

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

**AVALIAÇÃO DO DANO DE DNA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA DURANTE A TERAPIA DE INDUÇÃO**

RAFAEL PEREIRA DOS SANTOS

Porto Alegre

Novembro de 2016

RAFAEL PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO DANO DE DNA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA DURANTE A TERAPIA DE INDUÇÃO**

**Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre**

Orientador: Prof. Rafael Roesler, PhD

Porto Alegre

Novembro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Rafael

AVALIAÇÃO DO DANO DE DNA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA DURANTE A TERAPIA DE
INDUÇÃO / Rafael Santos. -- 2016.
79 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2016.

1. Leucemia Linfoide Aguda. 2. NER (Reparo por
Excisão de Nucleotídeos). 3. Ensaio Cometa Alcalino.
I. Roesler, Rafael, orient. II. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTE FINANCIADORA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Câncer e Neurobiologia no Centro de Pesquisas Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Instituto do Câncer Infantil (ICI) e do programa de fomento à pesquisa do Ministério da Saúde (MS)/CNPq/FAPERGS PPSUS, número de concessão 1245-2551/13-0023.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram a concluir este trabalho, mas primeiramente eu quero agradecer a Deus, pois reconheço que sem Ele eu jamais chegaria até aqui, por isso declaro minha gratidão pela sua Fidelidade, e dedico este trabalho ao meu amado Jesus, tributando a Ele toda a honra, glória e louvor!

Bem, das muitas pessoas que tenho a agradecer, eu agradeço ao professor Rafael Roesler, pela pessoa fantástica e profissional extraordinário que és. Rafa, obrigado pela oportunidade, pelo exemplo e pelos ensinamentos.

Agradeço à Caroline Brunetto. Carol, tu és minha mentora. Jamais esquecerei dos momentos difíceis que passei e tu me ajudou, me apoiou, me incentivou e, acima de tudo, não desistiu de mim. Obrigado pela orientação neste trabalho e pela paciência em todos estes anos de trabalho juntos. Por TUDO, eu te agradeço!

Obrigado aos colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia. Parabéns para essa equipe e um agradecimento especial às pessoas que me ajudaram na conclusão deste trabalho. Gratidão à Julia, Nathi, Karol, Dani, Mirela e Mari. Vocês me ajudaram nos experimentos, no artigo, na dissertação, no projeto, nas conversas científicas (ou nem tanto...). Muito obrigado gurias!

Obrigado a família e amigos que sempre me incentivaram.

Agradeço aos meus pais, pois eles me incentivaram a estudar e lutar pelos meus sonhos. Acreditaram em mim e tiveram paciência com minhas limitações, além de me ajudar em tudo e um pouco mais nos momentos de dificuldades. Pai e mãe, amo vocês e muito obrigado! Deus lhes abençoe!

Gabi meu amor, muito obrigado! Neste mês vamos completar 9 anos de casamento, e em todos esses anos (graduação, mestrado...) você sempre compreendeu e suportou minha ausência, permanecendo sempre ao meu lado, e isso me deu condição para realizar esse sonho. Obrigado pela ajudadora fiel que és. Sou grato a Deus pela tua vida e obrigado por me ajudar a construir uma família linda com nossas princesas Rafaela e Helena. Vocês são as flores do meu jardim!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Leucemia Linfoide Aguda (LLA)	12
1.1.1 Definição e classificação	12
1.1.2 Características moleculares	14
1.1.3 Aspectos clínicos	16
1.1.4 Tratamento	17
1.1.5 Recidiva da doença	20
1.2 Dano e reparo do DNA	21
1.2.1 Reparo por Excisão de Nucleotídeos	24
1.2.2 Vias do NER	25
<i>1.2.2.1 Reconhecimento do dano ao DNA</i>	26
<i>1.2.2.2 Desenrolamento das hélices do DNA</i>	28
<i>1.2.2.3 Remoção de oligonucleotídeos danificados mediada por endonucleases</i>	28
<i>1.2.2.4 Síntese do reparo do DNA</i>	29
1.3 Justificativa	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. ARTIGO	32
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÕES	68
6. REFERÊNCIAS	70
7. ANEXOS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento de célula sanguínea. Linhagem de células linfoides e mieloides.

Figura 2. Variantes associados com a susceptibilidade à LLA e fatores envolvidos no desenvolvimento da LLA.

Figura 3. Via de reparo por excisão de nucleotídeos – NER.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL1: gene ABL1 (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*).

BCR: *breakpoint cluster region protein*.

BER: Reparo por Excisão de Bases (do inglês *Base Excision Repair*).

CPDs: *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*.

CREBBP: proteína de ligação ao CREB (*CREB-binding protein; cAMP-response element-binding protein (CREB)*).

CRLF2: *Cytokine receptor-like factor 2*.

CS: Síndrome de Cockayne (do inglês *Cockayne syndrome*).

CSA: *Cockayne syndrome complementation group A*.

CSB: *Cockayne syndrome complementation group B*.

DDR: resposta a danos no DNA (do inglês *DNA damage response*).

DHFR : di-hidrofolato redutase.

DRM: Doença Residual Mínima.

DSBs: quebras de fita dupla (do inglês *double-strand breaks*).

ECA: Ensaio Cometa Alcalino.

ERCC1: *Excision Repair Cross-Complementation Group 1*.

ETV6: fator de transcrição ETV6.

FCS: Fluido cerebrospinal.

FLT3: Tirosino-quinase 3 Fms-relacionado.

GG-NER: NER genoma global.

HDACi: inibidor de histona deacetilases (do inglês *Histone deacetylase inhibitor*).

HOX11: gene HOX11, da família dos genes homeóticos (reguladores).

HR: recombinação homóloga (do inglês *Homologous Recombination*).

ID: Índice de Dano.

IKZF1: *Ikaros family zinc finger protein 1*.

JAK2: *Janus kinase 2*.

LLA: Leucemia Linfoide Aguda.

LLC: Leucemia Linfoide Crônica.

LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

LMC: Leucemia Mieloide Crônica.

LMO2: gene LMO2 (*LIM domain only 2*).

LYL1: oncoproteína LYL-1 (*Lymphoblastic leukemia-derived sequence 1*).

MLL: Leucemia de linhagem mista (*mixed-lineage leukemia 1*).

MYC: oncogene MYC (*myelocytomatosis oncogene*).

NER: reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês *Nucleotide Excision Repair*).

NHEJ: *nonhomologous end-joining*.

PARP: Poly(ADP-ribose).

PAX5: *Paired box protein Pax-5*.

PBX-1: *Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1*.

Pgp: glicoproteína-P.

Ph⁺: cromossomo Phyladelphia positivo.

RFC: Fator de Replicação C (do inglês *Replication Factor C*).

RPA: Proteína de Replicação A (do inglês *replication protein A*).

RUNX1: *Runt-related transcription factor 1*.

TAL1: oncoproteína 1 de leucemia linfoide aguda de células T (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*).

TC-NER: NER acoplado à transcrição.

TCF3: fator de transcrição 3 (do inglês *Transcription factor 3*).

TFIIH: fator de transcrição humano II (do inglês *Transcription factor II Human*).

TMO : transplante de medula óssea.

UV: raio ultravioleta.

XP: *Xeroderma pigmentosum*.

XPA: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A*.

XPB: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group B*.

XPC: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C*.

XPD: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group D*.

XPF: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group F*.

XPG: *Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group G*.

RESUMO

O câncer é a primeira causa de mortes por doença, após 1 ano de idade, até o final da adolescência, excetuando aquelas relacionadas aos acidentes e à violência. A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) afeta células linfóides e agrava-se rapidamente. São os tumores mais frequentes na infância e representam um terço de todas as neoplasias malignas nesta faixa etária. Em média, a taxa de cura excede 70%, todavia, apesar dos avanços das últimas décadas, os índices de crianças que apresentam recidiva da doença continua significativo. Danos endógenos ao DNA ocorrem numa frequência altíssima, além dos danos causados por terapias antitumorais. Alteração no reparo ao dano do DNA pode induzir mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico, resultando em aumento do reparo de lesões do DNA. Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é a via de reparo de DNA mais versátil e flexível nas células. Seus componentes estão sendo estudados como biomarcadores de prognóstico e terapias-alvo. No entanto, alguns relatórios têm abordado danos de DNA em Leucemia Linfóide Aguda (LLA) pediátrica. Neste estudo, realizamos um estudo de acompanhamento observacional em pacientes pediátricos para avaliar os danos do DNA pelo Ensaio Cometa Alcalino e expressão gênica da via de NER durante a indução da quimioterapia. Amostras de medula óssea (MO) ao diagnóstico, dia 15 (D15) e 30 (D30) do tratamento foram coletadas de 28 pacientes com LLA. Não houve aumento no índice de dano. No entanto, houve uma redução de células com baixo danos na comparação do D35 com o diagnóstico. Este resultado se confirmou em pacientes que apresentaram doença residual mínima positiva. A via de NER permaneceu constante, no entanto, em um único paciente, foi observada uma diminuição significativa da expressão dos genes, talvez devido ao silenciamento ou a regulação negativa das vias de reparo. Níveis de danos e reparação do DNA podem influenciar o resultado clínico, estar envolvidos na resistência aos fármacos e potencializar o risco de recidiva. Este é o primeiro estudo que avalia o dano ao DNA em amostras de MO de pacientes pediátricos com LLA. Apesar do pequeno número de pacientes alocados para o estudo, a partir dos achados é possível concluir que complexos de reparo merecem ser investigados a curto e a longo prazo. Acompanhamento dos resultados do paciente vai ajudar a elucidar a implicação dos nossos achados em taxas de cura e de recidiva.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda; dano ao DNA; Ensaio Cometa Alcalino; Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER); reparo ao DNA.

ABSTRACT

Cancer is the leading cause of death by disease after 1 year old until the end of adolescence, except those related to accidents and violence. Acute Lymphoid Leukemia (ALL) affects lymphoid cells and worsens quickly. They are the most frequent tumors in childhood and account for a third of all malignancies in this age group. On average, the cure rate exceeds 70%, however, despite the progress of recent decades, rates of children with disease recurrence remains significant. Endogenous DNA damage occurs at a very high frequency, in addition to the damage caused by anti-tumor therapies. Change in the repair of DNA damage can induce resistance mechanisms to chemotherapy, resulting in increased repair of DNA lesions. Nucleotide Excision Repair (NER) pathway is the more versatile and flexible DNA repair in cells. Its components are being studied as prognostic biomarkers and targeted therapies. However, there are some reports of DNA damage in pediatric Acute Lymphoid Leukemia (ALL). In this study, we conducted an observational follow-up study in pediatric patients to assess DNA damage by alkaline comet assay and gene expression of NER pathway during induction chemotherapy. Bone marrow (BM) samples at diagnosis, 15th (D15) and 30th (D30) of treatment were collected from 28 patients with ALL. There was no increase in damage index. However, there was a reduction of cells with low damage in comparison to the D35 diagnosis. This result was confirmed in patients with positive minimal residual disease. The NER pathway remained constant, however, in one patient, a significant decrease of gene expression was observed perhaps due to the silencing or down-regulation of repair pathways. Damage levels and DNA repair can influence the clinical result and may be involved in drug resistance and enhance the risk of recurrence. This is the first study to assess DNA damage in BM samples of pediatric patients with ALL. Despite the small number of patients allocated to the study, from the findings we conclude that repair complex deserves to be investigated in the short and long term. Monitoring patient's outcomes will help to access the implication of our findings in cure and relapse rates.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia; DNA damage; Comet assay; Nucleotide Excision Repair (NER); DNA repair.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

1.1.1 Definição e classificação

O termo leucemia deriva do grego e significa "sangue branco". A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais (INCA 2016). Com base em referências dos registros de base populacional, são estimados mais de 9000 casos novos de câncer infanto-juvenil, no Brasil, por ano. Assim como em países desenvolvidos, no Brasil, o câncer já representa a segunda causa de mortalidade proporcional entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, para todas as regiões. Como a primeira causa são aquelas relacionadas aos acidentes e à violência, podemos dizer que o câncer é a primeira causa de mortes por doença, após 1 ano de idade, até o final da adolescência (SOBOPE 2016).

As leucemias podem ser agrupadas com base em quão rapidamente a doença evolui e torna-se grave. Sob esse aspecto, a doença pode ser do tipo crônica (que geralmente agrava-se lentamente), ou aguda (que geralmente agrava-se rapidamente):

- Crônica: no início da doença, as células leucêmicas ainda conseguem exercer funções similares às funções dos glóbulos brancos normais. Médicos geralmente descobrem a doença durante exame de sangue de rotina. Lentamente, a leucemia crônica se agrava. À medida que o número de células leucêmicas aumenta, aparecem inchaço nos linfonodos (ínguas) ou infecções. Quando surgem, os sintomas são brandos, agravando-se gradualmente.

- Aguda: as células leucêmicas não conseguem exercer praticamente nenhuma atividade das células sanguíneas normais. O número de células leucêmicas cresce rapidamente e a doença agrava-se num curto intervalo de tempo.

As leucemias também podem ser agrupadas baseando-se nos tipos de glóbulos brancos que elas afetam: linfóides ou mielóides. Combinando as duas classificações, existem quatro tipos mais comuns de leucemia:

- Leucemia linfóide crônica (LLC): afeta células linfóides e se desenvolve vagarosamente. A maioria das pessoas diagnosticadas com esse tipo da doença tem mais de 55 anos. Raramente afeta crianças.

- Leucemia mielóide crônica (LMC): afeta células mielóides e se desenvolve vagarosamente, a princípio. Acomete principalmente adultos.

- Leucemia linfóide aguda (LLA): afeta células linfóides e agrava-se rapidamente. É o tipo mais comum em crianças, mas também ocorre em adultos.

- Leucemia mielóide aguda (LMA): afeta as células mielóides e avança rapidamente. Ocorre tanto em adultos como em crianças.

As leucemias linfóides agudas (LLAs), também denominadas leucemia linfocítica aguda ou leucemia linfoblástica aguda, são os tumores mais frequentes na infância e representam um terço de todas as neoplasias malignas nesta faixa etária (Belson et al., 2007; Bhojwani et al., 2015; Arora e Arora, 2016). Em média, a taxa de cura excede 70%, todavia, apesar dos avanços das últimas décadas, os índices de crianças que apresentam recidiva da doença continua significativo (Pui, 2000; Pui et al., 2014).

A transformação de células hematopoiéticas em leucêmicas requer: alteração no controle de proliferação, bloqueio da diferenciação, resistência a mediadores de apoptose e aumento da capacidade de auto-renovação (Pui et al., 2004). A teoria mais aceita do surgimento de leucemia é: uma única célula hematopoiética sofre mutação, tem a capacidade de auto-renovação, dá origem a outras células malignas e é pouco diferenciada. Apesar das células leucêmicas se originarem, às vezes, de células tronco, é mais provável que isso ocorra com uma célula mais diferenciada

que adquiriu propriedades de células tronco (Pui et al., 1989; Gale e Wainscoat, 1993).

