LLA)**

BDNF-*brain derived neurotrophic factor*, MTX methotrexate, CR *complete remission*, PM-protocolo M

7.1 RESULTADOS DOS TESTES COGNITIVOS (WISC III E WIPPSI-R) – ESCALAS DE INTELIGÊNCIA

Os subtestes que avaliam a memória (informação e dígitos) tiveram aumento (melhor resultado) na segunda aplicação (exceto uma paciente).

Os resultados apresentaram discrepância negativa (pior resultado) no subteste Compreensão (em relação aos outros subtestes da escala), para todos os pacientes, na segunda aplicação.

Na comparação entre as aplicações observou-se que os QITs (QIs Totais) mantiveram-se na média e acima da média, com diminuição nos resultados das segundas aplicações, porém preservando a classificação. Os Resultados dos testes cognitivos estão apresentados nas figuras abaixo.

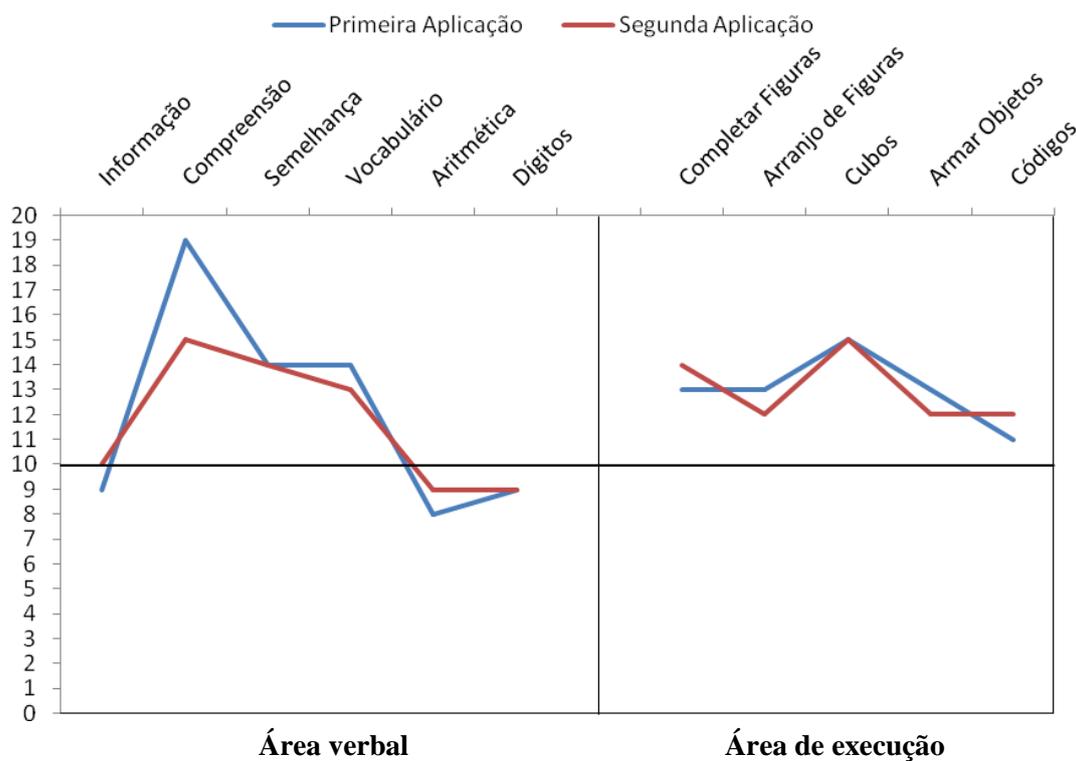


Figura 8 – Desempenho nos testes cognitivos do paciente 1

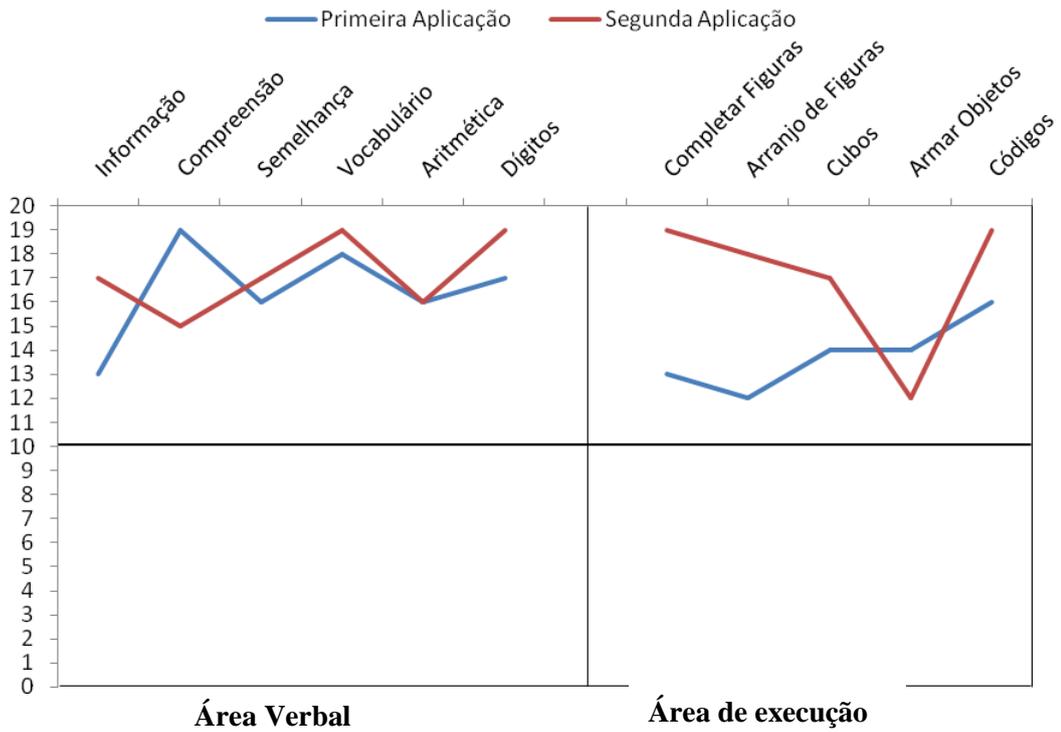


Figura 9 – Desempenho nos testes cognitivos do paciente 2

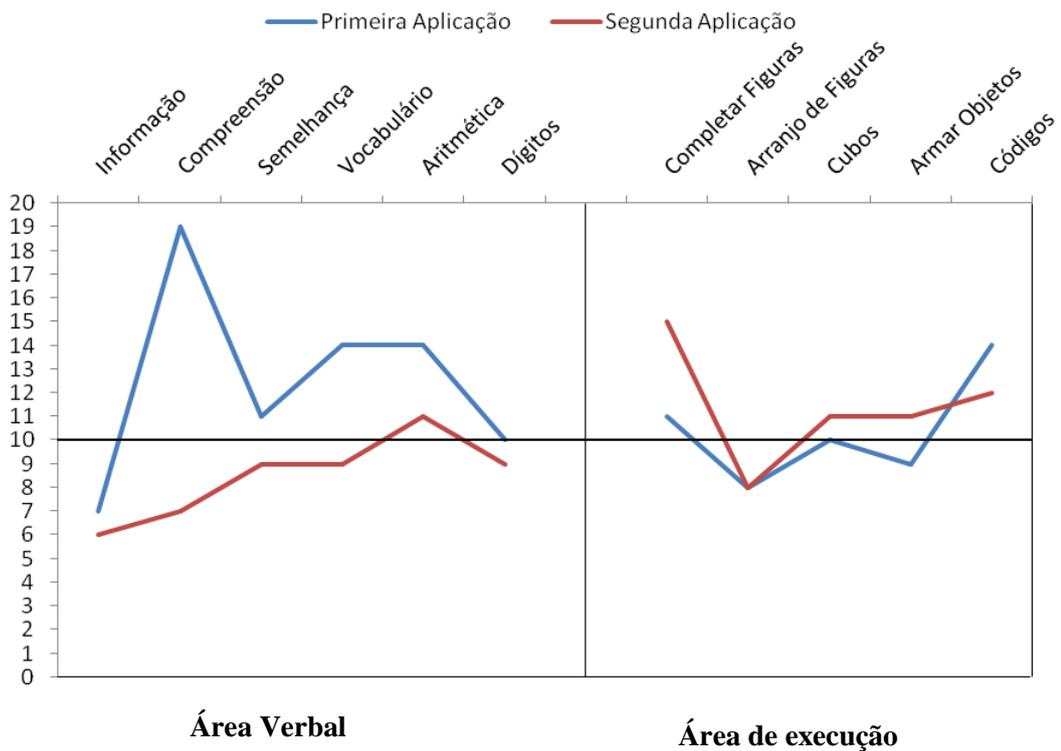


Figura 10 – Desempenho nos testes cognitivos do paciente 3

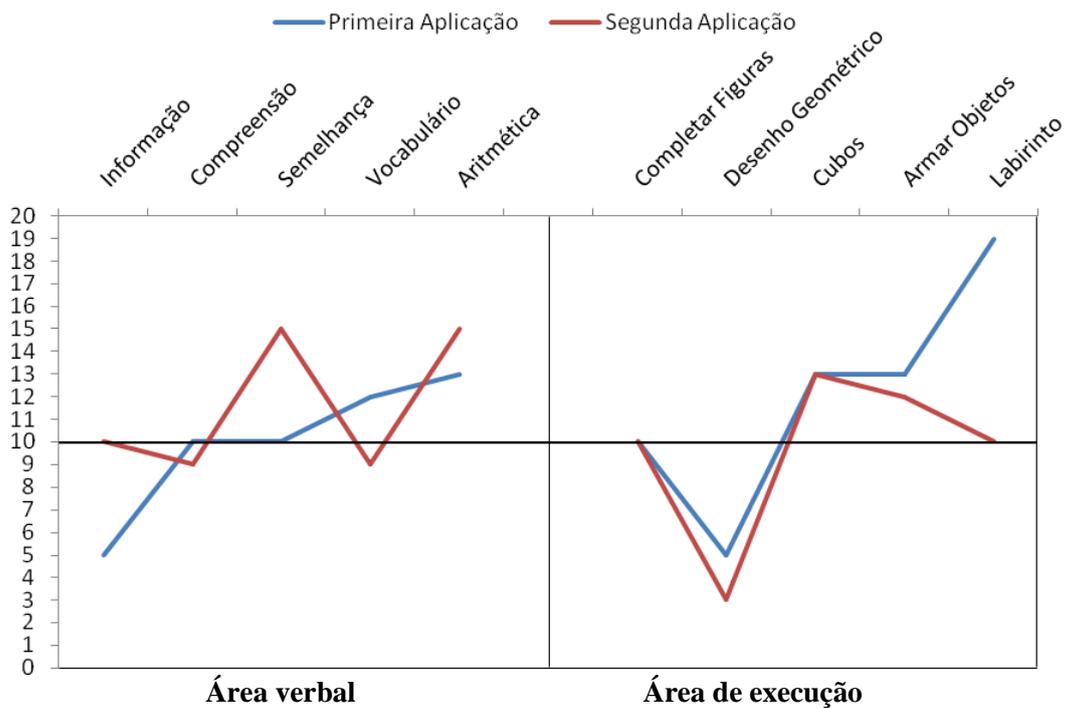


Figura 11 – Desempenho nos testes cognitivos do paciente 4

Os subtestes que avaliam a memória (informação e dígitos) tiveram aumento (melhor resultado) na segunda aplicação (exceto uma paciente).

Os resultados apresentaram discrepância negativa (pior resultado) no subteste Compreensão (em relação aos outros subtestes da escala), para todos os pacientes, na segunda aplicação.

Na comparação entre as aplicações observou-se que os QITs (QIs Totais) mantiveram-se na média e acima da média, com diminuição nos resultados das segundas aplicações, porém preservando a classificação.

8 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo examinando os níveis séricos de BDNF, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em diferentes estágios do tratamento da LLA em crianças.

Pesquisamos os níveis de uma neurotrofina (BDNF), marcadores de estresse oxidativo (conteúdo de proteína carbonil para avaliar dano às proteínas e TBARS para avaliar dano aos lipídios), citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10) em crianças tratando LLA B e em controles (crianças saudáveis).

Nesse estudo, encontramos que os pacientes com LLA, ao diagnóstico, apresentavam níveis séricos de BDNF mais baixos em relação aos controles ($p < 0,001$) e que também apresentavam níveis séricos de IL-6 e IL-10 mais elevados do que os controles ($p < 0,05$). Então, essas crianças estariam em risco de déficits cognitivos, ao diagnóstico.

Por outro lado, quando comparamos os níveis séricos BDNF e TBARS nos pacientes, antes e 72 horas após cada aplicação de MTX IT, não encontramos diferenças significativas.