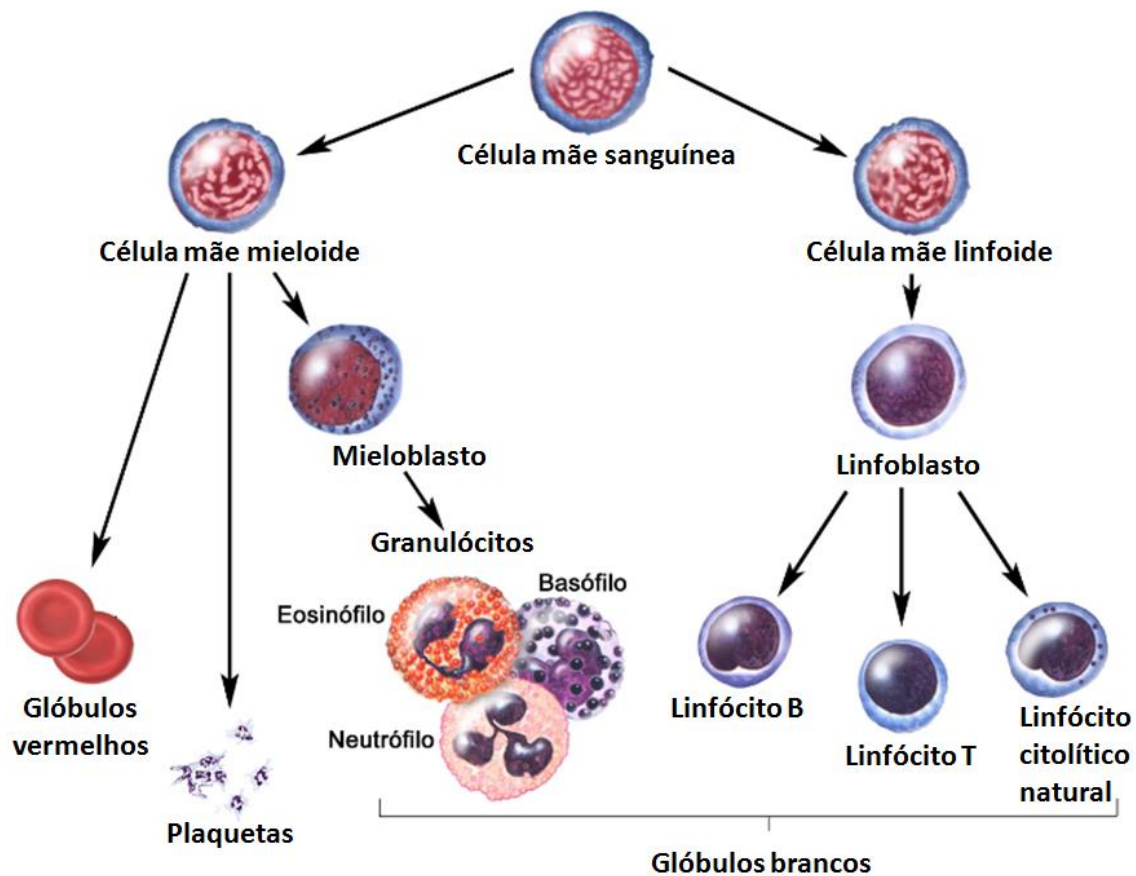


Figura 1: Desenvolvimento de célula sanguínea. Linhagem de células linfoides e mieloides. Adaptado de <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>.

1.1.2 Características moleculares

A caracterização molecular de alterações genéticas em células leucêmicas contribui grandemente no entendimento da patogênese desta doença (Pui et al., 2008). Processos oncogênicos ordinários incluem expressão anormal das oncoproteínas (MYC, TAL1, LYL1, LMO2, HOX11) e translocações que incluem genes que ativam cinases (BCR-ABL1) ou alteram fatores de transcrição (ETV6-RUNX1, TCF3-PBX-1, MLL). Entretanto, é preciso várias mutações para ocorrer uma leucemia e contribuir para o desenvolvimento de resistência a fármacos. Outras

mutações em LLA incluem super-expressão de FLT3 em leucemia, alterações no PAX5 no precursor de células B, deleção no IKZF1 (codifica o fator de transcrição linfóide Ikaros) em LLA Ph⁺; e mutações JAK e CRLF2 (rearranjos) em LLA alto risco, conforme Mullighan e colaboradores (2011) verificaram em diversos estudos. Alterações no CRLF2 estão associadas com ativação de mutações JAK, ativando JAK-STAT que podem favorecer mutações na leucemogênese. Pacientes com deleções ou mutações em sequência no gene CREBBP sofrem danos em histona desacetilases e na regulação transcricional, sugerindo que esse mecanismo pode conferir resistência a fármacos e dificultar uso de alguns fármacos como inibidores de histona deacetilases (HDACi) (Mullighan et al., 2011).

Existem estudos genéticos que demonstram a possibilidade de genes envolvidos no surgimento da leucemia ainda no útero (Greaves & Wiemels, 2003). Fetos estão mais suscetíveis a leucemias com rearranjo MLL quando da exposição a vários agentes, especialmente inibidores da topoisomerase II (Pui & Relling, 2000; Biondi et al., 2000); isso é acentuado pela reduzida capacidade dos fetos em detoxificar os diversos agentes (fármacos, alimentos e outras substâncias), aumentando a suscetibilidade à LLA.

Células leucêmicas se dividem mais lentamente e despendem um tempo maior para sintetizar DNA, quando comparadas a outros precursores hematopoiéticos. Apesar desta aparente desfavorável propriedade de crescimento, as células leucêmicas se acumulam e competem com as células hematopoiéticas normais nos pacientes. As principais consequências patofisiológicas das leucemias são anemia, infecções e sangramento. Isso é devido à falha na hematopoiese normal. As células leucêmicas podem se infiltrar nos órgãos causando alargamento e disfunção. Podem, também, originar-se no timo (LLA de células T.)

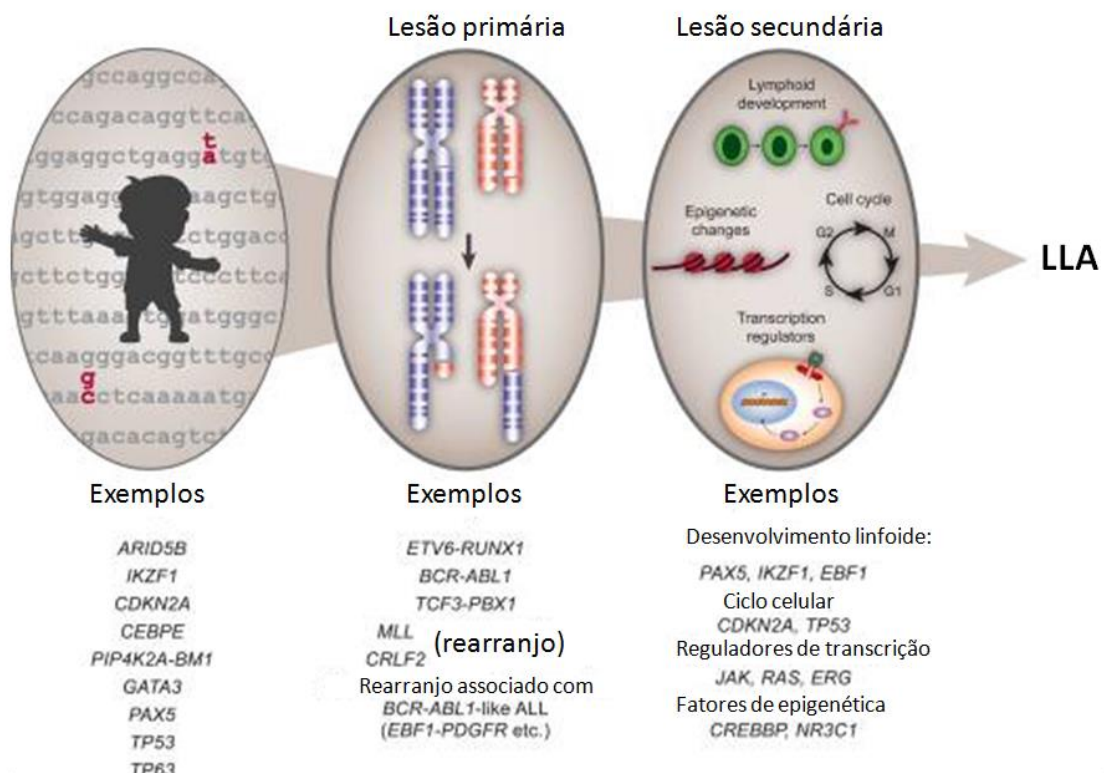


Figura 2. Variantes associados com a susceptibilidade à LLA e fatores envolvidos no desenvolvimento da LLA (adaptado de Bhojwani et al., 2015).

1.1.3 Aspectos clínicos

Leucemias apresentam sinais e sintomas variados. Febre ocorre comumente e é o achado mais comum (Kosmidis et al., 1980). Como os pacientes normalmente são neutropênicos e os neutrófilos não estão funcionando normalmente, os pacientes febris necessitam de antibioticoterapia até exclusão de infecção. É comum haver fadiga e letargia. Pouco mais de 1/3 dos pacientes apresenta dor óssea, artralgia, indisposição para caminhar, como consequência de infiltração leucêmica no periósteo. Crianças com acentuada dor óssea, mas contagem sanguínea normal, podem ter o diagnóstico atrasado (Jonsson et al., 1990). Uma pequena parte dos pacientes apresenta dor óssea severa, febre e alta concentração de lactato desidrogenase no soro, devido a necrose na medula óssea (Pui et al., 1985). Sinais menos frequentes são: dor de cabeça, vômito e problemas respiratórios. Em casos raros, LLA não apresenta nenhum sinal clínico nas primeiras avaliações. Exames

físicos podem verificar petéquias e equimoses na pele ou mucosas, além de sensibilidade óssea. Os órgãos mais comuns de envolvimento extramedular são o fígado, baço e linfonodos. Isso ocorre em 50% dos pacientes ao diagnóstico. Também pode ocorrer infiltração leucêmica na órbita, nervo óptico, retina, íris, córnea ou conjuntiva (Bunin et al., 1987; Lo Curto et al., 1994). Aproximadamente 25% dos pacientes masculinos tem leucemia testicular (Kim et al., 1986).

Devido à presença de linfoblastos na medula óssea, é comum ao diagnóstico: anemia, contagem leucocitária alterada, trombocitopenia. A maioria dos leucócitos no sangue são linfoblastos. Pacientes com trombocitopenia, em geral, não precisam realizar o aspirado de medula. Níveis de ácido úrico e de lactato desidrogenase no soro normalmente estão alterados. Disfunção hepática resultante de infiltração leucêmica afeta 10 – 20% dos pacientes (Pui e Dodge, 1987). Imunoglobulinas (principalmente IgA e IgM) estão diminuídas em 1/3 dos pacientes ao diagnóstico. 50 – 60% dos pacientes com LLA de células T apresentam aumento do mediastino. Fluido cefalorraquidiano (FCS) deve ser avaliado, pois cerca de 30% dos pacientes apresentam blastos leucêmicos. Leucemia do SNC é caracterizada quando há 5 leucócitos/uL do FCS.

1.1.4 Tratamento

Quanto ao tratamento, os fatores prognósticos devem ser levados em conta e podem ser de natureza clínica, laboratorial ou constitucional (genéticos). De modo geral em LLA, parâmetros clínicos e biológicos podem ser combinados para estabelecer três categorias de risco: baixo, padrão e alto.

Pacientes com:

- Baixo risco (45% dos casos): aproximadamente 80% chance de cura. Mesmo se tratados com quimioterápicos baseados em antimetabólicos.
- Risco padrão (50%): cerca de 80% chance de cura. Porém necessitam de uma terapia muito mais complexa e intensiva.

- Alto risco (5%): chance de cura acima de 50%, mesmo que utilizada uma terapia intensiva. Para esses pacientes o transplante de medula óssea (TMO) é frequentemente considerado.

A estratificação para os grupos de risco inicia-se com a determinação do imunofenótipo. É preciso reconhecer que LLA é uma doença heterogênea, o que direciona o tratamento para uma rotina risco-direcionada. Pacientes com LLA células B são tratados separadamente, necessitando quimioterapia intensiva de curta duração. Para todos os outros pacientes, a abordagem terapêutica difere levando em conta indução de remissão, seguida de terapia de intensificação ou consolidação para eliminar leucemia residual, erradicar ou prevenir leucemia no SNC e tratamento contínuo para garantir a duração da remissão. Há vários protocolos para tratamento: o mais comum divide os pacientes em 3 grupos de risco: baixo, padrão e alto.

O objetivo da terapia de indução de remissão é erradicar 99% das células leucêmicas e restaurar a hematopoiese normal. Esta fase normalmente inclui administração de glicocorticoide, vincristina e um terceiro agente (L-asparaginase, antraciclina ou ambos). A dose e duração do uso da asparaginase são fundamentais para o controle da leucemia. Devido à longa meia-vida no FCS, dexametasona tem sido substituída por prednisona ou prednisolona. Essa tem sido a preferência dos especialistas para crianças maiores de 10 anos. Outrossim, crianças mais jovens tem uma resposta melhor com dexametasona. As antraciclinas usadas para LLA são: daunorrubicina, doxorubicina e epirubicina. No entanto, daunorrubicina é a mais utilizada.

Na quimioterapia atual, 97 – 99% das crianças alcançam remissão completa. Dessas, 1% vai a óbito devido ao tratamento e sua toxicidade e outro 1% falha no tratamento devido a resistência. Durante o tratamento de indução de remissão, é importante o tratamento de suporte, visto que é comum ocorrer complicações metabólicas, aumentado risco de infecções devido à mielossupressão e mucosites; além de infecções fúngicas. Compostos azóis (cetoconazol, fluconazol, etc.) inibem enzimas do citocromo P450, aumentando a toxicidade dos agentes anti-leucêmicos, particularmente a vincristina. (Haidar & Jeha, 2011).

Com a restauração da hematopoiese normal, pacientes em remissão são candidatos à terapia de intensificação (consolidação). Não há consenso quanto ao melhor regime e sua duração. Basicamente, é repetido o tratamento inicial 3 meses após a remissão. Isso tem demonstrado grande benefício para os pacientes (Tubergen et al., 1993; Hutchinson et al., 2003).

Várias outras estratégias de tratamento foram investigadas, porém não demonstraram benefícios no tratamento (Lange et al., 2002; Seibel et al., 2008; Nachman et al., 2009). Os vários estudos clínicos com diferentes regimes de tratamento permitiram identificar componentes de certos subtipos de leucemia.

Fatores que influenciam o controle da leucemia no SNC: riscos para o paciente, blastos leucêmicos no FCS e o tipo de terapia sistêmica direcionada ao SNC. Pacientes t(1;19), TCF3-PBX1, LLA células T e células leucêmicas no FCS tem maiores chances de recaída no SNC e requerem uma terapia mais intensiva para o SNC. Para o controle da leucemia no SNC é utilizado altas doses de metotrexato. Irradiação craniana é a terapia direcionada para o SNC mais efetiva, porém, é limitada pelas elevadas taxas de neurotoxicidade e neoplasmas secundários (Pui et al., 2003; Hijjiya et al., 2007). Pacientes com recaída no SNC, que não receberam irradiação craniana como terapia inicial, tem uma alta taxa de remissão (Ritchey et al., 1999).

Crianças com LLA requerem tratamento contínuo de longo prazo. Tentativas de diminuir o tempo de tratamento resultaram em recidiva. Um estudo buscou intensificar a terapia, tendo uma duração de 1 ano, porém resultou em pior desfecho de sobrevida livre de progressão (Toyoda et al., 2000). No passado foram feitas tentativas de aumentar o tempo do tratamento para meninos, visto estes terem historicamente um pior prognóstico (Shuster et al., 1998; Pui et al., 1999).

O regime de tratamento contínuo padrão de LLA é mercaptopurina diária e metotrexato semanal. Pulsos de vincristina e glicocorticóide são adicionais ao regime de antimetabólitos, pois demonstrou melhora no desfecho do tratamento (Bleyer et al., 1991; Childhood ALL Collaborative Group 1996). Alguns subgrupos de pacientes com LLA tem respostas particular ao tratamento e requerem uma

consideração especial no manejo clínico. Rearranjos de MML no cromossomo 11q23 são as anormalidades genéticas mais comuns, ocorrendo em 70 – 80% desses pacientes (Biondi et al., 2000). E o subtipo mais prevalente dessa anomalia é o t(4;11) com fusão MLL-AF4. O aumento *in vitro* da sensibilidade de blastos leucêmicos, provenientes de células pediátricas à citarabina, sugere a adição de benefícios clínicos em regimes que contenham esse agente (Pieters et al., 1998).