Além desses achados, comparando os níveis séricos em pacientes, antes e após a remissão completa, não encontramos diferenças significativas nos níveis de BDNF, TBARS, IL-6 e IL-10, porém, os níveis séricos de conteúdo de proteína carbonil (marcador de estresse oxidativo) estavam mais baixos do que na primeira dosagem.

Quando os pacientes se encontravam na fase de altas doses de MTX (protocolo M), não foram encontradas diferenças significativas nas dosagens séricas entre pacientes e controles, exceto para IL-6, que persistia mais elevada nos pacientes do que nos controles.

Os resultados dos testes psicológicos (WISC III), aplicados ao diagnóstico e seis meses após, demonstraram que os escores de QI, que representam uma habilidade cognitiva geral, permaneceram na média ou acima da mesma. Os subtestes de memória mostraram uma melhora, exceto para um paciente. Contudo, os subtestes de compreensão mostraram uma piora nos resultados.

Avaliando os achados de nossa pesquisa, podemos sugerir que existem evidências de que a LLA seja associada com baixos níveis de BDNF, já que os pacientes com LLA apresentam diferenças significativas em relação aos controles. Poderíamos pensar que os níveis periféricos de BDNF estariam reduzidos para atender uma demanda imposta pela doença.

De modo interessante, os dados evidenciam que essas diferenças podem desaparecer quando a doença é controlada, ao mesmo tempo em que o estresse oxidativo diminui, sugerindo que o tratamento seja efetivo em reduzir o estresse oxidativo e aumentar os níveis de BDNF.

Por outro lado, a hipótese inicial de que o MTX IT diminuiria os níveis de BDNF não se confirmou em nosso estudo. Esse fato pode significar que a redução do BDNF não é o mecanismo pelo qual o MTX produz déficit cognitivo, ou que o intervalo de 72 horas entre as dosagens foi pequeno para evidenciar diferenças que poderiam aparecer em outro momento.

É sabido que o BDNF se relaciona à proliferação celular; curiosamente, nesse estudo, encontramos níveis séricos reduzidos de BDNF ao diagnóstico de LLA.

Embora não sendo pesquisas em LLA, encontramos pesquisas relacionando níveis de BDNF antes e após o tratamento.

Gonul et al. (2005) encontraram níveis basais de BDNF significativamente mais baixos em pacientes deprimidos comparado aos controles; demonstraram ainda que o tratamento com 8 semanas de antidepressivos aumentou significativamente os níveis séricos de BDNF, que então eram semelhantes aos controles. Pandey et al. (2010) encontraram resultados semelhantes quando estudou doença bipolar pediátrica em 19 crianças. Os níveis de mRNA de BDNF nos linfócitos, eram significativamente, reduzidos em relação aos controles e se elevaram após 8 semanas de tratamento, tornando-se semelhantes aos dos controles.

Por outro lado, nós encontramos a persistência de níveis mais elevados de IL-6 nos pacientes, mesmo nas fases mais avançadas do tratamento. Interessantemente, Patanella et al. (2010) encontraram uma correlação entre baixos níveis de BDNF e alta produção de IL-6 pelos

células mononucleares periféricas e os desempenhos mais baixos em tarefas cognitivas dos pacientes com esclerose múltipla, sugerindo um possível papel desses fatores nos déficits cognitivos da esclerose múltipla. De forma semelhante, Kauer- Sant'Anna et al. (2009), estudando doença bipolar, encontrou que os níveis de interleucinas estavam aumentados nos estágios iniciais da doença comparados aos controles, e que persistiam elevados em estágios mais avançados, enquanto que o mesmo não ocorria com os níveis de BDNF e IL-10.

Protas et al. (2010) investigaram os níveis de citocinas no líquido durante o tratamento de LLA. O exame de 12 crianças com LLA (seis meninos e 6 meninas) evidenciou aumentos significativos de IL-6 e MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) após a indução e aumento significativo de IL-6, TNF-alfa (tumor necrosis factor) e MCP-1 durante a fase de consolidação, comparados com os valores ao diagnóstico. Não havia diferenças significativas nas concentrações líquóricas de IL-6, TNF-alfa e MCP-1 após o tratamento. Concluíram que o tratamento da LLA pode causar inflamação subclínica e neurotoxicidade. A elevação das citocinas pode representar uma resposta adaptativa ao estresse, nesse caso a doença LLA, como Kauer Sant'Anna conclui em seu estudo em pacientes psiquiátricos.

Nós pensávamos que a quimioterapia intratecal poderia reduzir os níveis de BDNF e que esse fato estaria relacionado à toxicidade tardia do tratamento para leucemia, que inclui os déficits cognitivos. Porém, nessa amostra, os níveis antes e após o MTX não se alteraram de forma significativa.

Opostamente aos nossos achados, Dorfman (2012) concluiu que o MTX IV ou IT pode causar declínio mensurável no aprendizado e memória 24 a 72 horas após a aplicação em crianças com leucemia. Ela estudou 19 crianças e jovens (11 do sexo masculino e 8 do sexo feminino) antes e após a medicação e encontrou redução significativa nos escores do Teste de Aprendizado Auditivo-verbal de Rey dentro de 3 dias após o tratamento. A autora assinalou que uma intervenção acadêmica durante a fase do tratamento poderia auxiliar a reduzir os déficits de memória. Os

achados indicam que os pacientes pediátricos sofrem declínios significativos de memória e outras funções cognitivas após o tratamento com MTX.

Os resultados revelam que as crianças mais jovens podem estar em risco aumentado. Gagnon (2012) comentou, após a apresentação de Dorfman (2012), que não se sabe de esses efeitos seriam complicações duradouras e que seria interessante uma reavaliação seis meses após o término do tratamento. Em nosso estudo, avaliamos as funções cognitivas seis meses após o diagnóstico, com os resultados já citados.

De forma semelhante a nós, Battisti et al. (2008) encontraram persistência do estresse oxidativo na LLA. Dosaram TBARS e carbonilação de proteínas séricas que se encontravam mais elevados no pacientes com LLA no que nos controles normais. Adicionalmente, esses autores perceberam que, após o tratamento, os níveis de antioxidantes retornaram ao normal, indicando a regressão da doença como resultado do tratamento. Eles concluíram que o tratamento é, de fato, efetivo para reduzir o estresse oxidativo, pois não havia diferenças significativas na catalase e superóxido dismutase (antioxidantes enzimáticos eficazes) entre os pacientes fora do tratamento e os controles. No estudo de Battisti et al. (2008), há evidências para níveis elevados de dano oxidativo e níveis reduzidos de antioxidantes em pacientes com LLA. Os pacientes fora do tratamento mostraram níveis de antioxidantes normais, indicando regressão da doença com resultado do tratamento.

Outros autores também encontraram associação entre o estresse oxidativo e a LLA. Kennedy et al. (2005) concluíram que, entre crianças com LLA, os níveis de antioxidantes e estresse oxidativo parecem estar associados com a duração e complicações do tratamento. Um estudo no Arizona investigou o estresse oxidativo como um mecanismo possível de dano ao sistema nervoso central induzido por quimioterapia (MIKETOVA et al, 2005).

Por outro lado, o trabalho de Mazor et al. (2005) concluiu que o baixo *status* antioxidante no plasma de crianças com LLA provavelmente está associado ao aumento das espécies reativas de oxigênio; porém, os autores sugerem que o estresse oxidativo pode levar à morte celular ou maior

sensibilidade das células tumorais ao tratamento, com melhor prognóstico para pacientes pediátricos com LLA.

O estudo de El-Sabagh et al. (2011) também evidencia aumento do dano oxidativo e redução no sistema antioxidante em pacientes com LLA. Al Tombary et al. (2011), no seu estudo com 50 crianças recém –diagnosticadas com LLA mostraram aumento do estresse oxidativo ao diagnóstico e após o tratamento com quimioterapia. Sarmiento-Ribeiro et al. (2012) sugeriram o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da leucemia linfoblástica aguda e crônica e da recaída leucêmica.

Nesse estudo, nós nos propusemos a investigar os mecanismos dos efeitos neurocognitivos da LLA. Nós pensávamos que o MTX IT reduzisse o BDNF e que os níveis reduzidos dessa neurotrofina pudessem estar associados aos déficits cognitivos. Porém, nesse trabalho, essa hipótese não foi confirmada.

Por outro lado, nosso estudo teve outros achados, sendo um deles as alterações nos marcadores de estresse oxidativo. Esse último pode estar associado a alterações da função cognitiva. Caron et al. (2009) estudaram 88 crianças com diagnóstico recente de LLA e os resultados mostraram uma associação entre o aumento do estresse oxidativo após a indução e a consolidação, e redução da função executiva 2 anos mais tarde. Os resultados do estudo de Protas et al. (2010) indicam que a neurotoxicidade do tratamento da LLA pode estar relacionado ao estresse oxidativo. Gama et al. (2008) sugeriram que os níveis elevados de estresse oxidativo nos neurônios produz efeitos deletérios nos sinais de transdução, na plasticidade estrutural e na resiliência celular, especialmente por induzir peroxidação lipídica nas membranas, proteínas e genes. Stenzel SL et al. (2010) sugeriram que os sinais e sintomas dos problemas neurocomportamentais ocorrem precocemente no curso da quimioterapia, e que os aumentos dos biomarcadores de estresse oxidativo no líquido durante a indução e a consolidação podem ajudar a prever certos problemas neurocomportamentais futuros.

Nós também encontramos alterações nos níveis séricos de citocinas. Pensa-se que essas sejam importantes mediadores nos processos fisiológicos e fisiopatológicos que afetam o SNC; dados indicam que as citocinas, como a IL-6, podem ter um papel patogênico direto nas doenças inflamatórias, infecciosas e neurodegenerativas do SNC (CAMPBELL et al, 2007). Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tem sido associados com dificuldades de aprendizado em estudos pré-clínicos (LARSON & DUNN, 2001). Tem sido levantada a hipótese de que a etiologia dos efeitos neurocomportamentais tardios da LLA esteja ligada à desregulação dos fatores excitotóxicos e das citocinas/quimiocinas ou com a desregulação imunológica e/ou liberação das citocinas (SHIN et al, 2000). A persistência de níveis elevados de IL-6 nas fases mais tardias do tratamento poderia se associar a efeitos neurocognitivos.

A identificação precoce de crianças em risco para problemas neurocognitivos ainda não é confiável. Algumas pesquisas tem tentado encontrar um meio de identificá-las. Biomarcadores de estresse oxidativo (ex. fosfatidilcolina oxidada) no líquido tem sido correlacionados à intensidade do tratamento com MTX, sugerindo uma associação com toxicidade do SNC (CARON et al, 2009).

Uma explicação provável para a toxicidade no SNC é o fato de o mesmo ser, particularmente, vulnerável ao estresse oxidativo pela alta taxa de consumo de oxigênio e elevados níveis de lipídios poli-insaturados. Tem sido sugerido que o aumento do estresse oxidativo esteja associado à redução dos níveis de BDNF e que esse fato se relacione à disfunção neurocognitiva (KAPCZINSKI et al, 2008).

É possível que os déficits cognitivos dos sobreviventes de LLA sejam consequência do MTX IT e/ou do estresse oxidativo causado pela doença ou por seu tratamento.

Um estudo publicado no *European Journal of Neuroscience*, em 2004, encontrou que o estresse oxidativo pode interagir com o sistema BDNF para modular a plasticidade neurosináptica e a função neurocognitiva. Assim, os estudos parecem revelar um mecanismo pelo qual os eventos classicamente relacionados à manutenção do balanço energético da célula, como o estresse

oxidativo, podem interagir com os eventos moleculares que modulam a plasticidade neuronal e comportamental (WU et al, 2004).

Outro estudo sugere que alterações no estado oxidativo podem estar associadas a níveis anormais de BDNF em indivíduos com doença bipolar (KAPCZINSKI et al, 2009).

Kacpzinski et al. (2011) comentam sobre o conceito de alostase (MCEWEN & STELLAR, 1993): Alostase se refere a um novo nível de adaptações que podem ser necessárias para trazer a homeostase a um organismo após estressores ou outros desafios ambientais. Quando os mediadores da alostase são excessivos ou não cessam de agir, as adaptações se tornam um custo ao organismo. As citocinas e os glicorticóides são exemplos clássicos de mediadores alostáticos. Elas exercem efeitos celulares que, se não forem adequadamente moderados ou compensados podem levar a toxicidades, desregulação fisiológica ou comprometimento médico (JUSTER et al, 2010).

Existem interações entre as neurotrofinas e o sistema inflamatório: as citocinas e o BDNF parecem cooperar em sinalizações intracelulares (BRIETZKE & KAPCZINSKI, 2008). Em condições inflamatórias, a presença do BDNF deve limitar a injúria imune no cérebro.

É possível que o aumento das citocinas e a redução do BDNF, na LLA, possam funcionar, sinergicamente, a favor da degeneração neuronal como na Doença Bipolar, como descreve Kauer-Sant'Anna (2009).