A despeito dos avanços em quimioterapia e transplante, pacientes com LLA Ph⁺ continuam com prognóstico ruim. Pacientes mais velhos com contagem alta de leucócitos ou baixa resposta a terapia de indução-remissão tem desfecho sombrio (Aricò et al., 2010).

Com o uso do tratamento intensivo que inclui asparaginase e dexametasona, crianças com LLA de células T responderam igualmente ao tratamento à LLA células B, conforme alguns estudos (Taylor et al., 1996; Pui et al., 2009; Silverman et al., 2010).

1.1.5 Recidiva da doença

Aproximadamente 25 – 30% dos pacientes portadores de LLA apresentam recidiva da doença. O tratamento é complexo e individualizado. Consiste de 2 estratégias:

- Quimioterapia sistêmica: é intensiva e semelhante à recebida no início, mas com maior intensidade e também direcionada ao SNC.
- Transplante: TMO alogênico. É indicado quando as complicações de transplante diminuem e há risco elevado de insucesso no tratamento quimioterápico.

A duração da primeira remissão está relacionada ao sucesso da quimioterapia. Pacientes que recaem na MO dentro dos primeiros 30 meses do diagnóstico (aproximadamente 6 meses depois de completada a quimioterapia inicial), tem péssimo prognóstico. Portanto, esses pacientes são encaminhados para o transplante. Nos casos de recaída tardia, 30 – 40% podem ser curados com

quimioterapia. A sobrevivência de pacientes submetidos a transplantes alogênicos e com doadores não aparentados ou haploidênticos (prática comum em muitos centros) é semelhante. Recaída no testículo pode ser curada com quimioterapia em mais de 2/3 dos pacientes. Recaída no SNC com história prévia de radioterapia no Sistema Nervoso tem um prognóstico sombrio. Pacientes com leucemia recidivada de células T ou que expressam as translocações t(9;22) têm um prognóstico sombrio. Por outro lado, o rearranjo TEL/AML1 prediz uma melhor resposta.

1.2 Dano e reparo do DNA

Biologicamente, o DNA é considerado a chave para a vida. Para a proteção do DNA e manter a sua integridade, este é empacotado de modo a diminuir a sua vulnerabilidade. Adicionalmente, há diversos mecanismos de detoxificação de moléculas nas células, tentando eliminá-las e prevenindo o dano ao DNA. Entretanto, nas inúmeras reações e interações, as células são submetidas a vários tipos de danos, sendo praticamente impossível conter todos eles (Melis et al., 2011).

Danos endógenos ao DNA ocorrem numa frequência estimada de 20.000 a 50.000 lesões por célula por dia em humanos (Lindhal, 1993), em outras palavras, ocorrem entre 10 a 40 trilhões de lesões por segundo no corpo humano. Lesões endógenas gerais podem resultar em hidrólise, oxidação e metilação não enzimática dos componentes do DNA (Cadet et al., 2003).

Fatores exógenos possuem papel importante no dano ao DNA. São exemplos: radiação ionizante (IR), ultravioleta (UV) e exposição a agentes químicos.

As lesões primárias endógenas e exógenas podem resultar em dano ao DNA permanente. Independente da fonte do dano, respostas aos danos são indispensáveis para a vida de cada célula, bem como do organismo como um todo (Gavande et al., 2016). Vias de reparo e respostas celulares são de vital importância para a prevenção do câncer e doenças relacionadas, impactando diretamente na resposta aos tratamentos. Células de câncer se caracterizam pela instabilidade

genética causada por deficiência em vias de reparo e/ou recombinação de genes (Gavande et al., 2016).

Danos ao DNA também podem ocorrer, em maior ou menor extensão, decorrentes de tratamento quimioterápico, visto que os vários protocolos e regimes de tratamento existentes possuem fármacos que interferem diretamente no metabolismo do DNA. É o caso do metotrexato, que impede a síntese de DNA através da inibição da enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), interferindo com a replicação do DNA. A daunorubicina é um inibidor de topoisomerase II e também têm mecanismos anti-tumorais adicionais, tais como a intercalação no DNA, a geração de radicais livres, de ligação e de alquilação do DNA, podendo, também, induzir apoptose (Rocha et al., 2016). A ciclofosfamida é um potente agente genotóxico, causando reticulação inter- cadeia (Casorelli et al., 2012). Os glicocorticóides utilizados no tratamento de leucemia, também têm efeito citotóxico, aparentemente mediado através de receptores de glucocorticóides (Quddus et al., 1985).

Alteração no reparo ao dano do DNA pode induzir mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico, resultando em aumento do reparo de lesões do DNA (Esposito e So, 2014). A sensibilidade de células de câncer a agentes que danificam o DNA é mais provavelmente relacionado com anomalias intrínsecas e mecanismos de reparação do DNA. A capacidade das células de câncer (ou células-tronco cancerosas) para reconhecer o dano ao DNA e iniciar o reparo do DNA é um mecanismo-chave para a resistência à terapêutica ou recidiva (Mathews et al., 2013).

Reparos a danos do DNA são feitos por: reparo por excisão de nucleotídeos (NER – do inglês *Nucleotide Excision Repair*), reparo por excisão de bases (BER – do inglês *Base Excision Repair*), recombinação homóloga (HR - do inglês *Homologous Recombination*) e NHEJ (do inglês *nonhomologous end-joining*). Essas últimas, HR e NHEJ, compõem os dois principais sistemas de reparo de DSBs (do inglês *double-strand breaks*).

Quebras de fita dupla (DSBs) são lesões formadas quando ambas as fitas do DNA sofrem quebra. Falhas no sistema de reparo dessas lesões estão associadas a várias desordens, incluindo: sistema imunológico, desordens neurológicas e desenvolvimento de câncer. Ativação de *checkpoints* (pontos de controle) do ciclo celular e morte celular programada (apoptose) também aumentam a chance de estabilidade genômica e, em alguns casos, sobrevivência celular (Bartket e Lukas, 2007). Outrossim, as células de câncer são capazes de ignorar esses processos, criando rotas e mecanismos alternativos, alcançando altos níveis de proliferação (Cheung-Ong et al., 2013).

Em um estudo com câncer de bexiga, Bowman e colaboradores (2014) sugerem que há uma ligação entre resistência ao dano de DNA com ambos: resposta ao tratamento quimioterápico e agressividade do tumor.

O reparo anormal de DNA também tem grandes implicações na biologia do câncer e da leucemia, conferindo resistência à terapêutica em células malignas, o que é um fenótipo visto em muitos pacientes com LMA (Seedhouse et al., 2006). Neste cenário, seria proposto inibição da reparação de DNA para aumentar a eficácia de agentes quimioterapêuticos genotóxicos, resultando assim em resultados mais favoráveis aos pacientes. O reparo do DNA é necessário para manter a integridade e a estabilidade do DNA genômico para a sobrevivência celular normal, caso contrário, a frequência de morte celular, as mutações de genes ou evolução a células tumorais seriam aumentadas.

No entanto, as células cancerosas normalmente têm deficiências nas vias de reparação do DNA, que tornam as células cancerígenas mais vulneráveis ao tratamento genotóxico, mas também pode conduzir a resistência se a via de reparo ao DNA for excessivamente ativada. O aumento da reparação do DNA contribui para a resistência a fármacos e o risco de recidiva da doença. Em malignidades hematológicas, a inibição da reparação do DNA em pacientes com leucemia mieloide aguda com o gene FLT3-ITD pode reduzir o risco de recidiva da doença, ao alterar a capacidade das células leucêmicas à sobrevivência de danos no DNA induzida por quimioterapia (Wang et al., 2016).

É crescente o número de estudos que indicam o silenciamento epigenético de genes envolvidos em resposta a danos no DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*) que contribuem para o processo de leucemogênese (Esposito e So, 2014).

Vias de reparo por excisão e reversão do dano ao DNA são responsáveis pelo reparo fundamental de nucleotídeos danificados, resultando na inserção correta da sequência de nucleotídeos e estrutura do DNA (Friedberg et al., 2006).

1.2.1 Reparo por Excisão de Nucleotídeos

Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER) é a via de reparo de DNA mais versátil e flexível nas células (Costa et al., 2003). NER age na remoção das lesões, na distorção da dupla hélice do DNA, interferindo no pareamento das bases e bloqueando a transcrição.

A abundância de bases e nucleotídeos no genoma faz com que NER seja a via de reparo mais importante para quebras simples. Esta via é capaz de reparar um grande número de lesões no DNA e pode restaurar a informação genética correta (Melis et al., 2011).

Os exemplos mais comuns destas lesões são os dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs – do inglês *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*) e 6-4-fotoprodutos (6-4-PPs), os principais tipos de danos provocados por luz ultravioleta (UV) (Marteijn et al., 2014).

Basicamente, após o reconhecimento do dano ao DNA, a ação sequencial de helicases e endonucleases faz com que ocorra a abertura da dupla-hélice e clivagem da fita com o dano – algumas bases antes e após a lesão. Segue-se a remoção do segmento do DNA contendo a lesão e é feito um *gap* (lacuna) de polimerização usando a fita intacta como molde. Síndromes genéticas estão diretamente relacionadas ao reparo do DNA, como *Xeroderma pigmentosum* (XP) e Síndrome de Cockayne (CS) (Berneburg e Lehmann, 2001; Lehmann, 2003).

Há mais de 30 polipeptídeos que participam da via de reparo e extensas análises genéticas e bioquímicas levaram à compreensão completa dos passos necessários e as proteínas que realizam essas etapas (Woods e Turchi, 2013).

1.2.2 Vias do NER

NER está dividido em 2 sub-vias, as quais iniciam com um mecanismo diferente, mas após reconhecimento do dano ambas as vias procedem ao longo do mesmo processo (figura 2). São denominadas NER no genoma global (GG-NER) e NER acoplado à transcrição (TC-NER).

GG-NER reconhece e remove lesões ao longo de todo o genoma e é considerado ser um processo lento e pouco eficiente, pois ele verifica o genoma inteiro buscando dano ao DNA (Guarente et al., 2008). Entretanto, lesões que distorcem as hélices, que são induzidas por UV, do tipo 6-4-PPs, são rapidamente reconhecidas por GG-NER (Garinis et al., 2006).

TC-NER é responsável por eliminar lesões da fita transcrita de genes ativos. Este processo de reparo cuida do bloqueio de lesões da maquinaria de transcrição e subsequentes potenciais disfunções. Após TC-NER ser diretamente acoplada à maquinaria de transcrição ela é considerada ter ação rápida e mais eficiente que GG-NER, mas somente é iniciada quando a transcrição de um gene é bloqueado.

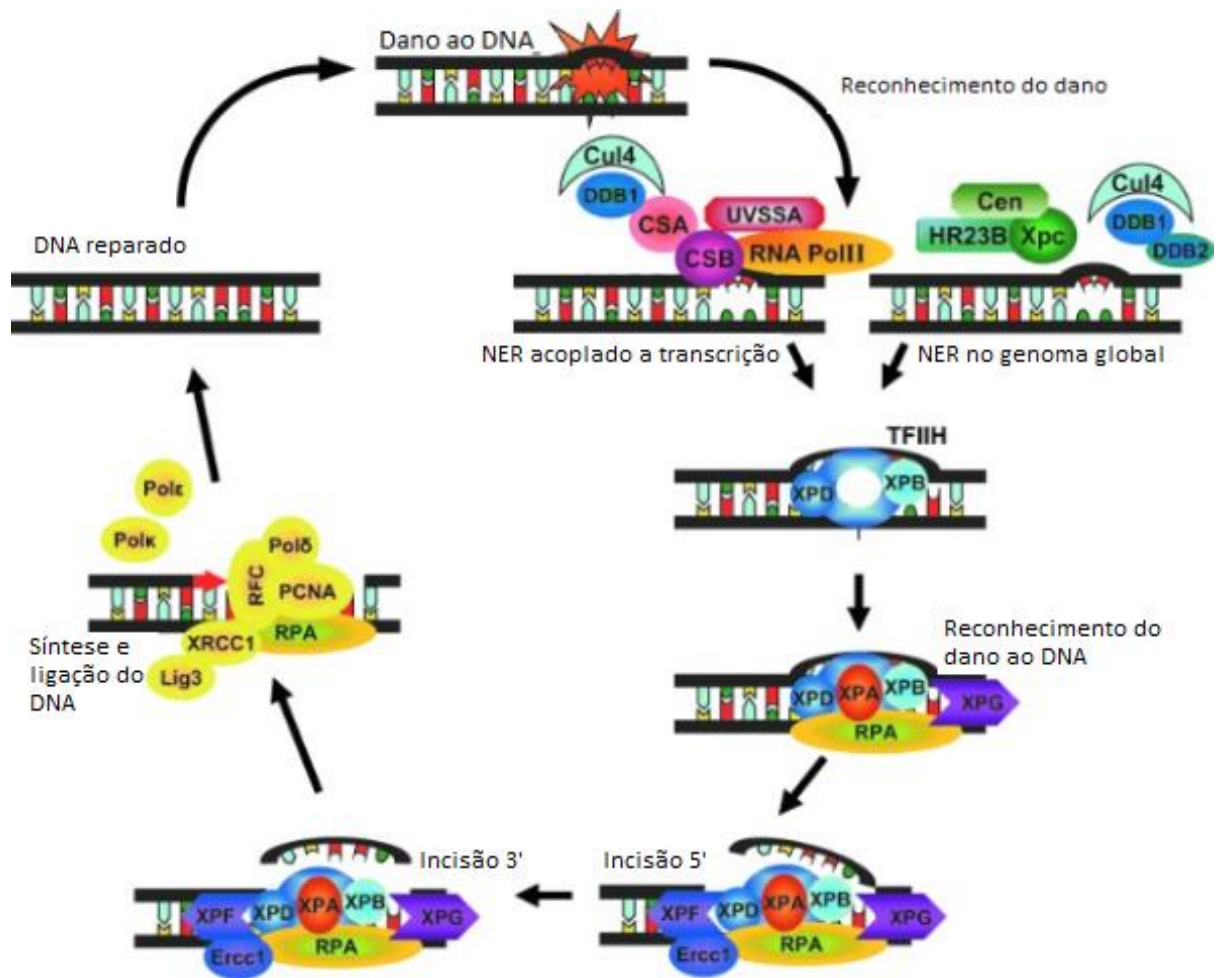


Figura 3. Via de reparo por excisão de nucleotídeos – NER (adaptado de Melis et al., 2013).

1.2.2.1 – Reconhecimento do dano ao DNA

A diferença entre as 2 sub-vias é o passo inicial de reconhecimento do dano (figura 3). Em GG-NER o complexo XPC-hHR23B é responsável pelo passo crucial de sensibilidade ao dano (Volker et al., 2001; Yokoi et al., 2000). Após a ligação do XPC-hHR23B, a conformação do DNA próximo à lesão muda consideravelmente. Assim, GG-NER se inicia através de detecção e ligação às lesões, e o XPC-hHR23B distorce a dupla hélice do DNA. Para GG-NER, o complexo XPC/hH23B (incluindo centrina 2), junto com a proteína de ligação do DNA danificado por UV (UV-DDB), estão envolvidos no reconhecimento da lesão (Dip et al., 2004). O complexo

XPC/hH23B é também essencial para recrutar os demais componentes da maquinaria do NER no sítio danificado, também conhecido como complexo pré-incisão (Yokoi et al., 2000; Araujo et al., 2001).

Quando XPC encontra uma lesão, a proteína muda a sua conformação, aumentando assim a afinidade e criando a conformação com a qual é possível interagir com outros fatores de NER (Hoogstraten et al., 2008). A afinidade de ligação da XPC ao DNA parece estar relacionada a extensão da distorção da hélice.