Tem sido cogitada a hipótese de que a etiologia dos efeitos adversos neurocomportamentais tardios esteja associada com a desregulação dos fatores excitotóxicos e das citocinas/ quimiocinas. Foram identificados polimorfismos que afetam os níveis das citocinas e quimiocinas. O aumento das citocinas pró-inflamatórias foi associado a prejuízo do aprendizado espacial em estudos pré-clínicos (LARSON & DUNN, 2001). Em nosso estudo, os níveis de IL-6 e de IL-10 se mostraram significativamente mais elevados nos pacientes do que nos controles.

Neurotrofinas, enzimas antioxidantes e marcadores oxidativos tem interações complexas e recíprocas. Tanto *in vitro* quanto em modelos animais, a presença de espécies reativas de oxigênio e o dano oxidativo relacionado agem como estímulo mensageiro potente para a produção de defesas.

Essas defesas incluem enzimas degradantes dos radicais livres como a SOD e um aumento compensatório nos níveis de BDNF. Não está claro se esses processos operam clinicamente (GAMA et al, 2008).

Em seu estudo, Gama et al. (2008) encontraram que os níveis de BDNF mostraram uma correlação positiva com os níveis de TBARS ($r = 0.333$, $p = 0.009$). Os níveis de BDNF não se correlacionaram com os níveis de superóxido dismutase ($r = -0.181$, $p = 0.166$), e esses últimos não se correlacionaram com os níveis de TBARS ($r = 0.141$, $p = 0.284$).

Os mecanismos dos déficits cognitivos não estão esclarecidos. Imaginando a hipótese de que o metotrexate intratecal poderia reduzir o BDNF e que BDNF reduzido se associa a déficit cognitivo, dosamos o mesmo antes e após a aplicação de MTX IT. Nós pensávamos que a quimioterapia intratecal poderia reduzir os níveis de BDNF e que esse fato estaria relacionado à toxicidade tardia do tratamento para leucemia, que inclui os déficits cognitivos. Porém, nessa amostra isso não ocorreu.

O papel do BDNF na neuroplasticidade diminui nas situações de estresse, podendo esse fato contribuir na gênese dos déficits cognitivos em crianças e adolescentes com LLA.

O dano oxidativo ocorre quando as espécies reativas de oxigênio interagem com lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos. É um mecanismo de injúria celular em condições como câncer, estados inflamatórios e neurodegeneração. Esse mecanismo pode ajudar a explicar a associação de déficits cognitivos em sobreviventes de LLA como Kapczinski et al. (2011) associa em seu trabalho com pacientes bipolares.

Para Pandey et al. (2010), como o BDNF pode atravessar a barreira hematoencefálica em ambas as direções (PAN et al, 1998), é produzido também nas células periféricas, como os linfócitos, então os níveis séricos baixos encontrados nos pacientes com Doença Bipolar pediátrica podem se dever, não somente à redução na produção cerebral, mas também à redução da produção de BDNF na periferia (ie, redução de mRNA nos linfócitos pode também ser um dos fatores responsáveis pela redução de BDNF no cérebro desses pacientes).

Campbell LK et al. (2007), em uma meta-análise com 28 estudos concluíram que os declínios nas áreas de funcionamento cognitivo ocorrem como um resultado do tratamento da LLA. Nós encontramos diferenças significativas entre o conteúdo de proteína carbonil antes e após a remissão completa, o que sugere que houve redução da oxidação proteica com o tratamento. Logo, poderíamos inferir que não é o estresse oxidativo causado pelo tratamento a causa dos déficits cognitivos.

Existem evidências crescentes de que o estresse oxidativo e as ROS tenham papel importante na etiologia e/ou na progressão de um número de doenças humanas (GIUSTARINI et al, 2009).

Nosso estudo teve vários pontos positivos: não encontramos redução do BDNF ou aumento dos TBARS após o MTX IT. Nossos dados podem sugerir que o tratamento da LLA pode reduzir o estresse oxidativo e levanta um questionamento: a doença causaria mais estresse oxidativo do que o tratamento? Nossos achados sugerem que o BDNF se normaliza após o tratamento, semelhante ao que ocorre em doenças psiquiátricas.

Outro ponto positivo é que esse estudo é um dos poucos que examinaram os efeitos imediatos da terapia em crianças com câncer enquanto elas estavam em tratamento. Contudo, existem muitos estudos sobre os efeitos na cognição em sobreviventes adultos de câncer infantil.

Algumas considerações devem ser feitas ao interpretar os resultados desse estudo. Uma delas é a amostra pequena. Além disso, o uso de corticoesteróides poderia influenciar as dosagens de BDNF, já que os primeiros reduzem a expressão dos fatores neuroprotetores, além de prejudicar a capacidade dos neurônios do hipocampo de sobreviver aos insultos neurológicos. Uma limitação é que não foi considerada a influência da atividade física entre os pacientes e os controles. E, como refere Brown et al. (1992), déficits de aprendizado mais definidos podem não aparecer até 4 ou 5 anos após o início do tratamento.

Além disso, o BDNF foi dosado no soro e não no SNC, porém tem sido demonstrado que o mesmo pode atravessar a barreira hemato-encefálica e que existe uma correlação alta entre os níveis séricos e corticais (KAREGE et al, 2002).

Como perspectivas futuras, o dextrometorfano, a fluoxetina, a eritropoietina e os exercícios físicos poderiam alterar os desfechos observados em pacientes que trataram LLA.

O dextrometorfano como antagonista do receptor glutaminérgico, pois o MTX pode induzir alterações persistentes no tônus glutaminérgico que podem contribuir para déficits cognitivos.

O uso da fluoxetina poderia reverter os efeitos de redução do BDNF. Lyons et al. (2012) investigaram os efeitos da quimioterapia com MTX sobre a memória espacial e a proliferação de precursores neurais envolvidos na neurogênese hipocampal de ratos. Concluíam que os ratos que receberam fluoxetina após o MTX tiveram sua habilidade cognitiva restaurada.

Comim et al. (COMIM et al, 2012) avaliaram os efeitos do tratamento com eritropoietina no estresse oxidativo e metabolismo energético de hipocampo e o prejuízo cognitivo após sepse induzida por ligação do ceco e perfuração em animais. Observaram que o uso agudo (uma dose) alterou os parâmetros oxidativos e o metabolismo energético, enquanto o uso crônico (4 dias) reverteu o prejuízo cognitivo no modelo animal.

Fatores ambientais também influenciam os níveis de BDNF. Os exercícios físicos aumentam os níveis de BDNF em humanos e em proporção à intensidade dos mesmos (AHLISKOG, 2011). Além disso, a restrição dietética pode aumentar os níveis de BDNF (LEE et al, 2002).

6 CONCLUSÕES

A hipótese inicial não foi confirmada: o tratamento com MTX IT não reduziu o BDDF e não aumentou o TBARS em 72 horas.

Porém, o estudo mostrou outros achados: O principal deles foi que os níveis de BDNF estavam diminuídos nas crianças com diagnóstico de LLA em relação aos controles normais. E, que essa diferença não se manteve após a remissão completa da doença.

Os resultados do estudo sugerem também que o tratamento com MTX pode aumentar os níveis séricos de BDNF e reduzir o estresse oxidativo.

Do mesmo modo, os níveis de IL-6 e de IL-10 se mostraram, significativamente mais elevados nos pacientes do que nos controles, sendo que a primeira permaneceu elevada durante o tratamento.

Os testes cognitivos mostraram que houve redução dos QIs totais, porém os mesmos se mantiveram na média ou acima dessa.

Portanto, é provável que o tratamento da LLA não seja tão deletério em relação às seqüelas neurocognitivas, como foi colocado na hipótese inicial.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo trouxe muitas perguntas do que respostas. Entendemos como necessários novos estudos, com amostras maiores e tempo de acompanhamento mais prolongado dos pacientes para que se possam confirmar esses achados.

REFERÊNCIAS

1. Adan L, Trivin C, Sainte-Rose C, Zucker JM, Hartmann O, Brauner R. GH Deficiency Caused by Cranial Irradiation during Childhood: Factors and Markers in Young Adults. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(11):5245-51.
2. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):192-201.
3. Ahlskog JE. Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? *Neurology*. 2011;77(3):288-94.
4. Al Tonbary Y, Hasan SA, Zaki M, Hammad A, Kandil S, Fouda A. Impact of anti-oxidant status and apoptosis on the induction phase of chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2011;16(1):14-9.
5. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ*. 2005;12(10):1329-43.
6. Anderson VA, Godber T, Smibert E, Weiskop S, Ekert H. Cognitive and academic outcome following cranial irradiation and chemotherapy in children: a longitudinal study. *Br J Cancer*. 2000;82(2):255-62.
7. Aruoma O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998;75(2):199-212.
8. Baj G, D'Alessandro V, Musazzi L, Mallei A, Sartori CR, Sciancalepore M, et al. Physical exercise and antidepressants enhance BDNF targeting in hippocampal CA3 dendrites: further evidence of a spatial code for BDNF splice variants. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(7):1600-11.
9. Baker LD, Frank LL, Foster-Schubert K, Green PS, Wilkinson CW, McTiernan A, et al. Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. *Arch Neurol*. 2010;67(1):71-9.
10. Baldelli P, Novara M, Carabelli V, Hernandez-Guijo JM, Carbone E. BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic N- and P/Q-type Ca²⁺ channels signalling. *Eur J Neurosci*. 2002;16(12):2297-310.
11. Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res*. 1994;390:45-56.
12. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem*. 2008;41(7-8):511-8.
13. Battisti V, Schetinger MR, Maders LD, Santos KF, Bagatini MD, Correa MC, et al. Changes in acetylcholinesterase (AChE) activity in lymphocytes and whole blood in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Chim Acta*. 2009;402(1-2):114-8.
14. Baune BT, Konrad C, Grotegerd D, Suslow T, Birosova E, Ohrmann P, et al. Interleukin-6 gene (IL-6): a possible role in brain morphology in the healthy adult brain. *J Neuroinflammation*. 2012;9(125):125.
15. Begliomini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, Merlini S, Pluchino N, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J Endocrinol*. 2008;197(2):429-35.
16. Bekinshtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2711-6.
17. BFM protocol. ALL IC-BFM 2002 - A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. Final Version of Therapy Protocol May 3 2002.

18. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 2001;24(1):47-53.
19. Bisen-Hersh EB, Hineline PN, Walker EA. Disruption of learning processes by chemotherapeutic agents in childhood survivors of acute lymphoblastic leukemia and preclinical models. *J Cancer.* 2011;2:292-301.
20. Borrell-Pages M, Canals JM, Cordelieres FP, Parker JA, Pineda JR, Grange G, et al. Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSJ1b and transglutaminase. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1410-24.
21. Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 2005;76(2):99-125.
22. Brietzke E, Kapczinski F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32(6):1355-61.
23. Brouwers P. Commentary: study of the neurobehavioral consequences of childhood cancer: entering the genomic era? *J Pediatr Psychol.* 2005;30(1):79-84.
24. Brown RT, Madan-Swain A, Pais R, Lambert RG, Sexson S, Ragab A. Chemotherapy for acute lymphocytic leukemia: cognitive and academic sequelae. *J Pediatr.* 1992;121(6):885-9.
25. Buizer AI, de Sonnevile LM, Veerman AJ. Effects of chemotherapy on neurocognitive function in children with acute lymphoblastic leukemia: a critical review of the literature. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(4):447-54.
26. Campbell LK, Scaduto M, Sharp W, Dufton L, Van Slyke D, Whitlock JA, et al. A meta-analysis of the neurocognitive sequelae of treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(1):65-73.
27. Cardous-Ubbink MC, Heinen RC, Langeveld NE, Bakker PJM, Voûte PA, Caron HN, et al. Long-term cause-specific mortality among five-year survivors of childhood cancer. *Pediatric Blood & Cancer.* 2004;42(7):563-73.
28. Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Moore IM. Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(4):551-6.
29. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, Amstad P. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 10:123-9.
30. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry.* 2001;50(4):260-5.
31. Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science.* 2006;314(5796):140-3.
32. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000;33 Suppl:S99-108.
33. Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(4):574-7.
34. Cole PD, Kamen BA. Delayed neurotoxicity associated with therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2006;12(3):174-83.
35. Coleman R. *Trends in Neurochemistry Research.* New York: Nova Science Publishers; 2005.
36. Combarros O, van Duijn CM, Hammond N, Belbin O, Arias-Vasquez A, Cortina-Borja M, et al. Replication by the Epistasis Project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2009;6:22.
37. Comim CM, Cassol OJ, Jr., Abreu I, Moraz T, Constantino LS, Vuolo F, et al. Erythropoietin reverts cognitive impairment and alters the oxidative parameters and energetic metabolism in sepsis animal model. *J Neural Transm.* 2012;119(11):1267-74.
38. Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology.* 2007;55(1):2-13.