A proteína XPC contém alguns domínios de ligação: um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ligação a hH23B, domínio de ligação a centrina 2 e domínio de ligação a TFIIH (Sugasawa, 2008). TFIIH é fator de iniciação a transcrição multifuncional e é também ligante às helicases componentes do NER, XPB e XPD. O complexo é essencial para a continuação da via do NER e é responsável pelo desenrolamento da fita do DNA após o reconhecimento do dano por XPC/hH23B (figura 3). XPC também demonstrou interagir fisicamente com TFIIH em estudos *in vitro* e *in vivo*, recrutando o complexo NER para desenrolar o DNA e executar esse processo de modo dependente de XPC (Melis et al., 2011).

Após o dano no DNA, a proteína CSA parece ser rapidamente translocada para a matriz nuclear. Essa translocação é independente de XPA ou XPC, mas requer a CSB, que não é encontrada na matriz nuclear. Por outro lado, a proteína CSB parece residir no complexo de alongação contendo a RNA polimerase II. CSB é capaz de alterar a conformação do DNA e remodelar a cromatina *in vitro* num processo dependente de ATP, o qual está ligado ao remodelamento da cromatina (Citterio et al., 2000).

CSA e CSB tem papel crucial no reparo acoplado à transcrição e também estão envolvidos nas funções de transcrição da RNA pol II. A proteína CSB interage com RNA pol II (Tantin et al., 1997), enquanto a CSA não (Tantin, 1998). CSA interage principalmente com CSB e a subunidade p44 do complexo TFIIH (Henning et al., 1995; Nakatsu et al., 2000). Ambos, CSA e CSB fazem parte da RNA pol II, associada a complexos, mas CSB possui funções além do NER (Sunesen et al., 2002).

Em TC-NER, CSB é vista como a responsável pelo deslocamento da RNA polimerase. Adicionalmente, assim como XPC em GG-NER, o complexo pré-incisão do NER é recrutado num processo CSB dependente (Fousteri et al., 2006; Fousteri e Mullenders, 2008). Porém, primeiro, bem como em GG-NER, o complexo TFIIH é recrutado após o reconhecimento do dano.

1.2.2.2 – *Desenrolamento das hélices do DNA*

Após a detecção do dano e subsequente recrutamento de TFIIH, GG-NER e TC-NER convergem para a mesma via. O complexo TFIIH consiste de 10 proteínas, entre elas XPB e XPD, essencial para a atividade de NER, início de ação da RNA polimerase II para transcrição e um possível papel na regulação do ciclo celular (Costa et al., 2003). As DNA helicases, XPB e XPD, facilitam o desenovelamento da dupla fita do DNA, num processo dependente de ATP, permitindo a entrada do complexo pré-incisão no sítio da lesão (Oksenych e Coin, 2010). Além disso, elas têm atividades complementares: enquanto a proteína XPB desenrola o DNA na direção 3' – 5', XPD desenrola na posição oposta (Schaeffer et al., 1994; Roy et al., 1994). O complexo pré-incisão consiste das proteínas XPA, XPG e RPA e encontra-se ao redor do local do dano.

A função da XPA é verificar a lesão e agir como um fator organizacional, então a maquinaria de reparo é posicionada ao redor da lesão. XPA e RPA são considerados protetores da fita não danificada e levam à abertura completa do DNA danificado. Alguns estudos sugerem que este passo é essencial para o início da incisão/excisão do DNA que sofreu o dano (Melis et al., 2011).

1.2.2.3 – *Remoção de oligonucleotídeos danificados mediada por endonucleases*

O processo de incisão ocorre em ambos os lados e alguns nucleotídeos antes e após a lesão, requerendo a ação de endonucleases estrutura-específica XPG e ERCC1-XPF.

O acesso das endonucleases não ocorre de forma sincronizada. A endonuclease XPG é recrutada para a pré-incisão (o complexo) sem a presença de XPA. Em contraste à XPG, o recrutamento de ERCC1-XPF ao DNA danificado requer a proteína XPA.

O correto posicionamento de ambas endonucleases é um evento crucial para a correta incisão ao redor do fragmento danificado. RPA se liga à fita não danificada conferindo especificidade por ERCC1-XPF, e essa interação com XPA pode facilitar ou até estabilizar seu posicionamento na fita danificada. No caso de XPG, RPA pode contribuir, mas não é suficiente para conferir a mesma especificidade. TFIIH é possivelmente o responsável por essa estabilidade (Saijo et al., 1996; de Laat et al., 1999).

Uma vez que o complexo de incisão está formado, a atividade catalítica das endonucleases é iniciada. As incisões são feitas assimetricamente ao redor da lesão e existe consenso de que a incisão 3' precede a 5' (Mu et al., 1996).

A proteína XPG é responsável pela incisão em uma das fitas do DNA na porção 3' do DNA aberto intermediário, aproximadamente 2 a 8 nucleotídeos além da lesão (Evans et al., 1997). Por outro lado ERCC1-XPF realiza a incisão 5', aproximadamente 15-24 nucleotídeos além da lesão (Evans et al., 1997). O local preciso das incisões pode variar dependendo do tipo de lesão, mas as incisões são independentes uma da outra. A atividade 3'-endonuclease da XPG é detectada na ausência da ERCC1-XPF, porém, embora a atividade 5'-endonuclease de ERCC1-XPF não dependa da clivagem prévia de XPG, isso requer a presença dessa proteína no complexo do reparo (Costa et al., 2003).

1.2.2.4 – *Síntese do reparo do DNA*

O ERCC1-XPF 5'-incisão completa o estágio de incisão ao nível do grupamento hidroxila (OH) na cadeia terminal 3' na lacuna gerada pela remoção dos oligonucleotídeos danificados. Essa porção terminal serve como molde para a DNA polimerase, não sendo necessárias modificações para iniciar a síntese de DNA (Sijbers et al., 1996).

Duas DNA polimerases participam da síntese do novo fragmento de DNA. Outra proteína que também age como um fator de processo no NER é o fator de replicação C (RFC – do inglês *Replication Factor C*).

Finalmente, o último passo do NER acontece: a ligação da porção 5'-terminal sintetizada à sequência original, função executada pela DNA ligase I (Tomkinson e Levin, 1997).

1.3 Justificativa

Apesar dos avanços nas taxas de cura de leucemia linfóide aguda pediátrica, bem como melhorias nos tratamentos, ainda assim faz-se necessário a busca por melhores regimes de tratamento, diminuindo a incidência de recidiva, buscar alternativas frente à resistência durante os tratamentos, além de oferecer uma terapêutica mais adequada a cada paciente, dentro de uma perspectiva de medicina personalizada.

Para esse fim, o entendimento da biologia dessa neoplasia, bem como a elucidação da participação das vias envolvidas no metabolismo do DNA, no âmbito do dano e reparo deste, poderá ser de grande valia para auxiliar na melhora dos tratamentos existentes na atualidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o dano e o reparo ao DNA de células de pacientes pediátricos diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda ao longo do período de indução no tratamento quimioterápico.

2.2 Objetivos específicos

Analisar demograficamente os pacientes incluídos no estudo, estratificando seus principais grupos, levando em consideração: sexo, idade, risco, protocolo de tratamento, recidiva e doença residual mínima (DRM);

Avaliar o índice de dano de DNA de amostras de células coletadas de medula óssea (MO) de pacientes pediátricos ao diagnóstico (D0) e ao longo da indução (D15 e D35), através da técnica de Cometa Alcalino;

Correlacionar os achados demográficos com os índices de dano dos pacientes;

Identificar a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de ERCC1, CSA, CSB, XPA, XPC e XPD por PCR em tempo real, nas amostras dos pacientes ao diagnóstico e ao longo da indução;

Correlacionar os achados de expressão de (mRNA) com os índices de dano dos pacientes, bem como com os seus dados demográficos, ao diagnóstico e ao longo da indução.

3. ARTIGO

ARTIGO

O artigo foi submetido à revista *Leukemia Research* no dia 26 de outubro de 2016, no documento LR-S-16-00575 (1).

DNA Damage Response in Patients with Pediatric Acute Lymphoid Leukemia during Induction Therapy

Júlia Plentz Portich^{1,#}, Rafael Pereira dos Santos^{1,2,3,4,#}, Nathalia Kersting dos Santos¹, Karolina Brochado Jorge¹, Pietro Rebelo Casagrande¹, Gabriela dos Santos Costa¹, Jéssica Maria Gonçalves Dias Cionek¹, Danielly Brufatto Olguins¹, Marialva Sinigaglia¹, Franciele FaccioBusatto⁵, Jenifer Saffi⁵, SharbelWeidner Maluf⁶, Jiseh Fagundes Loss⁷, AlgemirLunardi Brunetto⁴, Rafael Roesler^{1,2,3}& Caroline Brunetto de Farias^{1,2,3,4*}

¹*Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

²*Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

³*Post-Graduation Program in Biologic Sciences: Pharmacology and Therapeutics (PPGFT), Federal University of Rio Grande do Sul UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁴*Children`s Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil.*

⁵Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

⁷Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Caroline Brunetto de Farias, PhD, Children's Cancer Institute and Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Ramiro Barcelos St, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33597616; Fax: +55 51 33598012;
E-mail: labpesquisa@ici-rs.org.br / carolbfarias@gmail.com

Abstract

Predicting the individual response to chemotherapy is a crucial challenge in cancer treatment. DNA damage caused by antitumor therapies evokes different repair mechanisms responses, as Nucleotide Excision Repair (NER), whose components are being studied as prognosis biomarkers and target therapies. However, few reports have addressed DNA damages in pediatric Acute Lymphoid Leukemia (ALL). Hence, we conducted an observational follow-up study with pediatric patients to assess DNA damage (by Comet Assay) and gene expression from NER pathway during chemotherapy induction. Bone marrow (BM) samples from diagnosis, 15th(D15) and 30th (D30) days of the treatment were collected from 28 patients with ALL. There was no increase in damage index. However, there was a reduction of cells with low damages on D35 compared with diagnosis. NER pathway expression remained the same, however, in a single patient, a significant decrease was observed, maybe due to silencing or downregulation of repair pathways. DNA damage levels and repair may influence the clinical outcome, being involved in drug resistance and risk of relapse. In pediatric ALL, we analyzed for the first time DNA damage and repair behavior in BM samples. Monitoring patient's outcomes will help to access the implication of our findings in cure and relapse rates.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia; DNA damage; Comet assay; NER pathway; DNA repair.

1. Introduction

In developed countries, cancer is the second cause of death. Fortunately, survival has increased thanks to the development of new therapies and the fact of taking into account individual genetic differences [1]. Acute Lymphoid Leukemia (ALL) is the most frequent neoplasia during childhood [2]. The treatment is based on the risk stratification, because a body of evidence supports that the analysis of individual clinical features brings great benefits regarding survival and reduction of morbidity. Although the high cure rates, still 30% of patients relapse from the disease [2], maybe due to variable degrees of chemotherapy resistance during treatment.

DNA integrity is critical for proper cellular function and proliferation [3]. Most antitumor therapies damage tumor cell DNA, and studying DNA damage responses has become an important aspect of the outcome of the therapies [1]. DNA Damage response (DDR) is a collective term for the different intra and inter-cellular signaling events and enzyme activities that result from the induction and detection of DNA damage. If DNA repair is not possible or suboptimal, leading to genomic instability, DDR can also be responsible for downstream cell fate decisions, such as cell death or senescence [4,5].

Various chemotherapies used in leukemia protocols damages DNA, such as methotrexate, daunorubicin [6], cyclophosphamide [1], and, also, glucocorticoids [7]. DNA Damage Response (DDR) has been investigated as a therapy for cancer [8], and it is known that different forms of DNA damage evoke different repair mechanisms responses [9]. The Nucleotide Excision Repair (NER) pathway deals with modified nucleotides that distort the structure of the double helix and is the

pathway that primarily deals with UV-induced damage and platinum drugs [10]. Components of this pathway are being studied as prognosis biomarkers and targeted therapies in cancer [11].

Predicting the individual response to chemotherapy is a crucial challenge in cancer treatment, especially concerning personalized medicine. Beyond that, fast, practical and cost-effective techniques are needed. However, when it comes to ALL, few reports have addressed those DNA damages caused by chemotherapy, the response to the damages and consequently outcomes of the treatment. Hence, the main purpose of the present study is to assess DNA damage and gene expression from NER pathway in bone marrow cells from ALL pediatric patients during chemotherapy induction.

2. Methods

An observational follow-up study was performed. The sample consisted of pediatric patients admitted to the Pediatric Oncology Unit of Clinical Hospital from Porto Alegre during January 2013 and December 2015. Patients of both genders were included, diagnosed with ALL between 0 and 18 years. After application of the Consent and Informed Term, bone marrow (BM) samples were collected by clinical staff at three pre-defined stages from induction therapy: diagnosis (D0), after 15 days of treatment (D15) and after 35 days of treatment (D35). Clinical and laboratory variables were obtained by medical records. The project was approved by hospital's Ethics Committee (GPPG Number 130023).

2.1 DNA Damage Evaluation

DNA Damage was measured using the Comet Assay protocol as described by Singht et al. [12]. The assay itself was carried out as described for *in vivo* samples [13,14]. All procedures subsequent to bone marrow collection were carried out so as to prevent interference from light. One hundred μL of biological solution (7 μL of bone marrow + 93 μL of low-melting point agarose 0.007%) were spread onto regular agarose precoated slides, covered with cover slips and placed into a cold tray. Once samples have solidified, cover slips were removed and the slides left to stand in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.2, to which 1% Triton X-100 and 10% DMSO are added) for 1 or 2 days, under refrigeration. Excess fluid was removed from each slide, and all slides were placed in an electrophoresis tank, to which a basic solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) was added. Slides were left to stand in this solution for 20 min to enable unwinding of DNA and expression of alkali-labile sites and single-strand breaks. Electrophoresis was then run for 20 min at 25 V, 300 mA and 0.9 V/cm. Slides were removed from the electrophoresis tank, washed three times in neutralizing solution (0.4 M Tris, pH 7.5), rinsed three times with distilled water and left to dry at room temperature. Slides were then fixed and silver-stained as described by Nadin et al. [15]. For assessment of DNA damage, 100 cells per sample were examined under light microscopy (x200 magnification). Cells were scored on a scale of 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity (dimensions and shape). Therefore, the total sum of damage scores for a sample of 100 cells (the damage index) ranged from 0 (no migration in any cell) to 400 (maximal migration in all cells).

2.2 Expression of Nucleotide Excision Repair genes

Expression of genes from Nucleotide Excision Repair (NER) pathway was accessed by Real-Time PCR. Total RNA from BM was extracted using PureLink R RNA Mini Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. All steps of the procedure were conducted under RNase-free conditions with caution to avoid contamination. The concentration of total RNA (ng/ μ L) was determined at an absorbance of 260 nm (A260) using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and was used to calculate the total RNA yield. Total RNA purity was assessed by measuring the A260/280 ratio. Samples with an A260/A280 ratio of at least 1.8 were considered of sufficient quality for further analysis. Then, 50 ng of total RNA from each patient sample was converted to cDNA using the superscript TM III First-Strand Synthesis supermix (Invitrogen, São Paulo, Brazil) with a mix of random hexamers in a 20 μ L reaction volume. Real-time PCR was used to test target genes. The reaction was performed at 95°C for 20s, followed by 40 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 30s, and 72°C for 35s [16]. β -actin was selected as the internal reference. A negative control was included in each PCR set. Results data are shown as percentage changes relative to β -actin and were calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The sequence of the primers is shown in Table 1.

Table 1: Gene sequence

Gene	Gene sequence
β-actin	

ForwardSequence	GAGACCTTCAACACCCCAG
Reverse Sequence	GCTACAGCTTCACCAGCAG

ERCC1

ForwardSequence	GCTGGCTAAGATGTGTATCCTGG
Reverse Sequence	ATCAGGAGGTCCGCTGGTTTCT

CSA

ForwardSequence	GCAGTTTCCTGGTCTCCACGTT
Reverse Sequence	CAAACATCCTGATGCTCTTCTCAC

CSB

ForwardSequence	CGTTGCCTGTGTTTATGGAGCAG
Reverse Sequence	CTGACTTCATTCTCCGCAGTAGG

XPA

ForwardSequence	GAAGTCCGACAGGAAAACCGAG
Reverse Sequence	GATGAACAATCGTCTCCCTTTTCC

XPC

ForwardSequence	TTGTCGTGGAGAAGCGGTCTAC
Reverse Sequence	CTTCTCCAAGCCTCACCCTCT

XPD

ForwardSequence	TCACCGACCTTGCTGACTTCTC
Reverse Sequence	GTTCTGTCGTCAAAGGGCTCGA

2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Variables with normal distribution were expressed as mean and standard deviation and with abnormal distribution, as median and interquartile range. Non-parametric tests, such as Friedman Test and Mann-Whitney, were used to comparison between groups. P values under .05 were considered significant. Graphs were performed using GraphPad version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Demographic data

Seventy three bone marrow (BM) samples were collected belonging to 28 patients with acute lymphocytic leukemia (ALL). Seventeen (61%) patients had BM collections of the three moments of induction. Eleven patients (39%) had BM collection of only two moments from induction. Demographic data from patients with leukemia is presented in Table 2. The comparison between damage index according to gender, age, protocol and type of leukemia is presented in Table 3. Drugs used during induction therapy and mechanisms of action can be seen in Supplementary Table 1 and 2.

Table 2: Demographic data from patients with ALL

		B-Line ALL (n = 23)	T-Line ALL (n = 5)	Total (n = 28)
Gender	Male	11 (48%)	4 (80%)	15 (54%)
	Female	12 (52%)	1 (20%)	13 (46%)
Age (mean +/- SD)		6.33 +/- 4.85	9.33 +/- 4.82	6.87 +/- 4.89
Risk¹	High Risk (Total)	14 (60%)	5 (100%)	19 (68%)
	High RiskFast Response	8 (57%)	2 (40%)	10 (52%)
	High RiskLow Response	6 (43%)	3 (60%)	9 (48%)
	Low Risk (Total)	9 (40%)	0	9 (32%)
	Standard LowRisk	2 (22%)	0	2 (22%)
	IntermediateLowRisk	7 (78%)	0	7 (78%)
Protocol	GBTLI 2009 High Risk	14 (60%)	5 (100%)	19 (68%)
	GBTLI 2009 Low Standard/Intermediate Risk	8 (35%)	0 (0%)	8 (28%)
	GBTLI 2009 ALL Infant	1 (5%)	0 (0%)	1 (4%)
Relapse		1 (5%)	0 (0%)	2 (7%)
Death		3 (13%)	0 (0%)	3 (10%)
Remission² in D15		18 (78%)	3 (60%)	21 (75%)
Remission² in D35		19 (82%)	4 (80%)	23 (82%)
Positive MRD³ D15		18 (78%)	2 (40%)	22 (78%)

Positive MRD³	5 (22%)	1 (20%)	6 (21%)
D35			

Legend

¹Risk stratification was in accordance to the criteria of Brazilian Group Treatment of Leukemia in Childhood (GBTLI 2009) Protocol (based on the NCI criteria plus therapeutic response (evaluated after 8 days from chemotherapy in peripheral blood based on number of blasts, in D15 and D35 by BM cytology and minimal residual disease).

²Remission was defined < 5% of blasts in bone marrow biopsy

³Positive minimal residual disease (MRD) defined as MRD > 0.01 in bone marrow immunophenotyping

Table 3: Comparison between Damage Index (DI) and demographic data.

Gender			
	Male	Female	Significance(P)
DI Diagnosis¹	11 (7.3 – 26) (n = 11)	44 (12.5 – 56.5) (n = 11)	0.13 ²
DI D15¹	13 (2 – 25.7) (n = 13)	17.5 (6.25 – 69.2) (n = 12)	0.35 ²
DI D35¹	19.75 (5.7 – 57.1) (n = 14)	18 (3.5 – 42) (n = 11)	0.96 ²
Age			
	Above 10 years	Under 10 years	Significance (P)
DI Diagnosis¹	11 (10.6 – 54) (n = 7)	19.75 (5 – 103.5) (n = 16)	0.61 ²
DI D15¹	20 (15 – 29) (n = 7)	9.5 (1.5 – 36.6) (n = 18)	0.11 ²
DI D35¹	20.5 (9 – 76) (n = 7)	16.25 (3.5 – 28.5) (n = 18)	0.43 ²

Protocol			
	GBTLI 2009 High Risk	Other Protocols³	Significance (P)
DI D15¹	19 (8.5 – 46.5) (n = 17)	5 (2.5 – 24.1) (n = 8)	0.26 ²
DI D35¹	19.75 (9 – 38) (n = 16)	14.5 (1.75 – 102.5) (n = 9)	0.7 ²
Type of leukemia			
	B-Line ALL	T-Line ALL	Significance (P)
DI Diagnosis¹	26 (10 – 63) (n = 19)	9 (1.83 – 35.75) (n = 4)	0.11 ²
DI D15¹	14 (4 – 25.7) (n = 21)	38.5 (3.2 – 232.8) (n = 4)	0.57 ²
DI D35¹	22 (3.5 – 76) (n = 19)	9 (7 – 14.5) (n = 5)	0.25 ²

Legend

DI: Damage Index

¹Median and interquartile range damage index (p25 – p75)

²Mann-Whitney Test

³Other Protocols were: GBTLI 2009 Intermediary Low Risk, GBTLI 2009 Standard Low risk and GBTLI 2009 ALL Infant.

3.2 Cells with low DNA damage decrease during induction therapy

There was no increase in damage index (DI) during induction (diagnosis, D15 and D35)($P = 0.58$; Friedman Test) (Figure 1A). There was a reduction of cells with low damage (types 1 and 2) on D35 compared with diagnosis ($P = 0.03$; Wiscoxin test) (Figure 1B). The number of cells with high damage (types 3 and 4) did not change comparing D0 and D35 ($P = 0.9$; Wiscoxin test)(Figure 1C).

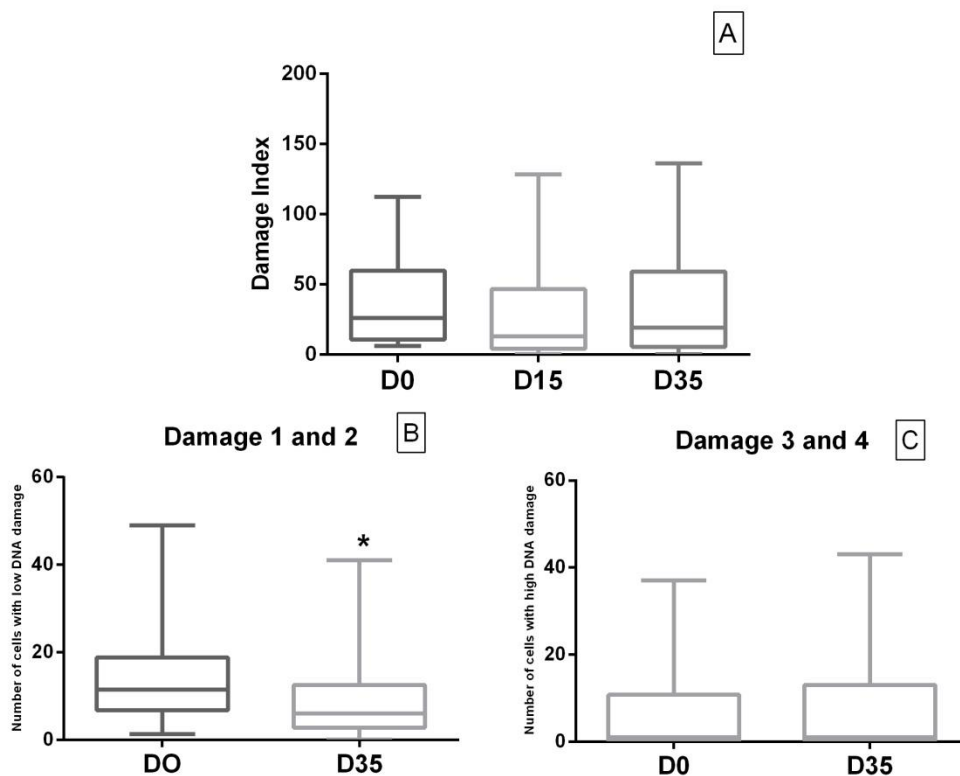


Figure 1: DNA damage during induction. A) Median and interquartile range of Damage Index (DI) of the 17 patients during induction ($P = 0.58$; Friedman Test). B) Median and interquartile range of the number of cells with low damage (types 1 and 2) in diagnosis (D0) and in the end of induction (D35). ($*P < 0.05$; Wiscoxin Test). C) Median and interquartile range of the number of cells with high damages (3 and 4) in diagnosis (D0) and in the end of induction (D35). ($P = 0.9$; Wiscoxin test).

3.3 Patients with positive minimal residual disease (MRD) have a decrease in cells with low DNA damage

Analyzing only patients with positive minimal residual disease (MRD), we found a significantly decrease in the number of cells with low DNA damage (types 1 and 2) during induction ($P < 0.05$; Mann-Whitney Test)(Figure 2A). The number of low damaged cells did not change in patients with negative MRD (Figure2B).

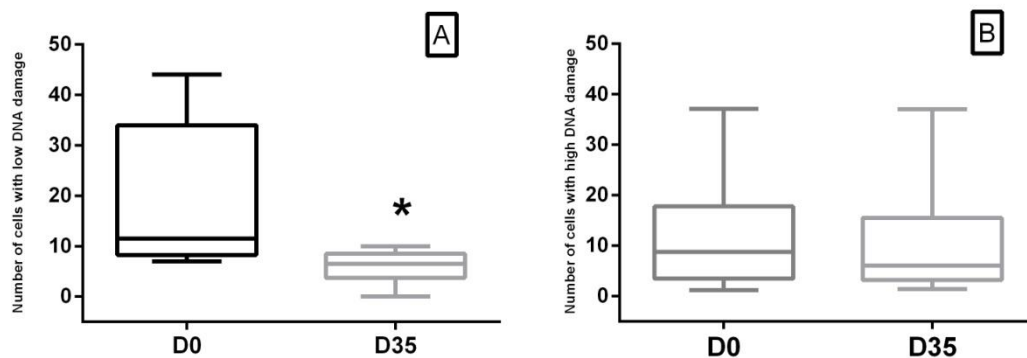


Figure 2: A) Median and interquartile range of the number of cells with low DNA damage (types 1 and 2) from six patients with positive MRD (minimal residual disease), in diagnosis (D0) and the end of induction (D35)(* $P < 0.05$; Mann-Whitney Test). B) Median and interquartile range of the number of cells with low DNA damage (types 1 and 2) from six patients with negative MRD (minimal residual disease), in diagnosis (D0) and the end of induction (D35)($P = 0.63$; Mann-Whitney Test).

3.4 Gene expression analysis of the nucleotide excision repair (NER) pathway

We analyzed the expression of six genes involved in NER pathway: ERCC1, CSA, CSB, XPA, XPC and XPD. We saw an increase in gene expression compared to the endogenous control, beta actin. However, there was no significant difference in gene expression comparing diagnosis (D0) and day 35 (D35) ($P > 0.05$; Wilcoxin Test) (Figure 3A). We also analyzed NER pathway by functionally joining repair genes: XPC represented global genome NER (GG-NER), CSA and CSB represented transcription coupled NER (TC-NER) and ERCC1, XPA and XPD the common pathway. There was no difference between gene expression comparing D0 and D35 divided by functional groups ($P > 0.05$; Wisconsin Test)(Figure 3B).

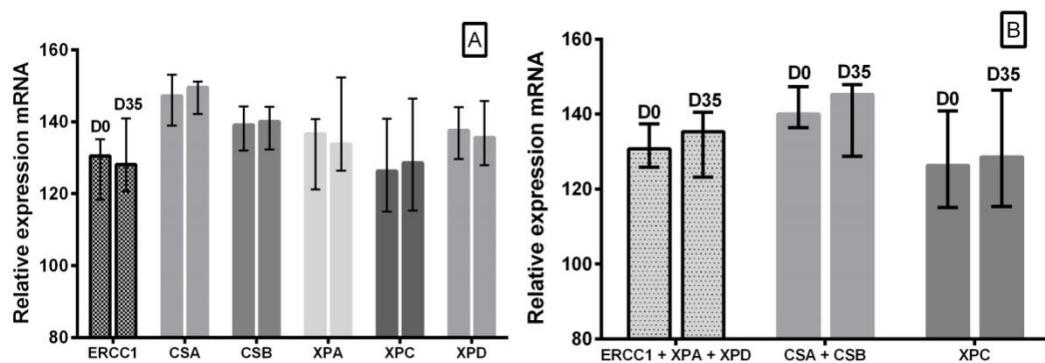


Figure 3: A) Median and interquartile range from actin, ERCC1, CSA, CSB, XPA, XPC and XPD mRNA expression of samples of bone marrow of 11 patients comparing diagnosis (D0) and D35. B) Median and interquartile range from repair genes from NER pathway, functionally divided: GG-NER – XPC; TC-NER - CSA and CSB; Common pathway - ERCC1, XPA and XPD mRNA expression of samples of bone marrow of 11 patients comparing diagnosis (D0) and D35.

3.5 NER gene expression and DNA damage behavior from one single patient

In contrast, we found that one patient showed absolutely different profile of NER gene expression, demonstrating considerable decrease in mRNA expression during induction (Figure 4B). This patient also had an increase in damage index comparing diagnosis and D15 (Figure 4A). This patient used the GBTLI 2009 High Risk Protocol, was in remission and had negative minimal residual disease both in D15 and D35. It is currently in maintenance therapy with remission of the disease.

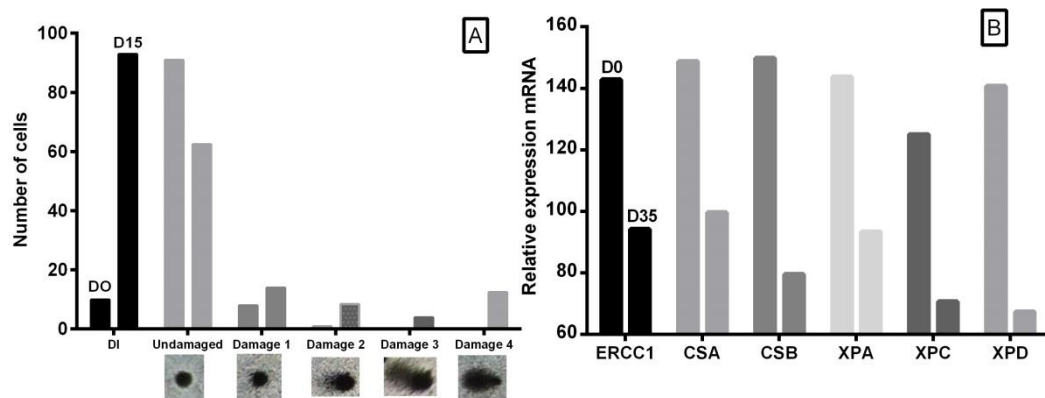


Figure 4: A) Damage Index and number of cells with damage 1,2,3 and 4, and undamaged cells, comparing diagnosis (D0) and D15. B) Actin, ERCC1, CSA, CSB, XPA, XPC and XPD mRNA expression comparing diagnosis (D0) and D35.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first report to evaluate DNA damage by Comet Assay in bone marrow cells from children with ALL during induction therapy. Thus, we demonstrate for the first time that cells with DNA damage decreases during chemotherapy induction of ALL samples. In contrast, even with the treatment, DNA damage index does not increase.