39. Cousens P, Waters B, Said J, Stevens M. Cognitive effects of cranial irradiation in leukaemia: a survey and meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*. 1988;29(6):839-52.
40. Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*. 2010;3(1):12-29.
41. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-67.
42. Cruz MBZ. WISC III: Escala de Inteligência Wechsler para crianças: Manual. *Avaliação Psicológica*. 2005;4:199-201.
43. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):169-76.
44. Dheen ST, Kaur C, Ling EA. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14(11):1189-97.
45. Djuric Z, Bird CE, Furumoto-Dawson A, Rauscher GH, Ruffin MTt, Stowe RP, et al. Biomarkers of Psychological Stress in Health Disparities Research. *Open Biomark J*. 2008;1:7-19.
46. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*. 2000;127(21):4531-40.
47. Dorfman A. Chemotherapy Effect on Child Cognition Quick, Significant. *Oncology News*. 2012;7(7).
48. Drachtman RA, Cole PD, Golden CB, James SJ, Melnyk S, Aisner J, et al. Dextromethorphan is effective in the treatment of subacute methotrexate neurotoxicity. *Pediatric Hematology-Oncology*. 2002;19(5):319-27.
49. Edsjo A, Lavenius E, Nilsson H, Hoehner JC, Simonsson P, Culp LA, et al. Expression of *trkB* in human neuroblastoma in relation to *MYCN* expression and retinoic acid treatment. *Lab Invest*. 2003;83(6):813-23.
50. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell*. 2003;112(2):257-69.
51. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor *TrkB* is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):689-96.
52. El-Gharbawy AH, Adler-Wailes DC, Mirch MC, Theim KR, Ranzenhofer L, Tanofsky-Kraff M, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3548-52.
53. El-Sabagh ME, Ramadan KS, El-slam IMA, Ibrahim AM. Antioxidants Status in Acute Lymphoblastic Leukemic Patients. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2011;1(1):1-6.
54. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*. 2002;87(4):728-34.
55. Gagnon L. Research on neurocognitive issues in pediatric cancer. Annual Meeting of the International Neuropsychological Society. 2012.
56. Gall CM, Lynch G, C. LJ. Neurotrophic Factors Activity-Regulated BDNF Expression: Contributions to Synaptic Plasticity and Neuroprotection. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research*. 2009:909-16.
57. Gama CS, Salvador M, Andrezza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett*. 2008;433(3):270-3.
58. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(5-6):241-81.

59. Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2005;255(6):381-6.
60. Guimarães LR, Jacka FN, Gama CS, Berk M, Leitão-Azevedo CL, Belmonte de Abreu MG, et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia on a hypocaloric diet. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;1;32(6):1595-8.
61. Harila MJ, Winqvist S, Lanning M, Bloigu R, Harila-Saari AH. Progressive neurocognitive impairment in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(2):156-61.
62. Jabbour E, O'Brien S, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Ravandi F, et al. Neurologic complications associated with intrathecal liposomal cytarabine given prophylactically in combination with high-dose methotrexate and cytarabine to patients with acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(8):3214-8.
63. Jehn CF, Kuehnhardt D, Bartholomae A, Pfeiffer S, Krebs M, Regierer AC, et al. Biomarkers of depression in cancer patients. *Cancer*. 2006;107(11):2723-9.
64. Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010;35(1):2-16.
65. Kadan-Lottick NS, Zeltzer LK, Liu Q, Yasui Y, Ellenberg L, Gioia G, et al. Neurocognitive functioning in adult survivors of childhood non-central nervous system cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(12):881-93.
66. Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Cunha AB, Post RM. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008;30(3):243-5.
67. Kapczinski F, Dias VV, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M. Brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: beyond trait and state: comment on 'Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders'. *Bipolar Disord*. 2009;11(2):221-2; author reply 2-3.
68. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PVS, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research*. 2011;45(2):156-61.
69. Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*. 2002;109(2):143-8.
69. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry*. 2005;57(9):1068-72.
70. Katoh-Semba R, Tsuzuki M, Miyazaki N, Yoshida A, Nakajima H, Nakagawa C, et al. Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci Res*. 2007;59(3):277-87.
71. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12(4):447-58.
72. 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.
73. Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(5):762-72.

74. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33538-46.
75. Kim J, Dubowitz H, Hudson-Martin E, Lane W. Comparison of 3 Data Collection Methods for Gathering Sensitive and Less Sensitive Information. *Ambulatory Pediatrics*. 2008;8(4):255-60.
76. Kingma A, Van Dommelen RI, Mooyaart EL, Wilmink JT, Deelman BG, Kamps WA. No major cognitive impairment in young children with acute lymphoblastic leukemia using chemotherapy only: a prospective longitudinal study. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24(2):106-14.
77. Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH, Pei D, et al. Homocysteine, Pharmacogenetics, and Neurotoxicity in Children With Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(16):3084-91.
78. Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Niyaz M, et al. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*. 2008;22(3):546-58.
79. Kwong YL, Yeung DY, Chan JC. Intrathecal chemotherapy for hematologic malignancies: drugs and toxicities. *Ann Hematol*. 2009;88(3):193-201.
81. Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun*. 2001;15(4):371-87.
82. Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, et al. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006;113(9):1217-24.
83. Laurenzi MA, Beccari T, Stenke L, Sjölander M, Stinchi S, Lindgren JA. Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in human granulocytes and bone marrow cells--enhanced neurotrophin-4 expression induced by LTB₄. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998;64(2):228-34.
84. Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*. 2002;82(6):1367-75.
85. Lengen C, Blasius J, Kistemann T. Self-perceived health space and geographic areas in Switzerland. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2008;211(3-4):420-31.
86. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2003;69(5):341-74.
87. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Lester Packer ANG, ed. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1990. p.464-78.
88. Li Y, Vijayanathan V, Gulinello ME, Cole PD. Systemic methotrexate induces spatial memory deficits and depletes cerebrospinal fluid folate in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;94(3):454-63.
89. Li Z, Beutel G, Rhein M, Meyer J, Koenecke C, Neumann T, et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood*. 2009;113(9):2028-37.
90. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(9):613-22.
91. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, et al. Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005a;171(2):115-20.
92. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005b;26(1):115-23.
93. Lou H, Kim SK, Zaitsev E, Snell CR, Lu B, Loh YP. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron*. 2005;45(2):245-55.

94. Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res.* 2008;1210:48-55.
95. Lyons L, ElBeltagy M, Bennett G, Wigmore P. Fluoxetine counteracts the cognitive and cellular effects of 5-fluorouracil in the rat hippocampus by a mechanism of prevention rather than recovery. *PLoS One.* 2012;7(1):e30010.
96. Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, et al. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry.* 2007;61(2):142-4.
97. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, Nalini K, Bairy KL. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2002;80(11):1076-84.
98. Manni L, Nikolova V, Vyagova D, Chaldakov GN, Aloe L. Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* 2005;102(1):169-71.
99. Marini AM, Jiang X, Wu X, Pan H, Guo Z, Mattson MP, et al. Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino Acids.* 2007;32(3):299-304.
100. Martinez-Moreno A, Rodriguez-Duran LF, Escobar ML. Late Protein Synthesis-Dependent Phases in CTA Long-Term Memory: BDNF Requirement. *Front Behav Neurosci.* 2011;5(61):61.
101. Marx J. Neurodegeneration. Huntington's research points to possible new therapies. *Science.* 2005;310(5745):43-5.
102. Mazor D, Abucoider A, Meyerstein N, Kapelushnik J. Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: the impact of oxidative stress. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51(5):613-5.
103. McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* 1993;153(18):2093-101.
104. Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME, Ruccione K, et al. Late Mortality Experience in Five-Year Survivors of Childhood and Adolescent Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2001;19(13):3163-72.
105. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005;6(3):187-95.
106. Miller AA. Alternating Acetaminophen with Ibuprofen for Fever: Is this a Problem? *Pediatr Ann.* 2007;36(7):384-6.
107. Mitby PA, Robison LL, Whitton JA, Zevon MA, Gibbs IC, Tersak JM, et al. Utilization of special education services and educational attainment among long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer.* 2003;97(4):1115-26.
108. Moleski M. Neuropsychological, neuroanatomical, and neurophysiological consequences of CNS chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Clin Neuropsychol.* 2000;15(7):603-30.
109. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Med.* 2002;8(9):955-62.
110. Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, Berton O, Galanis V, Gemelli T, et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10827-32.
111. Moore IM, Espy KA, Kaufmann P, Kramer J, Kaemingk K, Miketova P, et al. Cognitive consequences and central nervous system injury following treatment for childhood leukemia. *Semin Oncol Nurs.* 2000;16(4):279-90; discussion 91-9.
112. Mulhern RK, Fairclough D, Ochs J. A prospective comparison of neuropsychologic performance of children surviving leukemia who received 18-Gy, 24-Gy, or no cranial irradiation. *J Clin Oncol.* 1991;9(8):1348-56.

113. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;63(1):71-124.
114. Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gaudie J, Kaplan D, Richardson PM. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *Eur J Neurosci.* 2000;12(6):1891-9.
115. Mustafa S, Walker A, Bennett G, Wigmore PM. 5-Fluorouracil chemotherapy affects spatial working memory and newborn neurons in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2008;28(2):323-30.
116. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000;58(58):143-51.
117. Naoum PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2001;23:111-9.
118. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet.* 2002;71(3):651-5.
119. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1572-82.
120. Palmer SL, Goloubeva O, Reddick WE, Glass JO, Gajjar A, Kun L, et al. Patterns of Intellectual Development Among Survivors of Pediatric Medulloblastoma: A Longitudinal Analysis. *Journal of Clinical Oncology.* 2001;19(8):2302-8.
121. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37(12):1553-61.
122. Pandey GN, Rizavi HS, Dwivedi Y, Pavuluri MN. Brain-derived neurotrophic factor gene expression in pediatric bipolar disorder: effects of treatment and clinical response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2008;47(9):1077-85.
123. Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Zhang H, Pavuluri MN. Brain-derived neurotrophic factor gene and protein expression in pediatric and adult depressed subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010;34(4):645-51.
124. Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev.* 2004;3(4):407-30.
125. Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, Nociti V, Frisullo G, Gainotti G, et al. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2010;88(5):1106-12.
126. Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 1996;16(6):1137-45.
127. Payatakes AH, Zagoreos NP, Fedorcik GG, Ruch DS, Levin LS. Current practice of microsurgery by members of the American Society for Surgery of the Hand. *J Hand Surg [Am].* 2007;32(4):541-7.
129. Peterson CC, Johnson CE, Ramirez LY, Huestis S, Pai AL, Demaree HA, et al. A meta-analysis of the neuropsychological sequelae of chemotherapy-only treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51(1):99-104.
130. Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *J Psychiatr Res.* 2007;41(12):979-90.
131. Protas PT, Muszynska-Roslan K, Holownia A, Krawczuk-Rybak M, Braszko JJ. Cerebrospinal fluid oxidative stress during chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Hematol Oncol.* 2010;27(4):306-13.
132. Prusch D, Farias CB, Cornélio D, Heinen TE, Santos RP, L. AA, et al. O Papel do BDNF/TrkB em linhagens celulares de tumores feminininos *Salão de Iniciação Científica* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2011.

133. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9):605-15.
134. Qian L, Zhao J, Shi Y, Zhao X, Feng G, Xu F, et al. Brain-derived neurotrophic factor and risk of schizophrenia: An association study and meta-analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;353(3):738-43.
135. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Hyland K, Farrow A, Kamen BA. Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15(8):2800-6.
136. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res*. 1996;709(1):122-301.
137. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1473):1545-64.
138. Reus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, et al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res*. 2011;36(3):460-6.
139. Ribases M, Gratacos M, Fernandez-Aranda F, Bellodi L, Boni C, Anderluh M, et al. Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(4):428-34.
140. Ribera JM, Oriol A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(5):1033-42, vi.
141. Riccardi R, Brouwers P, Di Chiro G, Poplack DG. Abnormal computed tomography brain scans in children with acute lymphoblastic leukemia: serial long-term follow-up. *Journal of Clinical Oncology*. 1985;3(1):12-8.
142. Rigotti A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med*. 2007;28(5-6):423-36.
143. Robinson KE, Kuttesch JF, Champion JE, Andreotti CF, Hipp DW, Bettis A, et al. A quantitative meta-analysis of neurocognitive sequelae in survivors of pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(3):525-31.
144. Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry*. 2004;55(7):708-14.
145. Rodrigues FO. Avaliação dos níveis séricos de BDNF em pacientes pediátricos com neoplasia (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, 2012.
146. Sánchez-Rodríguez MA, Santiago E, Arronte-Rosales A, Vargas-Guadarrama LA, Mendoza-Núñez VM. Relationship between oxidative stress and cognitive impairment in the elderly of rural vs. urban communities. *Life Sciences*. 2006;78(15):1682-7.
147. Santin K, da Rocha RF, Cechetti F, Quincozes-Santos A, de Souza DF, Nardin P, et al. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res*. 2011;1421:1-10.
148. Sarmiento-Ribeiro AB, Proenca MT, Sousa I, Pereira A, Guedes F, Teixeira A, et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leuk Res*. 2012;36(8):1041-8.
148. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*. 2011;51(2-3):170-82.
149. Schatz J, Kramer JH, Ablin A, Matthay KK. Processing speed, working memory, and IQ: A developmental model of cognitive deficits following cranial radiation therapy. *Neuropsychology*. 2000;14(2):189-200.

150. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V, Sieverts H, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2005;228(1-2):143-53.
151. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia.* 2000;14(12):2205-22.
152. Seibel NL. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:374-80.
153. Seigers R, Schagen SB, Coppens CM, van der Most PJ, van Dam FS, Koolhaas JM, et al. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. *Behav Brain Res.* 2009;201(2):279-84.
154. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32(3-4):307-26.
155. Sherwood NT, Lo DC. Long-term enhancement of central synaptic transmission by chronic brain-derived neurotrophic factor treatment. *J Neurosci.* 1999;19(16):7025-36.
156. Shieh PB, Hu S-C, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A. Identification of a Signaling Pathway Involved in Calcium Regulation of BDNF Expression. *Neuron.* 1998;20(4):727-40.
157. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, et al. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry.* 2003;54(1):70-5.
158. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14467-72.
159. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology.* 1997;82(2):291-5.
160. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood.* 2001;97(5):1211-8.
161. Singh B, Mense SM, Remotti F, Liu X, Bhat HK. Antioxidant butylated hydroxyanisole inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis in female ACI rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009;23(3):202-11.
162. Singh V, Ghalaut PS, Kharb S, Singh GP. Plasma concentrations of lipid peroxidation products in children with acute leukaemia. *Indian J Med Sci.* 2001;55(4):215-7.
163. Sossin WS, Barker PA. Something old, something new: BDNF-induced neuron survival requires TRPC channel function. *Nat Neurosci.* 2007;10(5):537-8.
164. Staats R, Stoll P, Zingler D, Virchow JC, Lommatzsch M. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during sleep apnoea treatment. *Thorax.* 2005;60(8):688-92.
165. Stenzel SL, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Miketova P, et al. Oxidative stress and neurobehavioral problems in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010;32(2):113-8.
166. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(2):77-107.
167. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):5962-7.
168. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.* 1995;270(5236):593-8.
169. Tramontina JF, Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neurosci Lett.* 2009;452(2):111-3.
170. Ueberall MA, Skirl G, Strassburg HM, Wenzel D, Hertzberg H, Langer T, et al. Neurophysiological findings in long-term survivors of acute lymphoblastic leukaemia in childhood treated with the BFM protocol 81 SR-A/B. *Eur J Pediatr.* 1997;156(9):727-33.

171. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
172. Vikramjit SK. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Differential Diagnoses. 2012 May 31 [cited 12 de outubro de 2012]; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/990113-differential>
173. Waber DP, Shapiro BL, Carpentieri SC, Gelber RD, Zou G, Dufresne A, et al. Excellent therapeutic efficacy and minimal late neurotoxicity in children treated with 18 grays of cranial radiation therapy for high-risk acute lymphoblastic leukemia: a 7-year follow-up study of the Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 87-01. *Cancer*. 2001;92(1):15-22.
174. Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna MK, Madruga M, Rodrigues C, et al. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem*. 2000;73(1):11-20.
175. Wang H, Yuan G, Prabhakar NR, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling. *J Neurochem*. 2006;96(3):694-705.
176. Wright CB, Sacco RL, Rundek TR, Delman JB, Rabbani LE, Elkind MS. Interleukin-6 is associated with cognitive function: the Northern Manhattan Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2006;15(1):34-8.
177. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004;19(7):1699-707.
178. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. 2002;70(7):735-44.
179. Zebrack BJ, Gurney JG, Oeffinger K, Whitton J, Packer RJ, Mertens A, et al. Psychological outcomes in long-term survivors of childhood brain cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):999-1006.
180. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(6):311-22.

APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O objetivo desse estudo é avaliar no sangue o nível de uma substância chamada de BDNF, que poderá estar alterada em pessoas que sofreram algum tipo de trauma. Será feita a coleta de uma amostra de sangue (4 mL). O sangue coletado será armazenado, para fins dessa pesquisa, e os riscos envolvidos nessa pesquisa são mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta de sangue. O nome do paciente será mantido em sigilo pelos pesquisadores, sendo estes dados utilizados apenas para esta pesquisa.

Eu, _____, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual meu filho(a) ou criança que se encontra sob meus cuidados estará envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa de acordo com estas informações, sem que isto traga prejuízo ao atendimento que meu filho(a) ou criança sob meus cuidados, recebe na instituição. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

O profissional _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial, sem identificação do paciente.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com Dra. Marta Osorio Alves, pelo telefone 33598371.

Assinatura do paciente ou responsável legal

Assinatura do investigador

Data:

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO 1 – BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY MARKERS IN CHILDREN TREATING ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Artigo Submetido ao *Pediatric Blood & Cancer*

BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY MARKERS IN CHILDREN TREATING ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Marta Maria Osorio Alves; Paulo Roberto Antonacci Carvalho; Liane Esteves Daudt; Mariana Bohns Michalowski; Cristina Toscani Leal Dornelles; Maria Inês de Albuquerque Wilasco; Viviane Ziebell de Oliveira; Ana Lucia Barros Gonçalves; Laura Stertz ; Pâmela Ferrari; Flávio Kapczinski; Clarissa S. Gama.

Marta Maria Osorio Alves, MD- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

Paulo Roberto Antonacci Carvalho, PhD- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

Liane Esteves Daudt, PhD -- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Department of Hematology. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil

Mariana Bohns Michalowski, PhD Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Hematology Service. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil.

Cristina Toscani Leal Dornelles, PhD- Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG). Serviço de Nutrição e Dietética.

Maria Inês de Albuquerque Wilasco-MD-Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG)

Viviane Ziebell de Oliveira-PhD Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil.

Ana Lucia Barros Gonçalves- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Laura Stertz - Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil).

Pâmela Ferrari- Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Clarissa S. Gama-PhD Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Flávio P. Kapczinski- PhDLaboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Adress for correspondence:
M.M.O.Alves.
Hospital de Clínicas de Porto alegre.
Ramiro Barcelos 2350, Largo Eduardo Zacaro Faraco
CEP 90035-903,
Pediatric Service, 10th floor.
E-mail: osoriodor@yahoo.com.br.

ABSTRACT

BACKGROUND: Survivors of acute lymphoblastic leukemia (ALL) may experience cognitive deficits even with no cranial radiation. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels have been associated with such deficits, as it is essential for memory consolidation and cognitive functions. **PROCEDURE:** this work is a case-control study in a cohort to determine if intrathecal methotrexate is associated with changes in BDNF levels in pediatric ALL patients. To measure serum oxidative stress markers and cytokines, and evaluate cognitive functions in such patients. We measured serum BDNF, thiobarbituric reactive substances (TBARS), protein carbonyl content, interleukin-6 and interleukin-10 in 62 samples of peripheral blood of 8 pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and 40 controls during chemotherapy. A psychologist performed WISC-III or WIPPSI-R tests at the time of diagnosis and 6 months later. **RESULTS:** BDNF and TBARS levels before and 72 hours after intrathecal methotrexate showed no significant differences. BDNF levels were lower in patients than in controls ($p < 0.001$), but such differences disappeared when the disease was under control. Serum protein carbonyl content was lower in patients after remission, compared with levels at the time of diagnosis. IL-6 persisted higher in patients than in controls ($p < 0.05$) after M protocol. WISC-III or WIPPSI-R subtest for memory showed improvement, except for one patient. **CONCLUSION:** these results suggest that methotrexate did not change BDNF and TBARS levels in 72 hours. They also suggest that BDNF levels are lower in pediatric ALL but treatment reverses such condition. Memory and IQ were preserved 6 months after starting treatment. After remission, there is a state of persistent inflammation.

KEYWORDS: leukemia, BDNF, oxidative stress, methotrexate, cognitive functions.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy diagnosed in children, representing nearly one third of all pediatric cancers. With improvements in diagnosis and treatment, overall cure rates for children with ALL have reached 90%. Unfortunately, however, the increase in survival rates has been associated with an increase in treatment-related toxicity as patients are subjected to an aggressive and continuous chemotherapy protocol. Cognitive deficits and learning disability are among these late effects, even when treatment does not include cranial radiation [1-2].

Methotrexate (MTX), a crucial therapeutic component, is often associated with both acute and long term neurotoxicity. Mechanisms involved in such effects are not clearly understood [1, 3-6].

BDNF is a neurotrophin that plays a central role in synaptic plasticity and neuronal survival. It is essential for memory consolidation and for cognitive functions [7]. Reduced levels, in brain, are associated with cognitive deficits and memory impairment, among others conditions [8-9]. Pediatric ALL patients are subjected to an aggressive and continuous chemotherapy protocol that may produce oxidative stress.

Oxidative stress has been correlated with BDNF reductions [10-11]. Several studies has been documented an association of oxidative stress and ALL [12-18].

Some authors as Micketova et al. suggest that cognitive deficits could be consequence of oxidative stress caused by treatment [13].

It is possible that those cognitive deficits seen in ALL survivors are consequences of intrathecal MTX and/or oxidative stress.

There is abundant evidence that inflammatory mechanisms within the central nervous system (CNS) contribute to cognitive impairment via cytokine-mediated interactions between neurons and glial cells [19-20]. High levels of pro-inflammatory cytokines have been associated with learning disabilities [21].

Therefore, we measured serum BDNF, TBARS, protein carbonyl content (PCC), IL-6 and IL-10 at the time of diagnosis and during treatment in ALL pediatric patients, and compared with matched healthy control groups.

METHODS

The purpose of this work was to determine if intrathecal methotrexate is associated with changes in BDNF serum levels in pediatric ALL patients. To measure serum concentrations of oxidative stress markers and cytokines and evaluate cognitive functions in such patients.

This report is on a case-control study nested in a cohort. It was conducted at Hospital de Clínicas de Porto Alegre from July 2010 to November 2011.

Sixty two blood samples are obtained from eight children with ages between 2 to 13 years- old, 4 boys and 4 girls, with common ALL without central nervous system (CNS) disease at the time of diagnosis. All patients were treated with a BFM 2002-based protocol (BFM- Berlin-Frankfurt-Münster). Blood samples of forty healthy children matched for age and sex were kept frozen at -80°C and authorized for use in this study.

The study received approval from research and ethics committees. Written informed consent was obtained from all patients and healthy subjects prior any procedure for the study.

We measured serum concentrations of BDNF, TBARS, IL-6, IL-10 and protein carbonyl content (PCC) in patients and in controls during the treatment with a BFM-based protocol. Samples were obtained before and 72 hours after each intrathecal methotrexate dose at the time of diagnosis, after complete remission, and at the time of M protocol (high doses of MTX and no steroids).

Biochemical assays

Blood samples were withdrawn from each subject by venipuncture into a free anticoagulant vacuum tube and in a tube with anticoagulant. After gentle mixing were allowed to clot at room temperature, and then centrifuged at 4000 g for 10 minutes. Then serum was collected and stored at -80° C until assayed.

BDNF assay

BDNF serum levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instruction (Chemicon, Temecula, CA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:75 in sample

diluents and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer, added monoclonal anti-BDNF rabbit antibody (diluted 1:1000 with sample diluents), and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated (diluted 1:1000) for 1 h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set in 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density (OD) and BDNF concentration. The assay sensitivity for BDNF was 7.8 pg /ml (range 7.8–500 pg /ml). The results are expressed in ng /mL.

Cytokine assay

Cytokines levels in serum samples were determined by the CBA Human Enhanced Sensitivity Flex Set System (BD) accordantly the manufacture instructions. Briefly, serum samples and a standard curve ranged from 0 (negative control) to 200.000 fg/mL of IL-6, IL10 were coated with the Capture Beads of interest (IL-6, IL-10, TNF-a) for 2 hours. After, we add the mixed Human Detection Reagent (Part A) to each assay well and coated for 2 hours at room temperature. After washing, the Enhanced Sensitivity Detection Reagent (Part B) was added and the samples were incubated for 1 hour. A final wash were perform and the samples were analyze using FACSCalibur flow cytometer. The final concentration of cytokines was calculated using Excel program for Macintosh. Values are expressed as fg/mL.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay

The levels of lipid peroxidation were measured by the method of TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) using the TBARS assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor), according to the manufacturer's instructions. In this method, the quantification of lipid peroxidation products is performed by plasma formation of substances reacting to thiobarbituric acid, which is the analysis of the final products of lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehyde and other aldehydes of low molecular weight) that the react with 2-thiobarbituric acid (TBA) form Schiff bases. These complexes exhibit color and its

concentration can be determined spectrophotometrically at 535 nm. The results are expressed in μM of MDA.

Protein Carbonyl Content (PCC)

Oxidative damage to proteins were analyzed by the determination of carbonyl groups (PCC method - carbonyl content in proteins), as previously described by Levine and colleagues [22]. In this, proteins are precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid (TCA), re-solubilized in dinitrophenylhydrazine (DNPH), and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Values are expressed as nmol/mg protein.

Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC) III or WIPPSI-R (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence) were administered to the children at diagnosis and 6 months later.

Statistical analysis was performed using SPSS software 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). T-Test was used to compare BDNF and TBARS levels between patients and controls. Mann Whitney test was used to compare IL-6, IL-10 and carbonyl between patients and controls. Wilcoxon test was used to compare BDNF, TBARS, IL-6, IL-10 and carbonyl levels in patients at first measure and after complete remission. Mann Whitney test was used to compare patients at first M protocol and controls. A significant level α 0.05 is considered.

RESULTS

Sample characteristics are showed at Table I.

TABLE I. Characteristics of patients and controls

Characteristics	Patients	Controls
Age	2–13 years	4–16 years
Gender		
Boys	4 (50%)	19 (47.5 %)
Girls	4 (50%)	19 (52.5 %)

OBS: all patients had a diagnosis of common ALL without CNS disease. All were treated with a BFM 2002- based protocol.

At the time of diagnosis, brain-derived neurotrophic factor levels were lower in patients than in controls ($p < 0.001$), and IL-6 and IL-10 were higher in patients than in controls ($p < 0.05$) and TBARS levels not showed no significant differences between groups (Table II and Figure 1).

TABLE II. Serum levels of markers in patients and controls

Variables	Patients	Controls	<i>P</i> value
BDNF	n = 32	n = 40	<0.001
	mean = 18.94±12.04	mean = 37.49±11.84	
	CI (95%) = 16.47–21.40	CI (95%) = 33.70–41.28	
	median = 13.69	median = 39.67	
TBARS	n = 32	n = 40	0.955
	mean = 11.36±9.79	mean = 9.77±5.64	
	CI (95%) = 9.37–13.36	CI (95%) = 7.97–11.58	
	median = 8.50	median = 8.25	
IL-6	n = 31	n = 36	0.002
	745.08 (P50)	355.97 (P50)	
	CI (95%) = 138.43–22856.10	CI (95%) = 121.82–1750.99	
IL-10	n = 29	n = 34	0.032
	588.69 (P50)	374.96 (P50)	
	CI (95%) = 104.63–11546.54	CI (95%) = 97.94–1226.50	
PCC	n = 32	n = 39	0.405
	0.144 (P50)	0.154 (P50)	
	CI (95%) = 0.062–0.284	CI (95%) = 0.052–0.288	

BDNF ng/mL; TBARS uM of MDA; PCC mmol/mg protein; cytokines fg/mL

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances;

IL-10 - interleukin 10; IL-6 - interleukin 6. PCC- protein carbonyl content;

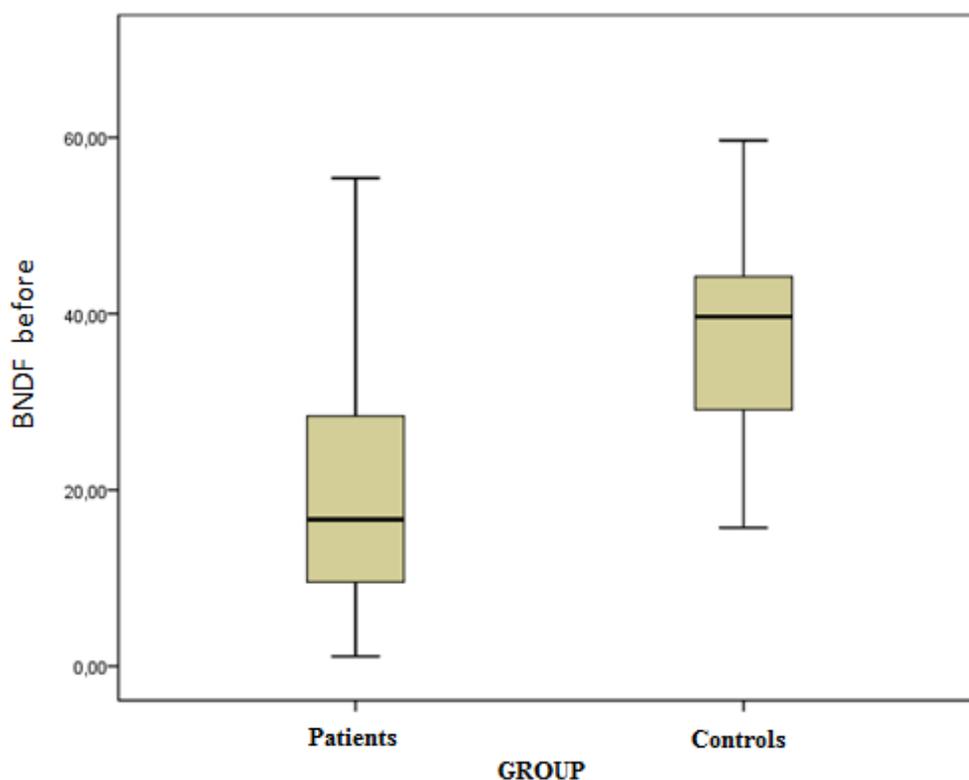


Fig.1. BDNF in patients and in controls at the time of diagnosis

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and thiobarbituric reactive substances (TBARS) levels before and 72 hours after each intrathecal methotrexate showed no significant differences (Table III).

TABLE III. Serum BDNF and TBARS before and after IT MTX (n=31)

Variables	median	CI (95%)	<i>P</i> value
BDNF			
before	14.42	9.31–28.59	
after	1.11	8.31–29.89	0.652
TBARS			
before	7.19	5.50–12.00	
after	9.00	6.71–12.50	0.992

BDNF – brain- derived neurotrophic factor; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances.

Comparing patients, before and after complete remission, we found no significant changes in BDNF, TBARS, IL-6 e IL-10. On the other hand, PCC was lower in patients compared with levels at the time of diagnosis ($p < 0.046$) (Table IV).

TABLE IV. Serum BDNF, oxidative stress and inflammatory markers in patients before and after complete remission of disease (n=31)

Variables	At diagnosis		after CR		P value
	median	CI (95%)	median	CI (95%)	
BDNF	9.62	7.69–15.12	23.59	8.13–31	0.345
TBARS	13.75	7.50–23.01	9.50	5.50–11.00	0.600
IL-6	4144.33	588.33–1387.50	2107.83	615.19–2765.97	0.600
IL-10	998.11	340.22–7106.06	711.35	386.18–861.11	0.715
PCC	0.186	0.147–0.218	0.144	0.101–0.156	0.046

Wilcoxon Test

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances; IL-10 - interleukin 10; IL-6 - interleukin -6. PCC- protein carbonyl content; CR- complete remission

At first M protocol (consolidation phase of remission with high doses methotrexate), no differences were showed between groups, except for IL-6 that persisted higher in patients than in controls ($p < 0.05$) after M protocol (Table V)

TABLE V. Serum BDNF, oxidative stress and inflammatory markers in patients at M protocol compared with controls

Variables	1st M Protocol median (CI 95%)	Controls median (CI 95%)	P value
BDNF	30.19±7.10*	37.49 ±11.84*	0.151
TBARS	7.50 (4.37–17.37)	8.25 (5.50–13.25)	0.683
IL-6	1426.46 (373.99–2287.34)	355.97 (239.56–665.60)	0.034
IL-10	546.55 (331.51–1372.31)	374.96 (197.26–555.46)	0.125
Carbonyl	0.15 (0.094–0.177)	0.171 (0.122–0.171)	0.463

* Standard deviation

M Protocol - consolidation phase of remission with methotrexate high doses; BDNF – brain-derived neurotrophic factor; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances; IL-10 - interleukin 10; IL-6 - interleukin -6.

Finally, BDNF levels showed an increase during treatment (Fig. 2).

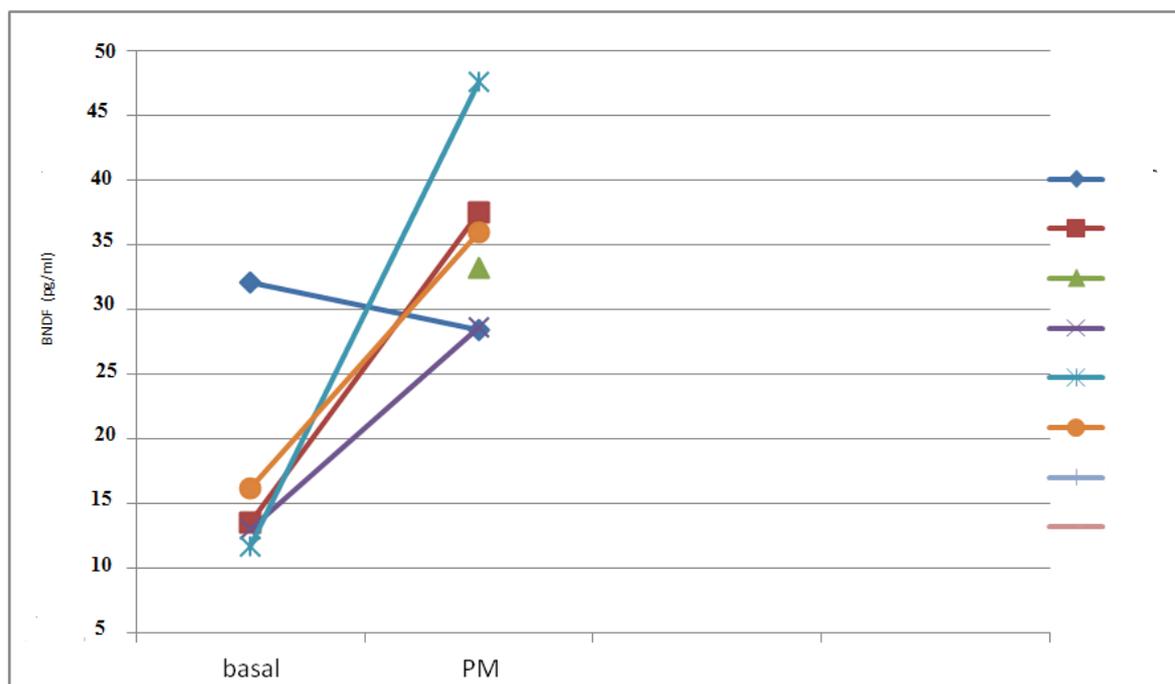


Fig.2. BDNF at diagnosis and at first M protocol

Results for WISC III or WIPPSI-R

Total IQ, which represents a child's general cognitive ability, remained mean or higher. Subtests for memory showed improvement in the second application (except for one patient), even though subtests for comprehension showed worse results for all.

DISCUSSION

This is the first study to examine BDNF levels, oxidative stress markers and cytokines during pediatric ALL treatment. The results suggest that ALL is associated with changes in neurotrophins and cytokines that vary from the time of diagnosis and stages of treatment.

Interestingly, in this work, we could find that ALL patients, at the diagnosis, had BDNF levels lower than controls ($p < 0.001$) and also had IL-6 and IL-10 levels higher than in controls ($p < 0.05$) (Table I). On the other hand, when we compared BDNF and TBARS levels in patients, before and after 72h each intrathecal MTX application, no significant changes were seen (Table II).

Nevertheless, comparing levels in patients, before and after complete remission, we could not find statistical differences in BDNF, TBARS, IL-6, IL-10, but serum protein carbonyl content (PCC) was lower than in first measure suggesting a reduction in oxidative stress. (Table III). In the first M protocol of BFM-based treatment (consolidation of remission stage with high doses of MTX), we could not find significant differences in variables between patients and controls, except for IL-6 (a pro-inflammatory IL), higher in patients, suggesting a state of persistent inflammation (Table IV).

Total IQ is preserved, representing a preserved general cognitive ability as sowed by WISC III or WIPPSI-R. Subtests for memory showed improvement in the second application (except for one patient), otherwise subtests for comprehension showed worse results for all.

Analyzing the results, there is some evidence that ALL is associated with lower levels of BDNF compared to controls. However, such difference disappeared when the disease is controlled, at the same time that oxidative damage to proteins reduced, suggesting treatment is effective in lowering oxidative stress and increasing BDNF. Additionally and curiously, we had found a persistence of an inflammatory state, as IL-6 levels were higher in patients, even late in treatment. On the other hand, the fact that BDNF and TBARS did not change, before and after IT MTX, could suggest that this is not the mechanism of MTX toxicity, or 72 hours is not the time the changes occur, or even the sample size does not permit to see any change. Surprisingly, the treatment had reduced oxidative stress and not increased it, as we had thought previously.