DNA damaging drugs have been widely used in cancer treatment. Cancer cells are capable of ignoring cell-cycle checkpoints, achieving high proliferation rates. This also makes them more susceptible to DNA damage, since replicating damaged DNA increases the likelihood of cell death [3].

The Alkaline Comet Assay is a genotoxicity test capable of detecting DNA damage in individual cells. More recently, its use has been approved to determine the biological answer to chemotherapy drugs in breast and colon cancer [17,18]. Non-damaged DNA keeps an organized structure inside the nucleus, but becomes disrupted when cell is harmed [17]. The assay can detect pre-mutagenic lesions [19], such as breaks (single and double), alkali-labile damage, crosslinks and breaks from excision repair [12-14].

ALL GBTLI 2009 Protocol uses drugs that damages DNA. Methotrexate prevents DNA synthesis by inhibiting dihydrofolate reductase, interfering with DNA replication. Daunorubicin is a topoisomerase II poison and also have additional antitumor mechanisms, such as intercalating into DNA, generating free radicals, binding and alkylating DNA and inducing apoptosis [6]. Among its more significant genotoxic side effects is their well-documented cardiotoxicity [20]. Cyclophosphamide is a potent genotoxic agent, causing inter-strand crosslinks [1]. Glucocorticoids used in leukemia treatment also have cytotoxic effect, apparently mediated through glucocorticoid receptors [7]. Because of these clear genotoxic mechanisms generated by chemotherapy, we expected an increase in DNA damage at the end of induction. Instead, apart from not finding this damage increase, we found a decrease in cells with low damage. Also, in leukemia diagnosis, we saw that children with ALL have low to moderate DI, when compared to healthy children exposed to tobacco

smoke [21]. Moreover, even patients who used high risk protocols, and consequently higher drugs doses, did not have higher DI during induction. These unexpected findings contributed to the beginning of understanding DNA damage response in this pediatric disease.

The non-increase of damage during induction could be explained by the constant activation of DNA repair mechanisms in these cells. This is corroborated by the fact that the low damages (types 1 and 2) cells decreased between diagnosis and the end of induction (D35). It is not known if the repair pathways are stimulated in the oncogenic cell as a tumor response, as a defense from chemotherapy, or if in the very development of leukemia, already occurs an hyper-activation of these pathways, implicated in the pathogenesis of the disease.

NER pathway involves more than 30 protein-protein interactions and removes DNA adducts caused by chemotherapy [22]. It is divided into two arms: global genome nucleotide excision repair (GG-NER) - that recognizes lesions anywhere in genome - and transcription-coupled repair (TC-NER) - that recognizes only lesions in actively transcribed genes [23]. These two arms differ in the mechanisms involved in DNA recognition, but share the same process in posterior lesion, incision, repair and ligation [24]. In GG-NER, XPC-Hhr23b complex is responsible for recognition, while in TC-NER, CSA and CSB are the proteins responsible for this recognition, in response to RNA Polymerase stop in the presence of a damage. After this stage, XPA verify lesion, RPA stabilizes the enzymatic complex and XPD/XPB are helicases with catalytic activity necessary to unwind the DNA proximity of the lesion. Finally XPF-ERCC1 and XPG are responsible for incision in 5' and 3', respectively [24].

The early oncogenic events can induce accumulation of DNA damage by directly altering the pathways involved in repair or by inducing oxidative stress. By hyper-activating error-prone DNA damage response pathways or by inactivating cell cycle checkpoints, the leukemic cells will attempt to deal with the increasing accumulation of DNA damage. This could result in further accumulation of genetic aberrations and various mutations associated with genomic instability. A study about polymorphisms of multiple genes [25], showed the importance of genes such as ERCC1, XPA and DDB2 in this process. They suggest that NER key proteins may be important prognostic biomarkers. ERCC1 is over expressed in cancer cells [26,27] and XPA is responsible to recruit ERCC1 to the damaged point [22]. Recent studies are already evaluating NER inhibitors for combination cancer therapy, with positive results based on the effect of XPA-ERCC1 interaction [22]. Polymorphic variants of XPD (Lys751Gln) were associated with bad prognosis and increased risk of developing t-AML. XPC Ala499Val was also associated with bad prognosis, and XPA UTR 5'-A with reduced overall survival and increased chemoresistance risk [24].

When evaluating patients with positive MRD, we saw the reduction in the number of damage cells (types 1 and 2) comparing D0 and D35. In fact, it would be expected that the increase in DI induced by chemotherapy lead the cell to apoptosis dependent damage. The DNA damage decrease suggests an escape from apoptotic pathways of these bone marrow cells from patients with positive MRD. These patients probably suffer disturbances in their DNA damage mechanisms as a result of chemotherapy and the characteristics of their clonal cells. This lesions reduction may be due to multiple cell processes to maintain genomic integrity, such as the different repair mechanisms. Other pathways which must be emphasized are those

involved in detoxification and drug metabolism, and those activating genes involved in preventing the influx and/or facilitating drug efflux accumulated within the cells [28,29]. Although we did not observe an increase in the expression of NER repair genes, other repair pathways may be involved in the correction of these lesions. Microenvironmental mechanisms produced by tumor cells survivals could contribute to keep the tumor viability on patients with positive MRD, maintaining the activation of repair pathways. A study from Seo and Kinsella [30] found that the inhibition of the BER (Base Excision Repair) pathway in an acidic tumor microenvironment increases oxidative DNA damage, resulting in DNA double-strand breaks and cell death. The up-regulation of BER in solid cancers may represent an adaptive survival response, and BER inhibition could be used as a therapeutic target [30].

Indeed, the DDR is involved in tumor response and resistance to chemotherapy. Aberrant DNA damage response might induce a chemoresistant phenotype as a result of increased ability to repair DNA damage lesions [24]. This behavior could also be involved in further risk of selecting resistance clones future responsible for leukemia relapse. In small cell lung cells, the functional status of DNA repair pathways determine the sensibilization effect of cisplatin [11]. Cisplatin induces inter-strand crosslinks, the most genotoxic and cytotoxic lesions that are repaired by the NER pathway. In cisplatin resistant cells there is an increased NER activity. The DNA repair pathway is required to maintain the stability and integrity of DNA for normal cell survival, otherwise, the rate of cell death, genetic mutations, or transformation of tumor cells is increased [31]. However, cancer cells generally have deficiencies in DNA repair pathway, which renders the cancer cells more vulnerable to genotoxic treatment, but may also lead to resistance if one DNA repair pathway is

over-activated [32]. The increase in DNA repair definitely contributes to drug resistance and the risk of relapse.

According to these findings, the inhibition of DNA repair pathway represents a promising strategy for chemotherapeutic resistance in AML. In this sense, recent studies show that ERCC1 may reflect sensitivity to drugs and its overexpression clinical outcome in lung cancer non-small cells [11]. This study shows that there is an over expression of ERCC1 in resistant cell lines. The detection of ERCC1 and other genes involved in resistance could be useful for prognosis and individualized treatment.

DDR pathways also have important implications in cancer development, as defects in a number of DDR genes lead to genomic instability and are associated with cancer predisposition [33]. Thus, identifying genes that are required to respond to DNA-damaging agents will allow a better understanding of cancer biogenesis and highlight potential targets for anticancer drug development. The response to damage is also responsible for futures consequences, since therapy-related myeloid neoplasms are the most prevalent forms of secondary cancer, examples of disorders related to previous exposure to chemotherapy/radiation and consequently drug induced damage [1].

Therefore, the hyper-activation of repair pathways could be involved in the selection of resistant stem cells, which could further contribute to a relapse. These resistant clones, which could be quiescent after the end of induction, even not being detected by MRD assays, could be responsible for the difficulty of treating children with relapse. We already know that altering the repair mechanisms is only one of the responses of stem cell plasticity [11]. Indeed, several studies have demonstrated that

an increase in the expression of the different repair pathways allow AML cells to become resistant to chemotherapy present a risk of relapse [16,24,34]. These evidences suggest an association between tumor aggression/development of resistant stem cells and hyper-activation of repair pathways.

In fact, the extent of the damage assessed by the Comet Assay is a result of a dynamic process that is taking place into the cell. A group of genes and pathways are working together to maintain the cell integrity. Thus, recent studies have shown that the amount of damage is closely related to the balance of the expression of genes involved in the activation of drugs, as well as pathways involved in detoxification and defense mechanisms, may reflect the sensitivity to treatment. These studies emphasizes that use of the Comet Assay to test response to therapy can be a very effective tool to evaluate resistance, when compared with analysis using single molecular markers [14,35].

In our sample of patients, we did not have the sufficient follow-up time to detect how these alterations in DNA damage responses will be correlated with poor outcomes in the future.

In the case of the single patient who has shown a different behavior in gene expression, it was observed a decrease in the overall expression of NER repair genes coupled with high damage rate at D15. What suggest that the treatment may have been so effective that even global repair mechanisms may have been affected. It is important to note that this patient had negative MRD in D15 and D35, and it is currently in maintenance therapy in complete remission of the disease. Thus, it appears that the decreased expression of NER repair genes directly impacted on the

increase on DNA damage, probably triggering the apoptotic dependent damage pathway.

Perhaps, in the future, assessment of DDR mechanisms in diagnosis and during treatment could be used to predict resistance to chemotherapy and prognosis. Furthermore, the inhibition of DNA repair pathways represents a promising strategy to reverse chemotherapy resistance.

5. Conclusions

DNA damage levels and global DNA repair may influence the clinical outcome of patients with cancer, because of drug resistance and risk of relapse. In pediatric ALL, we analyzed for the first time DNA damage and repair behavior in samples from bone marrow. Our findings suggest that the DNA damage responses deserve to be investigated in short and long term in this population. Evaluating DNA damage using the Comet Assay could help in understanding minimal residual disease and clinical implications on the future. NER pathway remained the same during the induction process, however, in a single patient, a significant decrease was observed, maybe due to silencing or downregulation of repair pathways. Monitoring patient's outcomes will help to access the implication of our findings in cure and relapse rates.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Health/CNPq/FAPERGS PPSUS grant number 1245-2551/13- 0023 to C.B.F., the Children's Cancer Institute (ICI), and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

Conflict of interest statement

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

- [1] Casorelli, I., Bossa, C., & Bignami, M. (2012). DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *International journal of environmental research and public health*, 9(8), 2636-2657.
- [2] Pui, C. H., Carroll, W. L., Meshinchi, S., & Arceci, R. J. (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *Journal of Clinical Oncology*, 29(5), 551-565.
- [3] Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chemistry & biology*, 20(5), 648-659.
- [4] di Fagagna, F. D. A., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., ... & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198.
- [5] Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., ... & Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255), aaa5612.

- [6] Minotti, G., Recalcati, S., Menna, P., Salvatorelli, E., Corna, G., & Cairo, G. (2004). Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods in enzymology*, 378, 340-361.
- [7] Quddus, F. F., Leventhal, B. G., Boyett, J. M., Pullen, D. J., Crist, W. M., & Borowitz, M. J. (1985). Glucocorticoid receptors in immunological subtypes of childhood acute lymphocytic leukemia cells: a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer research*, 45(12 Part 1), 6482-6486.
- [8] O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA damage response in cancer. *Molecular cell*, 60(4), 547-560.
- [9] Hoeijmakers, J. H. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 28;38(1):17-22; discussion 22-3. Review.
- [10] Hoeijmakers, J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475-1485.
- [11] Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M. C., & Zeniou, M. (2016). Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells International*, 2016.
- [12] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- [13] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ...& Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- [14] Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., ...& Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

- [15] Nadin, S. B., Vargas–Roig, L. M., & Ciocca, D. R. (2001). A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9), 1183-1186.
- [16] Wang, S., Liu, F., Zhu, J., Chen, P., Liu, H., Liu, Q., & Han, J. (2016). DNA Repair Genes ERCC1 and BRCA1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Chemotherapy Drug Resistance. *Medical Science Monitor*, 22, 1999-2005.
- [17] Apostolou, P., Toloudi, M., Kourtidou, E., Mimikakou, G., Vlachou, I., Chatziioannou, M., & Papatirou, I. (2014). Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 1.
- [18] Bowman, K. J., Al-Moneef, M. M., Sherwood, B. T., Colquhoun, A. J., Goddard, J. C., Griffiths, T. R., ... & Summerton, D. J. (2014). Comet assay measures of DNA damage are predictive of bladder cancer cell treatment sensitivity in vitro and outcome in vivo. *International Journal of Cancer*, 134(5), 1102-1111.
- [19] Kammann, U., Bunke, M., Steinhart, H., & Theobald, N. (2001). A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 498(1), 67-77.
- [20] Olson, R. D., & Mushlin, P. S. (1990). Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *The FASEB journal*, 4(13), 3076-3086.
- [21] Beyoglu, D., Ozkozaci, T., Akici, N., Omurtag, G. Z., Akici, A., Ceran, O., & Sardas, S. (2010). Assessment of DNA damage in children exposed to indoor tobacco smoke. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(1), 40-43.
- [22] Gentile, F., Tuszyński, J. A., & Barakat, K. H. (2016). New design of nucleotide excision repair (NER) inhibitors for combination cancer therapy. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 65, 71-82.

- [23] Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(7), 465-481.
- [24] Esposito, M. T., & So, C. W. E. (2014). DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. *Chromosoma*, 123(6), 545-561.
- [25] Liu, J., Deng, N., Xu, Q., Sun, L., Tu, H., Wang, Z., ... & Yuan, Y. (2016). Polymorphisms of multiple genes involved in NER pathway predict prognosis of gastric cancer. *Oncotarget*.
- [26] Nospikel, T. D. N. A. (2009). DNA repair in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 994-1009.
- [27] Ferry, K. V., Hamilton, T. C., & Johnson, S. W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1–XPF. *Biochemical pharmacology*, 60(9), 1305-1313.
- [28] Chapman, J. R., Taylor, M. R., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell*, 47(4), 497-510.
- [29] Caldecott, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 619-631.
- [30] Seo, Y., & Kinsella, T. J. (2009). Essential role of DNA base excision repair on survival in an acidic tumor microenvironment. *Cancer research*, 69(18), 7285-7293.
- [31] Wang, P., Ma, D., Wang, J., Fang, Q., Gao, R., Wu, W., ... & Li, Y. (2016). INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Tumor Biology*, 1-11.
- [32] Hähnel, P. S., Enders, B., Sasca, D., Roos, W. P., Kaina, B., Bullinger, L., ... & Kindler, T. (2014). Targeting components of the alternative NHEJ pathway sensitizes KRAS mutant leukemic cells to chemotherapy. *Blood*, 123(15), 2355-2366.

- [33] Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chemistry & biology*, 20(5), 648-659.
- [34] Seedhouse, C. H., Hunter, H. M., Lloyd-Lewis, B., Massip, A. M., Pallis, M., Carter, G. I., ...& Russell, N. H. (2006). DNA repair contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412. *Leukemia*, 20(12), 2130-2136.
- [35] Wood, J. P., Smith, A. J., Bowman, K. J., Thomas, A. L., & Jones, G. D. (2015). Comet assay measures of DNA damage as biomarkers of irinotecan response in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer medicine*, 4(9), 1309-1321.

Supplementary Table 1: Drugs used on Brazilian Group Treatment of Leukemia in Childhood (GBTLI 2009) Protocol for B and T-Cell ALL during induction therapy.