Differently, Dorfman had concluded that intravenous or intrathecal MTX could cause measurable decline in learning and memory 24 to 72 hours after the application in children with leukemia. She studied 19 children and adolescents—11 males and eight females [23]]. On the Rey Auditory Verbal Learning Test, which measures verbal learning and memory, there was a statistically significant decrease in scores.

Similar to us, Battisti et al. found that there is a persistence of oxidative stress in ALL and that, after treatment, levels of antioxidants returned to normal values, indicating the regression of disease as a result of the treatment [24]. Battisti et al. concluded that the treatment was, in fact, efficient as no significant differences was observed between the out-of-treatment and controls groups for catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity, efficient enzymatic antioxidants [24].

Other authors also had found association of oxidative stress and ALL. Kennedy et al. concluded that, among children with ALL, antioxidant levels and oxidative stress appear to be associated with duration and complications of treatment [14]. A study in Arizona had

investigated oxidative stress as a possible mechanism of damage to Central Nervous System (CNS) induced by chemotherapy [13]. The study of Mazor et al. concluded that the lower antioxidant status in the plasma of children with ALL is probably associated with increased reactive oxygen species (ROS) as indicated by the decrease of the antioxidant activity [25]. The authors suggested that this oxidative stress may lead to cell death or greater sensitivity of the tumor cell to therapy, with better outcome for pediatric patients with ALL. The work of El-Sabagh provides evidence for the increased levels of oxidative damage and decreased levels of the antioxidant system in ALL patients [18]. Al Tombary et al., in his study with 50 newly diagnosed children with ALL, showed increased oxidative stress at diagnosis and after treatment with chemotherapy [26]. Sarmiento-Ribeiro et al. suggest the involvement of oxidative stress in acute and chronic lymphoid leukemia pathobiology and leukemic relapse [27].

We wanted to know which mechanisms cause neurocognitive late effects. We thought that IT MTX could reduce BDNF and that reduced levels could be associated with cognitive deficits, but, in this study, this was not confirmed.

Oxidative stress may be associated with those neurocognitive deficits. Caron et al., in 88 ALL pediatric, demonstrated an increased oxidative stress following induction and consolidation, and also decreased executive function 2 years later [15]. The results of Protas et al. study indicate that neurotoxicity of standard ALL treatment may be related to oxidative stress [17]. Gama et al. suggested that elevated levels of oxidative stress in neurons produce deleterious effects in transduction signals, structural plasticity and cellular resilience, especially by inducing lipid peroxidation in membranes, proteins and genes [28]. Stenzel et al. suggested that symptoms of neurobehavioral problems occur early in the course of the chemotherapy and that increases in the cerebrospinal fluid of biomarkers of oxidative stress during induction and consolidation of remission may help to predict certain future behavioral problems [16].

We also found changes in cytokines. Cytokines are thought to be important mediators in physiologic and pathophysiologic processes affecting CNS; data indicate that cytokines, such as IL-6, can have a direct pathogenic role in inflammatory, infectious, and neurodegenerative CNS diseases [29]. High levels of pro-inflammatory cytokines have been associated with learning difficulties in pre-clinical studies [21]. It has been hypothesized that etiology of late neurobehavioral effects is linked to dysregulation of excitotoxic factors and cytokines /chemokines or with immune dysregulation and/or release of cytokines. IL-6 persisting elevated late in treatment could be associated with neurocognitive effects [19].

Furthermore, early identification of children "at risk" for neurocognitive problems is not yet reliable. Biomarkers of oxidative stress (e.g., oxidized phosphatidylcholine) in cerebral spinal fluid (CSF) have been correlated with intensity of methotrexate (MTX) treatment, suggesting an association with acute central nervous system toxicity.

It has been suggested that oxidative stress could be associated to reduced BDNF levels and this fact would cause neurocognitive dysfunction [11].

A probable explanation to CNS toxicity is the fact that CNS is extremely vulnerable to peroxidative damage because of the high oxygen consumption rates and also high polyunsaturated lipids levels. It is suggested that an increase of oxidative stress is associated with reduction of BDNF levels, and that such reduction could be related to neurocognitive dysfunction [11].

It is possible that those cognitive deficits seen in ALL survivors are consequences of intrathecal MTX and/or oxidative stress.

Our study has positive points: we have found no reduction in BDNF levels nor increase in TBARS levels after IT MTX. We could suggest that treatment is able to reduce oxidative stress and raises a question: disease causes more oxidative stress than its treatment?

We also showed reduced BDNF levels in recently diagnosed ALL pediatric patients. Finally, our findings suggest that BDNF levels normalize after treatment, similar to results of treatment in mental diseases.

There is a consistent data suggesting that BDNF levels normalize following treatment for ALL, similar to data that has been described in psychiatric diseases.

Kauer-Sant'Anna et al. studying bipolar disorder had found that IL-6 continued to be significantly higher than controls at late stages of the disease and IL-10 did not [30]. Interestingly, Patanella et al. studying multiple sclerosis, showed a correlation between low BDNF and high IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and poorer performances in cognitive tasks in RRMS (relapsing-remitting multiple sclerosis) patients, suggesting a possible role of these factors in cognitive impairment in multiple sclerosis [31]. Our study also founded low BDNF and high IL-6. Protas et al. investigated the levels of cerebrospinal fluid (CSF) cytokines during chemotherapy of ALL. Examination of 12 ALL child (6 boys and 6 girls) patients evidenced significant increases in interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) after induction treatment and significant increases in IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and MCP-1 levels during the consolidation phase, as compared to their values at the time of diagnosis [17]. There were no significant differences

in CSF IL-6, TNF- α and MCP-1 concentrations after therapy. Their data suggest that standard ALL treatment may cause a subclinical inflammation and neurotoxicity.

Our findings have some implications. The lower BDNF levels in ALL patients can be consequence of the disease and so the children are at risk for cognitive deficits, even before treatment. Otherwise, after treatment BDNF levels returned to levels similar to controls.

In the other hand, it seems that IT MTX did not cause changes in BDNF levels in this study. It is necessary further studies to corroborate these findings.

This work has some limitations, as the small sample and the short time of observations. But, the strength of our study is that we compare data in different stages of treatment, which adds a lot of validity to the study. Additionally, ALL treatment protocols include steroids, that can also contribute to changes in BDNF and impaired cognition. Another limitation of this study was that it did not consider the influence of physical activity on BDNF levels in ALL patients and normal controls.

Although there are many studies on the effects on cognition in adult survivors of pediatric cancers, few studies have examined the immediate effects of therapy in children with cancer while they undergo treatment.

We wanted to know which mechanisms cause neurocognitive late effects. We thought that IT MTX could reduce BDNF and that reduced levels could be associated with cognitive deficits, but, in this study, this was not confirmed.

Future studies are required to help to determine the significance of the changes of BDNF and inflammatory markers in ALL.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the biochemical assays.

We would like to thank Daniela Osorio Alves for critical reading of the manuscript and helpful comments.

This study was supported by FIPE (*Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos*)

AUTHORSHIP

Contribution: MMOA, PRAC, LED, CSG, FPK, CTLD, MIAW designed the study

MMOA, CSG, LED, MBM, FPK, CTLD, MIAW interpreted data and wrote the paper

LS and PF performed biochemical assays

ALBG performed cognitive tests oriented by VZO

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

1. Buizer AI, de Sonnevile LM, Veerman AJ. Effects of chemotherapy on neurocognitive function in children with acute lymphoblastic leukemia: a critical review of the literature. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Apr;52(4):447-54.
2. Peterson CC, Johnson CE, Ramirez LY, et al. A meta-analysis of the neuropsychological sequelae of chemotherapy-only treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Jul;51(1):99-104.
3. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, et al. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2002 nov;80(11):1076-84.
4. Cole PD, Kamen BA. Delayed neurotoxicity associated with therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006;12(3):174-83.
5. Seigers R, Schagen SB, Coppens CM, et al. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. *Behav Brain Res*. 2009 Aug 12;201(2):279-84.
6. Li Y, Vijayanathan V, Gulinello ME, et al. Systemic methotrexate induces spatial memory deficits and depletes cerebrospinal fluid folate in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 Jan;94(3):454-63.
7. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci*. 2002 Jan 70(7):735-44.
8. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001 Aug 15;50(4):260-5.
9. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell*. 2003;112(2):257-69.
10. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004 Apr;19(7):1699-707.
11. Kapczinski F, Frey BN, Andreazza AC, et al. Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008 Sep;30(3):243-5.

12. Singh V, Ghalaut PS, Kharb S, et al. Plasma concentrations of lipid peroxidation products in children with acute leukaemia. *Indian J Med Sci.* 2001 Apr;55(4):215-7.
13. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005 Jan;6(3):187-95.
14. Kennedy DD, Ladas EJ, Rheingold SR, et al. Antioxidant status decreases in children with acute lymphoblastic leukemia during the first six months of chemotherapy treatment. *Pediatr Blood Cancer.* 2005 Apr;44(4):378-85.
15. Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, et al. Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Oct;53(4):551-6.
16. Stenzel SL, Krull KR, Hockenberry M, et al. Oxidative stress and neurobehavioral problems in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Mar;32(2):113-8.
17. Protas PT, Muszynska-Roslan K, Holownia A, et al. Cerebrospinal fluid oxidative stress during chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia in children. *Pediatr Hematol Oncol.* 2010 May;27(4):306-13.
18. El-Sabagh ME, Ramadan KS, El-slam IMA, et al. Antioxidants Status in Acute Lymphoblastic Leukemic Patients. *American Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2011;1(1):1-6.
19. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14467-72.
20. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008 April 15, 2008;111(8):3941-67.
21. Larson SJ, Dunn AJ. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 2001 Dec;15(4):371-87.
22. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Lester Packer ANG, editor. *Methods in Enzymology*: Academic Press; 1990. p. 464-78.
23. Dorfman A. Chemotherapy Effect on Child Cognition Quick, Significant. *Oncology News.* 2012 July;7(7).
24. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem.* 2008 May;41(7-8):511-8.

25. Mazor D, Abucoider A, Meyerstein N, et al. Antioxidant status in pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) and solid tumors: the impact of oxidative stress. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Nov;51(5):613-5.
26. Al Tonbary Y, Hasan SA, Zaki M, et al. Impact of anti-oxidant status and apoptosis on the induction phase of chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2011;16(1):14-9.
27. Sarmiento-Ribeiro AB, Proenca MT, Sousa I, et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leuk Res*. 2012 Aug;36(8):1041-8.
28. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett*. 2008 Mar 15;433(3):270-3.
29. Campbell LK, Scaduto M, Sharp W, et al. A meta-analysis of the neurocognitive sequelae of treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Jul;49(1):65-73.
30. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 May;12(4):447-58.
31. Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, et al. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res*. 2010 Apr;88(5):1106-12.

ANEXO B – ARTIGO 2 – EFFECTS OF INTRATHECAL METHOTREXATE ON SERUM BDNF (BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) LEVELS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)

Artigo Submetido ao Pediatric Blood & Cancer

EFFECTS OF INTRATHECAL METHOTREXATE ON SERUM BDNF (BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) LEVELS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL)

Marta Maria Osório Alves; Paulo Roberto Antonacci Carvalho; Liane Esteves Daudt; Mariana Bohns Michalowski; Cristina Toscani Leal Dornelles; Viviane Ziebell de Oliveira; Ana Lucia Barros Gonçalves; Laura Stertz; Paula Ferrari; Clarissa Severino Gama; Flávio Pereira Kapzinski

Marta Maria Osorio Alves, MD- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

Paulo Roberto Antonacci Carvalho, PhD- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

Liane Esteves Daudt, PhD -- Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil

Mariana Bohns Michalowski, PhD Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil.

Cristina Toscani Leal Dornelles, PhD- Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Maria Inês de Albuquerque Wilasco-MD-Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (LEHG)

Viviane Ziebell de Oliveira- Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brasil.

Ana Lucia Barros Gonçalves- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Laura Stertz - Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil).

Pâmela Ferrari- Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Clarissa S. Gama- Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Flávio P. Kapzinski- Laboratory of Molecular Psychiatry, INCT for Translational Medicine (CNPq), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Adress for correspondence:

M.M.O.Alves.
Hospital de Clínicas de Porto alegre.
Ramiro Barcelos 2350, Largo Eduardo Zacaro Faraco
CEP 90035-903,
Pediatric Service, 10th floor.
E-mail: osoriodor@yahoo.com.br.

ABSTRACT

BACKGROUND: Survival rates for pediatric acute lymphoblastic leukemia are now nearly 90%. However, this fact has been associated with an increase of treatment related toxicity. Cognitive deficits are among the sequelae affecting survivors, even if their treatment included no cranial radiation. Specific mechanisms are not clearly understood, but methotrexate could be involved. Brain-derived neurotrophic factor is essential to cognitive functions and memory consolidation and reduced levels of this neurotrophin has been associated with cognitive deficits, among other conditions. **OBJECTIVE:** To determine if intrathecal methotrexate was associated with changes in BDNF levels in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **METHODS:** Blood samples (64) are collected from 8 pediatric acute lymphoblastic leukemia and 40 controls, during the treatment with a BFM 2002-based protocol. We measured serum concentrations of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances before and 72 hours after each intrathecal methotrexate administration. **RESULTS:** brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric reactive substances levels before and 72 hours after intrathecal methotrexate showed no significant differences. At the time of diagnosis, brain-derived neurotrophic factor levels were lower in patients than in controls ($p < 0,001$), but such differences disappeared when the disease was under control. **CONCLUSION:** the results of this study suggests that there are no significant changes in brain- derived neurotrophic factor and thiobarbituric reactive substances levels after intrathecal methotrexate. Nevertheless, it also suggests that there are decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in acute lymphoblastic leukemia at the time of diagnosis.

Keywords: leukemia, oxidative stress, brain- derived neurotrophic factor.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy diagnosed in children, representing nearly one third of all pediatric cancers. Some decades ago, diagnosis of ALL was almost ever fatal, but improvements in diagnosis and treatment had allowed overall cure rates to reach 90% in children [1].

This fact is leading to a growing number of survivors at risk for adverse effects, as the treatment consist of an aggressive and continuous chemotherapy protocol, and many of the components are associated with free radical production.

Among these adverse effects are neurocognitive deficits, including executive function, verbal and visuospatial memory and attention, which have been reported in a significant proportion of survivors, including those treated only with chemotherapy without cranial radiation [2].

One component of the protocol, methotrexate, is necessary to prevent relapse in central nervous system, but it can contribute to cognitive dysfunction [3]. The pathophysiology of MTX-induced neurotoxicity is not fully understood. Seigers et al. (2009) suggests that methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits [4].

Memory acquisition is associated with an increase in BDNF expression and TrkB receptor activation in hippocampus and temporal cortex. It was demonstrated that the neuronal plasticity mediated by BDNF is essential for cognitive functions and for the consolidation of memory [5]. And reduced levels of BDNF in human brain are associated with cognitive deficits, impaired performance of memory and depression [6-7].

This study investigates a possible change in BDNF levels after intrathecal methotrexate, and also evaluates cognitive functions before and after 6 months of treatment of ALL.

OBJECTIVE

To determine if intratecal methotrexate was associated with changes in BDNF levels in children and adolescents with ALL. To evaluate cognitive function at the time of diagnosis and 6 months after starting treatment.

METHOD

This study was conducted at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, between November 2009 and November 2011. Sixty two blood samples are obtained from pediatric common ALL patients, 2 to 13 years- old and 40 samples of controls matched for age and gender.

We measured BDNF and TBARS, before and 72 hours after intrathecal methotrexate.

A psychologist performed cognitive tests (WISC III or WIPPI-R) at the time of diagnosis and 6 months later. WISC III (*Wechsler Intelligence Scale*) for children and adolescents from 6 years and 11 months–old to 16 years and 11 months-old, or WPPSI-R (*Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-Revised*) for children from 2 years and 6 months-old to 7 years and 3 months-old.

Biochemical assays

Blood samples were withdrawn from each subject by venipuncture into a free anticoagulant vacuum tube. After gentle mixing were allowed to clot at room temperature, and then centrifuged at 4000 g for 10 minutes. Then serum was collected and stored at -80° C until assayed.

BDNF assay

BDNF serum levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instruction (Chemicon, Temecula, CA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:75 in sample diluents and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer, added monoclonal anti-BDNF rabbit antibody (diluted 1:1000 with sample diluents), and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated (diluted 1:1000) for 1 h at room temperature was carried out. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set in 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density (OD) and BDNF

concentration. The assay sensitivity for BDNF was 7.8 pg/mL (range 7.8–500 pg/ml). The results are expressed in pg/mL.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay

The levels of lipid peroxidation were measured by the method of TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) using the TBARS assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor), according to the manufacturer's instructions. In this method, the quantification of lipid peroxidation products is performed by plasma formation of substances reacting to thiobarbituric acid, which is the analysis of the final products of lipid peroxidation (lipid peroxides, malondialdehyde and other aldehydes of low molecular weight) that react with 2-thiobarbituric acid (TBA) to form Schiff bases. These complexes exhibit color and their concentration can be determined spectrophotometrically at 535 nm. The results are expressed in μM of MDA.

RESULTS

Sample characteristics are shown in Table I.

TABLE I. Characteristics of patients and controls

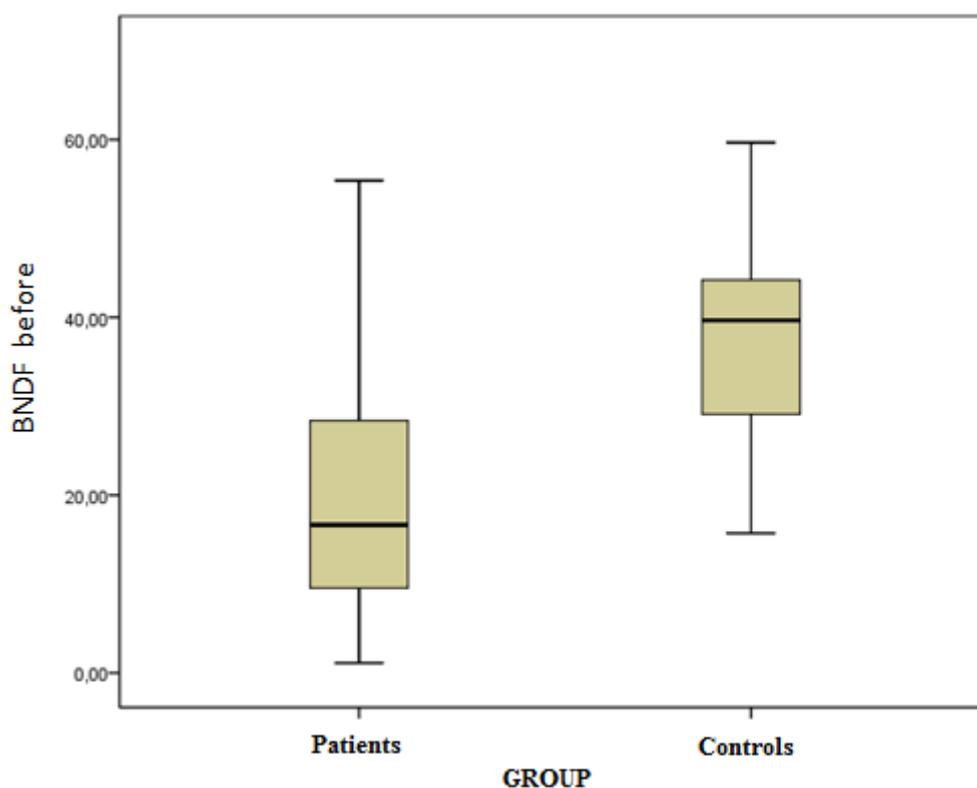
Characteristics	Patients	Controls
Age	2-13 years	4-16 years
Gender		
Boys	4 (50%)	19 (47.5 %)
Girls	4 (50%)	19 (52.5 %)

OBS: all patients had a diagnosis of common LLA without CNS disease. All were treated with a BFM 2002 based protocol.

At the time of diagnosis, brain-derived neurotrophic factor levels were lower in patients than in controls ($p < 0.001$) (Table II and Fig.1).

TABLE II. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in patients and controls

Variables	Patients	Controls	<i>P</i> value
BDNF	n = 32	n = 40	
pg/mL	mean = 18.94±12.04 CI (95%) = 16.47-21.40 median = 13.69	mean = 37.49±11.84 CI (95%) = 33.70-41.28 median = 39.67	<0.001

**Fig.1.** BDNF (pg/ml) in patients and in controls at time of diagnosis

This study failed to demonstrate significant changes in BDNF and TBARS serum levels in patients, before and after 72h each intrathecal MTX application (Table III).

TABLE III. Serum BDNF and TBARS before and after IT MTX (n=31)

Variables	median	CI (95%)	P value
BDNF			
before	14.42	9.31-28.59	
after	13.11	8.31-29.89	0.652
TBARS			
before	7.19	5.50-12.00	
after	9.00	6.71-12.50	0.992

BDNF - brain derived neurotrophic factor; TBARS - thiobarbituric acid reactive substances.

Cognitive tests results

Total IQ, which represents a child's general cognitive ability, remained mean or higher. Subtests for memory showed improvement in the second application (except for one patient), even though subtests for comprehension showed worse results for all.

DISCUSSION

This is the first published study with BDNF in ALL, comparing levels before and after. Interestingly, in this work, pediatric ALL patients, at the diagnosis, showed lower BDNF levels compared to controls ($p < 0,001$). On the other hand, when we compared BDNF and TBARS levels in patients, before and after 72h each intrathecal MTX application, no significant changes were seen.

Psychological tests showed preserved total intelligence quotient (IQ) which represents a child's general cognitive ability. Subtests for memory showed improvement in the second application (except for one patient), even though subtests for comprehension. Analyzing the results, there is some evidence that ALL is associated with lower levels of BDNF when compared to controls. But, this difference disappeared when the disease is under control, suggesting treatment is effective in increasing BDNF serum levels.

On the other hand, the fact that BDNF and TBARS did not change, before and after IT MTX, could suggest that this is not the mechanism of MTX toxicity, or changes do not occur in 72 hours, but in another time.

Differently, Dorfman [8] had concluded that intravenous or intrathecal MTX could cause measurable decline in learning and memory 24 to 72 hours after the application in children with leukemia. She studied 19 children and adolescents—11 boys and 8 girls. On Rey Auditory Verbal Learning Test, which measures verbal learning and memory, there was a statistically significant decrease in scores.

Our hypothesis that IT MTX could reduce BDNF, and by such mechanism, cause cognitive deficits was not confirmed.

BDNF is related to cell proliferation. The work of Li et al. [9] suggests that TRKs (tropomyosin-related kinases) play an important role in leukemogenesis and its activation is an important survival factor for leukemic cells from both patients and mice. The authors demonstrated that primary acute leukemia cells frequently express TRK receptors and BDNF on protein levels. Curiously, in this study, we found reduced BDNF serum levels in ALL.

This study has positive points: we have found reduced levels of BDNF in ALL. Furthermore, we found that IT MTX did not reduce BDNF. There is a consistent data suggesting that BDNF levels normalize following treatment for ALL, similar to data that has been described in psychiatric diseases.

Our findings have some implications. The lower BDNF levels found in ALL patients could be associated with the disease and not to the treatment, and so the children would be at risk for cognitive deficits, even before treatment. Nevertheless, after treatment, BDNF levels returned to levels similar to controls.

In the other hand, it seems that IT MTX did not cause changes in BDNF levels in this study and it is necessary further studies to corroborate these findings.

Although there are many studies on the effects on cognition in adult survivors of pediatric cancers, few studies have examined the immediate effects of therapy in children with cancer while they undergo treatment, and what is known about it has been learned largely from adult populations.

Finally, this work has some limitations, as the small sample and the short time of observations. But, the strength of our study is that we compare data in different stages of treatment, which adds a lot of validity to the study.

CONCLUSION

In this study, we could not find differences in BDNF levels before and after treatment with intrathecal MTX. But we were able to demonstrate significant reduced BDNF levels in children with ALL at the time of diagnosis.

Children with ALL would be at risk for cognitive deficit even before MTX, considering that BDNF were reduced at diagnosis compared to controls.

ACKNOWLEDGEMENTS

Laboratory molecular psychiatry

This study was supported by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos)

AUTHORSHIP

Contribution: MMOA, PRAC, LED, CSG, FPK, CTLD, MIAW designed the study

MMOA, CSG, LED, MBM, FPK, CTLD, MIAW interpreted data and wrote the paper

LS and PF performed biochemical assays

ALBG performed cognitive tests oriented by VZO

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

1. Ribera JM, Oriol A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Oct;23(5):1033-42,.
2. Campbell LK, Scaduto M, Sharp W, et al. A meta-analysis of the neurocognitive sequelae of treatment for childhood acute lymphocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Jul;49(1):65-73.
3. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Biol Res Nurs.* 2005 Jan;6(3):187-95.
4. Seigers R, Schagen SB, Coppens CM, et al. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. *Behav Brain Res.* 2009 Aug 12;201(2):279-84.
5. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 2002 Jan 70(7):735-44.
6. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell.* 2003;112(2):257-69.
7. Chen B, Dowlatsahi D, MacQueen GM, et al. Increased hippocampal bdnf immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry.* 2001;50(4):260-5.
8. Dorfman A. Chemotherapy Effect on Child Cognition Quick, Significant. *Oncology News.* 2012 July;7(7).
9. Li Z, Beutel G, Rhein M, et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood.* 2009 Feb 26;113(9):2028-37.