	Drug	PRED	MTX IT	L- Asp	VCR	DNR	Dex	MADIT	CYP
Low Risk	Standard	X	X	X	X	X	X	X	
	Intermediate	X	X	X	X	X	X	X	X
High Risk	Fast Response	X	X	X	X	X	X		
	Low Response	X	X	X	X	X	X		X

Legend

PRED: prednisone; MTX IT: intrathecal methotrexate; L-Asp: L-Asparaginase; VCR: Vincristine; DNR: Daunorubicin; Dex: Dexamethasone; MADIT: intrathecal methotrexate, cytarabine and dexamethasone; CYP: cyclophosphamide.

Supplementary Table 2: Modes of action of chemotherapy used in induction therapy.

Drug	Mode of action
Methotrexate	Folate antimetabolite that inhibits DNA synthesis, repair, and cellular replication. Irreversibly binds to and inhibits dihydrofolate reductase, inhibiting the formation of reduced folates, and thymidylate synthetase, resulting in inhibition of purine and thymidylic acid synthesis, thus interfering with DNA synthesis, repair, and cellular replication. Cell cycle specific for the S phase of the cycle. Actively proliferative tissues are more susceptible to the effects of methotrexate.
Vincristine	Binds to tubulin and inhibits microtubule formation, therefore, arresting the cell at metaphase by disrupting the formation of the mitotic spindle; it is specific for the M and S phases. Vincristine may also interfere with nucleic acid and protein synthesis by blocking glutamic acid utilization.
L-Asparaginase	In leukemic cells, asparaginase hydrolyzes L-asparagine to ammonia and L-aspartic acid, leading to depletion of asparagine. Leukemia cells, especially lymphoblasts, require exogenous asparagine; normal cells can synthesize

	<p>asparagine. Asparagine depletion in leukemic cells leads to inhibition of protein synthesis and apoptosis. Asparaginase is cycle-specific for the G₁ phase.</p>
Cyclophosphamide	<p>Alkylating agent that prevents cell division by cross-linking DNA strands and decreasing DNA synthesis. It is a cell cycle phase nonspecific agent. Cyclophosphamide also possesses potent immunosuppressive activity. Cyclophosphamide is a prodrug that must be metabolized to active metabolites in the liver.</p>
Daunorubicin	<p>Inhibits DNA and RNA synthesis by intercalation between DNA base pairs and by steric obstruction. Daunomycin intercalates at points of local uncoiling of the double helix. Although the exact mechanism is unclear, it appears that direct binding to DNA (intercalation) and inhibition of DNA repair (topoisomerase II inhibition) result in blockade of DNA and RNA synthesis and fragmentation of DNA.</p>
Cytarabine	<p>Inhibits DNA synthesis. Cytarabine gains entry into cells by a carrier process, and then must be converted to its active compound, aracytidine triphosphate. Cytarabine is a pyrimidine analog and is incorporated into DNA; however, the primary action is inhibition of DNA polymerase resulting in decreased DNA synthesis and repair. The degree of cytotoxicity correlates linearly with incorporation into DNA; therefore, incorporation into the DNA is responsible for drug</p>

	activity and toxicity. Cytarabine is specific for the S phase of the cell cycle (blocks progression from the G1 to the S phase).
--	--

Source: UpToDate®

4. DISCUSSÃO

O acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais caracterizam as leucemias. Por serem os tumores mais frequentes e representar um terço de todas as neoplasias malignas na infância (Belson et al., 2007), além de ter uma média de taxa de cura acima dos 70%, entretanto, apresentando taxas de recidiva perto de 30%, e a despeito dos avanços das últimas décadas, as leucemias linfoides agudas (LLAs) necessitam de contínua investigação para tentar elucidar os diferentes mecanismos envolvidos nos processos intrínsecos da doença, buscando melhorias na terapêutica atual.

O ensaio cometa alcalino (ECA), que detecta danos no DNA, como quebras de fita é especialmente relevante para a avaliação do processo de reparo do DNA. Em comparação com outros ensaios de danos no DNA, o mesmo é rápido, sensível, de fácil visualização e barato, e, através da conversão de dano oxidativo ao DNA em quebras de fita usando enzimas de reparo específicas, o ensaio pode medir dano oxidativo ao DNA de uma forma eficiente, rápida e com ótimo custo-benefício (Ding et al., 2016). Na compreensão da necessidade de investigar o processo de dano ao DNA de pacientes pediátricos com LLA, demonstramos pela primeira vez que os baixos níveis de danos de DNA diminuem durante a terapia de indução nas amostras de medula óssea avaliadas dos pacientes. Em contraste, mesmo com o tratamento, o índice de dano global de DNA não aumentou. Este é o primeiro trabalho que avaliou o dano ao DNA através de ECA em células de medula óssea de crianças com LLA durante a terapia de indução.

Fármacos utilizados na quimioterapia exercem os seus efeitos principalmente por causar danos no DNA, como, por exemplo, fármacos quimioterápicos utilizados no protocolo GBTLI 2009. Melhoria em resposta a danos no DNA (DDR) é considerada um mecanismo-chave que permite que as células cancerosas sobrevivam através da eliminação das lesões no DNA danificado e, assim, o desenvolvimento de mecanismo de resistência aos agentes que danificam o DNA (Khongkow et al., 2016). Se o DNA danificado não está devidamente reparado, pode

ocorrer a morte celular. As células cancerosas são capazes de ignorar *checkpoints* do ciclo celular, alcançando altos índices de proliferação. Isso também torna mais suscetíveis a danos no DNA, uma vez que replicar o DNA danificado aumenta a ocorrência de morte celular (Cheung-Ong 2013).

Em nossas análises, não verificamos diferença (aumento) nos índices de danos de DNA ao longo da indução. Contudo, verificamos uma diminuição de células com baixos danos. Esperar-se-ia um aumento nos danos do DNA ao longo da indução gerados pela quimioterapia, devido a esses mecanismos genotóxicos, porém, isso não foi demonstrado. Mesmo os pacientes que utilizaram protocolos de alto risco e, conseqüentemente, as doses mais elevadas e regimes mais intensos dos fármacos pertencentes ao protocolo, não têm maior índice de dano (ID) durante a indução. Algumas hipóteses foram levantadas durante a análise desses resultados. Entre elas, o não aumento de danos durante a indução pode ser explicado pela constante hiper-ativação de mecanismos de reparo nestas células. Não se sabe se as vias de reparo sofrem estímulo na célula oncogênica como resposta do tumor frente à quimioterapia, como um mecanismo de defesa, ou se no próprio desenvolvimento da leucemia já está ocorrendo uma sinalização dessas vias, produzindo reparos que desencadeiam diminuição do dano em um eventual embate frente a fármacos na quimioterapia, durante a terapêutica. Isso é corroborado pelo fato de que o número de células com dano baixo (1 e 2) diminuiu entre o diagnóstico (D0) e o fim da indução (D35). Este foi o primeiro relato que pode demonstrar o comportamento do dano de DNA ao longo da indução a quimioterapia em pacientes pediátricos com LLA.

Ao avaliar pacientes com Doença Residual Mínima (DRM) positiva, vimos a redução do número de células de danos (Tipo 1 e 2) comparando D0 e D35. De fato, também seria de se esperar que o aumento do ID induzido pelo tratamento quimioterápico levasse as células a danos dependentes de apoptose. A redução do dano, no entanto, sugere uma fuga a partir de vias apoptóticas destas células na medula óssea de pacientes com DRM positiva. Provavelmente estes pacientes sofrem perturbações nos seus mecanismos de danos no DNA, como resultado de quimioterapia e as características intrínsecas de suas células, através de processos

epigenéticos buscando manter a integridade genômica, bem como os diferentes mecanismos de reparo.

Outras vias que devem ser salientadas são aquelas que estão envolvidas no metabolismo e desintoxicação de fármacos, e a presença de genes ativadores que devem estar envolvidos na prevenção do influxo e/ou facilitar o efluxo de fármaco acumulado no interior das células (Caldecott, 2008; Chapman et al., 2012), como Pgp (glicoproteína-P), um importante fator envolvido no efluxo de fármacos e processos de resistência (Li et al., 2016).

O sistema de reparos a danos do DNA é complexo e compreende várias vias: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), recombinação homóloga (HR) e NHEJ (*nonhomologous end-joining*). A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é a via de reparo de DNA mais versátil e flexível nas células (Costa et al., 2003). Esta via é capaz de reparar um grande número de lesões no DNA e pode restaurar a informação genética correta. A abundância de bases e nucleotídeos no genoma faz com que NER seja a via de reparo mais importante (Melis et al., 2011). A via de NER compreende mais de 30 interações proteína-proteína e trabalha removendo os danos de DNA causados por agentes internos e externos, incluindo a quimioterapia (Gentile et al., 2016). A via de NER é dividida em dois braços: NER no genoma global (GG-NER), que reconhece lesões em qualquer posição no genoma e NER acoplado à transcrição (TC-NER), que reconhece apenas lesões em genes ativamente transcritos (Marteijn et al., 2014). As lesões que distorcem as hélices, que são induzidas por UV, do tipo 6-4-PPs, são rapidamente reconhecidas por GG-NER (Garinis et al., 2006). Já TC-NER é responsável por eliminar lesões da fita transcrita de genes ativos. Este processo de reparo cuida do bloqueio de lesões da maquinaria de transcrição e subsequentes potenciais disfunções. Após TC-NER ser diretamente acoplada à maquinaria de transcrição ela é considerada como tendo ação rápida e mais eficiente que GG-NER, mas somente é iniciada quando a transcrição de um gene é bloqueada. Estas duas sub-vias diferem nos mecanismos envolvidos no reconhecimento de DNA, mas partilham o mesmo processo na lesão posterior: reconhecimento do dano ao DNA,

desenrolamento das hélices do DNA, remoção de oligonucleotídeos danificados mediada por endonucleases e, por fim, síntese do reparo do DNA.

Com o reparo do DNA que desempenha um papel crucial no desenvolvimento, progressão e resposta à terapia para uma ampla gama de tipos de câncer, não é surpreendente o fato de haver um aumento dos esforços de validação de resposta a danos no DNA e proteínas de reparo como alvos terapêuticos e desenvolver agentes contra esses alvos.

Há um esforço enorme no sentido de desenvolver fármacos e melhorar a terapêutica frente ao processo reparo de dano ao DNA em células de câncer. Algumas estratégias, tais como: desenvolvimento de inibidores de PARPs- Poly(ADP-ribose) polimerases, inibidores de NER em combinação com compostos de platina, terapia alvo de reparo a quebras de dupla fita de DNA, inibidores de cinases envolvidas em resposta ao dano de DNA (DDR), inibidores da via de BER, entre outras (Gavande et al., 2016) estão em desenvolvimento, algumas com novos fármacos já em uso em estudos, demonstrando a importância e a urgência no sentido de melhorar o tratamento atual dos diversos tipos de câncer.

Em um estudo com pacientes pediátricos com LLA, foi avaliado a expressão de PARPs- Poly(ADP-ribose), uma proteína nuclear que impacta o reparo ao DNA e apoptose, e verificou-se a super-expressão de PARP em pacientes maus respondedores ao tratamento, sugerindo que possa contribuir para o insucesso do tratamento neste grupo de crianças com LLA. Essa observação - se confirmado por outros estudos - podem formar a base racional para a administração de inibidores de PARP em subconjuntos selecionados de todas as crianças (Kruk et al., 2015).

Neste trabalho, na análise da expressão de mRNA, não se observou um aumento na expressão de genes de reparo de NER. Outras vias de reparo, tais como BER, HR ou NHEJ podem estar envolvidos na correção dos diversos mecanismos de lesão.

A via de reparo do DNA é necessária para manter a estabilidade e a integridade do DNA para a sobrevivência da célula normal, caso contrário, a taxa de morte celular, mutações genéticas, ou a transformação de células tumorais é

aumentada (Wang et al, 2016). No entanto, as células cancerígenas têm, geralmente, deficiências na via de reparo do DNA, o que torna as células de câncer mais vulneráveis quando submetidas ao tratamento genotóxico, mas também pode levar a resistência, se as vias envolvidas nesse processo estiverem super-ativadas (Hähnel et al., 2014). O aumento no reparo de DNA definitivamente contribui para a resistência à fármacos e para o risco de recaídas. A manutenção da normalidade da atividade de reparo de vias como NER e BER pode prevenir a progressão do câncer (Savina et al., 2016). No caso do único paciente que foi verificado um comportamento diferente na expressão dos genes analisados, foi observado um decréscimo considerável na expressão de genes de reparo geral da via do NER, conjuntamente à alta taxa de danos no D15. Assim, sugerimos que o tratamento pode ter sido tão eficaz que os mecanismos de reparação, mesmo globais, podem ter sido comprometidos. É importante notar que este paciente teve Doença Residual Mínima (DRM) negativa em D35. Assim, verifica-se que a diminuição da expressão de genes de reparo da via do NER possa estar diretamente relacionada com o aumento em danos no DNA, provavelmente por desencadear a via apoptótica dependente de danos.

5. CONCLUSÕES

Em 2015 o sueco Tomas Lindahl, o americano Paul Modrich e o turco Aziz Sancar receberam o prêmio Nobel de química por seus trabalhos para mapear os mecanismos biomoleculares naturais com as quais as células reparam erros no DNA e preservam sua informação genética (Gavande et al., 2016). Certamente, isso sinaliza a importância do tema. No presente trabalho foi possível investigar e verificar pela primeira vez o impacto do dano ao DNA em leucemia linfóide aguda pediátrica, analisando o mesmo sob o ponto de vista de dano intrínseco das células, ou em decorrência do tratamento, bem como investigar a participação de vias de reparo a esses danos.

Vimos que o índice de dano não demonstrou diferença significativa ao longo do tratamento, outrossim, baixos danos de DNA diminuíram ao longo da indução. Este resultado se confirmou em pacientes que apresentaram doença residual mínima positiva.

A diferença observada em danos menores ao DNA, indica que o Ensaio Cometa Alcalino pode ser uma ferramenta importante e útil para o prognóstico e o manejo no tratamento dos pacientes.

Apesar do pequeno número de pacientes alocados para o estudo, foi possível analisar, pela primeira vez, o dano de DNA em amostras de pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, e concluir que complexos de reparo merecem ser investigados a curto e em longo prazo. Da mesma forma, ao avaliarmos que a via de NER permaneceu constante durante o processo de indução, no entanto, em um único paciente, foi observada uma diminuição significativa, talvez devido ao silenciamento ou a regulação negativa das vias de reparo. Acompanhamento dos resultados do paciente poderá ajudar a elucidar a implicação dos nossos achados em taxas de cura e de recidiva. Esse importante achado, do único paciente que demonstrou diminuição na expressão de RNA mensageiro de todos os genes analisados, ao longo da indução, diferentemente dos demais pacientes analisados, sublinha uma importante linha de raciocínio no sentido da medicina personalizada e

de investigação e estudos visando a esse fim, com o objetivo de melhorar a terapêutica existente.

Talvez, no futuro, avaliar a situação do DNA e suas vias de resposta ao dano no diagnóstico e durante o tratamento poderá ser usado para prever (e prevenir) a resistência à quimioterapia e o prognóstico. Além disso, a inibição das vias de reparo de DNA representa uma estratégia promissora para prevenir resistência à quimioterapia, embora sejam necessários mais estudos para fortalecer os achados presentes.

6. REFERÊNCIAS

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/d_efinicao+ Acesso em 26/09/2016 às 14h11mn.

http://sobope.org.br/apex/f?p=106:13:12156175869097::NO::DFL_PAGE_ID:201 Acesso em 26/09/2016 às 14h19min.

Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(1):138-45.

Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric clinics of North America* 2015; 62(1):47-60.

Arora RS, Arora B. Acute leukemia in children: A review of the current Indian data. *South Asian Journal of Cancer* 2016; 5(3):155.

Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol.* 2000; 12(1):3-12.

Pui CH, Pei D, Campana D, Cheng C, Sandlund JT, Bowman WP, ... & Howard SC. A revised definition for cure of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2014; 28(12):2336-2343.

Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350:1535-1548.

Pui CH, Raskind WH, Kitchingman GR, et al. Clonal analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with "cytogenetically independent" cell populations. *J Clin Invest* 1989; 83:1971-1977.

Gale RE, Wainscoat JS. Annotation: clonal analysis using X-linked DNA polymorphisms. *Br J Haematol* 1993; 85:2-8.

<https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>. Acesso em 19/10/2016 às 15h30min.

Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371:1030-1043.

Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Philips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor – and Down syndrome – associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009; 41:1243-1246.

Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; 453:110-114.

Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360:470-480.

Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:9414-9418.

Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 2011; 471:235-239.

Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:639-649.

Pui CH, Relling MV. Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 109:13-23.

Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000; 96:24-33.

Kosmidis HV, Lusher JM, Shope TC, et al. Infections in leukemic children: a prospective analysis. *J Pediatr* 1980; 96:814-819.

Jonsson OG, Sartain P, Ducore JM, et al. Bone pain as an initial symptom of childhood acute lymphoblastic leukemia: association with nearly normal hematologic indexes. *J Pediatr* 1990; 117:233-237.

Pui CH, Stass S, Green A. Bone marrow necrosis in children with malignant disease. *Cancer* 1985; 56:1522-1525.

Bunin N, Rivera G, Goode F, et al. Ocular relapse in the anterior chamber in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1987; 5:299-303.

Lo Curto M, D'Angelo P, Lumia F, et al. Leukemic ophthalmopathy: a report of 21 pediatric cases. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23:8-13.

Kim TH, Hargreaves HK, Chan WC, et al. Sequential testicular biopsies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1986; 57:1038-1041.

Haidar C, Jeha S. Drug interactions in childhood cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:92-99.

Tubergen DG, Gilchrist GS, O'Brien RT, et al. Improved outcome with delayed intensification for children with acute lymphoblastic leukemia and intermediate presenting features: a Children's Cancer Group phase III trial. *J Clin Oncol* 1993; 11:527-537.

Hutchinson RJ, Gaynon PS, Sather H, et al. Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group trial 1881. *J Clin Oncol* 2003; 9:1790-1797.

Lange BK, Bostrom BC, Cherlow JM, et al. Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 2002; 99:825-833.

Seibel NL, Steinherz PG, Sather HN, et al. Early postinduction intensification therapies improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2008; 111:2548-2555.

Nachman JB, La MK, Hunger SP, et al. Young adults with acute lymphoblastic leukemia have an excellent outcome with chemotherapy alone and benefit from intensive post induction treatment: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2009; 27:5189-5194.

Pui CH, Cheng C, Leung W, et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349:640-649.

Hijiya N, Hudson MM, Lensing S, et al. Cumulative incidence of secondary neoplasms as a first event after childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 2007; 297:1207-1215.

Ritchev AK, Pollock B, Lauer SJ, et al. Improved survival of children with isolated CNS relapse of acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1999; 17:1354-1361.

Toyoda Y, Manabe A, Tsuchida M, et al. Six months of maintenance chemotherapy after intensified treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol* 2000; 18:1508-1516.

Shuster JJ, Wacker P, Pullen J, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1998; 16:2854-2863.

Pui CH, Boyett JM, Relling MV, et al. Sex difference in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1999; 17:818-824.

Childhood ALL Collaborative Group. Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12,000 randomized children. *Lancet* 1996; 347:1783-1788.

Bleyer WA, Sather HN, Nickerson HJ, et al. Monthly pulses of vincristine and prednisone prevent bone marrow and testicular relapse in low-risk childhood acute

lymphoblastic leukemia: a report of the CCG-161 study by the Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 1991; 9:1012-1021.

Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000; 96:24-33.

Pieters R, den Boer ML, Durian M, et al. Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia: implications for treatment of infants. *Leukemia* 1998; 12:1344-1348.

Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, et al. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2006. *J Clin Oncol* 2010; 28:4755-4761.

Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, et al. Long-term result of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). *Leukemia* 2010; 24:320-334.

Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009; 360:2730-2741.

Taylor AMR, Metcalfe JA, Thick J, et al. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 1996; 87:423-438.

Melis JPM, Luijten M, Mullenders LHF, van Steeg H. The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutation Research* 2011; 728:107-117.

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362:709-715.

Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 2003; 531:5-23.

Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, Turchi JS. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics* 2016; 160:65-83.

Rocha JC, Busatto FF, Guecheva TN, Saffi J. Role of nucleotide excision repair proteins in response to DNA damage induced by topoisomerase II inhibitors. *Mutation Research* 2016; 768:68-77.

Casorelli I, Bossa C, Bignami M. DNA Damage and Repair in Human Cancer: Molecular Mechanisms and Contribution to Therapy-Related Leukemias.

International Journal of Environmental Research and Public Health 2012; 9(8):2636-2657.

Quddus FF, Leventhal BG, Boyett JM, Pullen DJ, Crist WM, Borowitz MJ. Glucocorticoid receptors in immunological subtypes of childhood acute lymphocytic leukemia cells: a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer Res.* 1985; 45(12 Pt 1):6482-6.

Esposito MT, So CWE. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. *Chromosoma* 2014; 123:545-61.

Mathews LA et al. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*, cap. 2, 2013.

J. Bartek, J. Lukas. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19:238–245.

Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol.* 2013; 23;20(5):648-59.

Bowman KJ, Al-Moneef MM, Sherwood BT, Colquhoun AJ, Goddard JC, Griffiths TRL, Payne D, Singh S, Butterworth PC, Khan MA, Summerton DJ, Steward WP, McKelvey-Martin VJ, McKeown SR, Kockelbergh RC, Mellon JK, Symonds RP, Jones GDD. Comet assay measures of DNA damage are predictive of bladder cancer cell treatment sensitivity in vitro and outcome in vivo. *Int. J. Cancer* 2014; 134:1102–1111.

Seedhouse CH, Hunter HM, Lloyd-Lewis B, Massip AM, Pallis M, Carter GI, Grundy M, Shang S, Russell NH. DNA repair contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412. *Leukemia* 2006; 20:2130–2136.

Wang P, Ma D, Wang J, Fang Q, Gao R, Wu W, Cao L, Hu X, Zhao J, Li Y. INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Tumor Biol.* 2016.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edition, ASM Press, Washington, 2006.

Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 2003; 85:1083–1099.

Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014. 15; July 2014:465.

Berneburg M, Lehmann AR. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv. Genet* 2001; 43:71–102.

Lehman AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 2003. (in press).

Woods D, Turchi JJ. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther* 2013; 14:379–389.

Guarente LP, Partridge L, Wallace DC. *Molecular Biology of Aging*, 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

Garinis GA, Jans J, van der Horst GT. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. *Future Oncol* 2006; 2:191–199.

Melis JPM, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(18):2409–2419.

Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, van Driel R, van Zeeland A, Mullenders LHF. Sequential assembly of nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 2001; 8:213–224.

Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugasawa K, Ohkuma Y, Hanaoka F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. *J. Biol. Chem* 2000; 275:9870–9875.

Dip R, Camenisch U, Naegeli H. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst.)* 2004; 3:1409–1423.

Araujo SJ, Nigg EA, Wood RD. Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21:2281–2291.

Hoogstraten D, Bergink S, Ng JM, Verbiest VH, Luijsterburg MS, Geverts B, Raams A, Dinant C, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Houtsmuller AB. Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *J. Cell Sci.* 2008; 121:2850–2859.

Sugasawa K. XPC: its product and biological roles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 637:47–56.

Citterio E, van den Boom V, Schnitzler G, Kanaar R, Bonte E, Kingston RE, Hoeijmakers JHJ. RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne's syndrome group B protein interacts with a molecular complex containing the transcription factor IIH component xeroderma pigmentosum B and p62. *Mol. Cell. Biol* 2000; 20:7643–7653.

Tantin D, Kansal A, Carey M. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell Biol.* 1997; 17:6803–6814.

Tantin D. RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne syndrome group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components xeroderma pigmentosum B and p62. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:27794–27799.

Henning KA, Li L, Iyer N, McDaniel LD, Reagan MS, Legerski R, Schultz RA, Stefanini M, Lehmann AR, Mayne LV, Friedberg LC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 1995; 82:555–564.

Nakatsu Y, Asahina H, Citterio E, Rademakers S, Vermeulen W, Kamiuchi S, Yeo JP, Khaw MC, Saijo M, Kodo N, Matsuda T, Hoeijmakers JH, Tanaka K. XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:34931–34937.

Sunesen M, Stevnsner T, Brosh Jr. RM, Dianov GL, Bohr GL. Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. *Oncogene* 2002; 21:3571–3578.

Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 2008; 18:73–84.

Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol. Cell* 2006; 23:471–482.

Oksenysh V, Coin F. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 2010; 9:90–96.

Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JH, Egly JM. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J* 1994; 13:2388–2392.

Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer L, Nigg EA, Hoeijmakers JH, Egly JM. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription–DNA repair factor. *Cell* 1994; 79:1093–1101.

Saijo M, Kuraoka I, Masutani C, Hanaoka F, Tanaka K. Sequential binding of DNA repair proteins RPA and ERCC1 to XPA in vitro. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:4719–4724.

de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; 13:768–785.

Mu D, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem* 1996; 271:8285–8294.

Evans E, Moggs J, Hwang J, Egly J, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997; 16:6559–6573.

Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure specific DNA repair endonuclease. *Cell* 1996; 86:811–822.

Tomkinson AE, Levin DS. Mammalian DNA ligases, *Bioessays* 1997; 19:893–901.

Ding W, Bishop ME, Lyn-Cook LE, Davis KJ, Manjanatha MG. In Vivo Alkaline Comet Assay and Enzyme-modified Alkaline Comet Assay for Measuring DNA Strand Breaks and Oxidative DNA Damage in Rat Liver. *J Vis Exp.* 2016; 4(111). doi: 10.3791/53833.

Khongkow P, Middleton AW, Wong JP, Kandola NK, Kongsema M, de Moraes GN, Gomes AR, Lam EW. In Vitro Methods for Studying the Mechanisms of Resistance to DNA-Damaging Therapeutic Drugs. *Methods Mol Biol.* 2016; 1395:39-53.

Hähnel PS, Enders B, Sasca D, Roos WP, Kaina B, Bullinger L, Theobald M, Kindler T. Targeting components of the alternative NHEJ pathway sensitizes KRAS mutant leukemic cells to chemotherapy. *Blood.* 2014; 123(15):2355-66.

Li K, Li X, Tian J, Wang H, Pan J, Li J. Downregulation of DNA-PKcs suppresses P-gp expression via inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in CD133-positive osteosarcoma MG-63 cells. *Oncol Rep.* 2016; 36(4):1973-80.

Kruk A, Ociepa T, Urański T, Grabarek J, Urańska E. PARP-1 expression in CD34+ leukemic cells in childhood acute lymphoblastic leukemia: relation to response to initial therapy and other prognostic factors. *Pol J Pathol.* 2015; 66(3):239-45.

Savina NV, Nikitchenko NV, Kuzhir TD, Rolevich AI, Krasny SA, Goncharova RI. The Cellular Response to Oxidatively Induced DNA Damage and Polymorphism of Some DNA Repair Genes Associated with Clinicopathological Features of Bladder Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; doi: 10.1155/2016/5710403.

7. ANEXOS

ANEXOS

Demais publicações as quais participei ativamente durante o período do mestrado.

ARTIGO 1 (aceito):

Portich JP, Gil MS, Dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss F, Gregianin LJ, Brunetto AL, Brunetto AT, Roesler R, de Farias CB. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer Biomark*. 2016 Jul 8. [Epub ahead of print]. PMID:27434294. DOI: 10.3233/CBM-160646.

The image is a screenshot of a PubMed search result page. At the top left is the PubMed logo with the text 'US National Library of Medicine National Institutes of Health'. To the right is a search bar with 'PubMed' selected in a dropdown menu and a search button. Below the search bar are links for 'Create RSS', 'Create alert', and 'Advanced'. The main content area shows the article title in bold: 'Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia.' Below the title is the author list: 'Portich JP^{1,2}, Gil MS^{1,2}, Dos Santos RP^{1,2,3}, Goulart BK⁴, Ferreira MB², Loss JF⁵, Gregianin LJ^{5,6}, Brunetto AL³, Brunetto AT³, Roesler R^{1,2}, de Farias CB^{1,3}.' There is a link for 'Author information'. The 'Abstract' section is expanded, showing the following text: 'BACKGROUND: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, tropomyosin-related receptor kinase B (TrkB) are involved in the maturation of B lymphocytes in the bone marrow (BM), promote cell differentiation in B-cell malignancies, and are associated with poor prognosis in adults with acute leukemia (AL). However, the role of BDNF in pediatric AL remains poorly understood. OBJECTIVE: We carried out a cohort observational study to evaluate BDNF levels in BM or peripheral blood (PB) samples from children with AL. METHODS: BM or PB samples were collected from 57 children and adolescents with acute lymphoid leukemia (ALL), 14 children and adolescents with acute myeloid leukemia (AML), and 44 healthy individuals (HI) of the same age range. RESULTS: BDNF levels at diagnosis in AL patients were significantly lower when compared to HI. Samples from patients in complete remission from disease had higher levels of BDNF compared to those obtained from patients with malignant cells. Moreover, BDNF levels at diagnosis in patients who died were significantly lower compared to those found in survivors. CONCLUSIONS: These findings provide the first evidence for a possible role of BDNF as a marker of active disease and poor prognosis in pediatric AL. KEYWORDS: Brain-derived neurotrophic factor; acute lymphoid leukemia; acute myeloid leukemia; neurotrophin'. At the bottom, the PMID (27434294) and DOI (10.3233/CBM-160646) are listed.

Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma

Tiago Elias Heinen^{1,2}, Rafael Pereira dos Santos^{1,2}, Amanda da Rocha^{1,2}, Michel Pinheiro dos Santos³, Patrícia Luciana da Costa Lopez^{1,2}, Marco Aurélio Silva Filho^{1,2}, Bárbara Kunzler Souza^{1,2}, Luís Fernando da Rosa Rivero⁴, Ricardo Gehrke Becker⁵, Lauro José Gregianin^{1,6,8}, Algemir Lunardi Brunetto⁷, André Tesainer Brunetto⁷, Caroline Brunetto de Farias^{1,7}, Rafael Roesler^{1,2}

¹Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Faculty of Health Sciences, UniRitter Laureate International Universities, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Departament of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Department of Orthopaedics and Traumatology, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁷Children's Cancer Institute (ICI), Porto Alegre, RS, Brazil

⁸Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Rafael Roesler, e-mail: rafael.roesler@pq.onpq.br

Keywords: TrkA, TrkB, neurotrophin, neurotrophin receptor, Ewing sarcoma

Received: October 05, 2015

Accepted: April 10, 2016

Published: April 26, 2016

ABSTRACT

Ewing sarcoma (ES) is a highly aggressive pediatric cancer that may arise from neuronal precursors. Neurotrophins stimulate neuronal development and plasticity. Here, we found that neurotrophins nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), as well as their receptors (TrkA and TrkB, respectively) are expressed in ES tumors. Treatment with TrkA (GW-441756) or TrkB (Ana-12) selective inhibitors decreased ES cell proliferation, and the effect was increased when the two inhibitors were combined. ES cells treated with a pan-Trk inhibitor, K252a, showed changes in morphology, reduced levels of β -III tubulin, and decreased mRNA expression of NGF, BDNF, TrkA and TrkB. Furthermore, combining K252a with subeffective doses of cytotoxic chemotherapeutic drugs resulted in a decrease in ES cell proliferation and colony formation, even in chemoresistant cells. These results indicate that Trk inhibition may be an emerging approach for the treatment of ES.

INTRODUCTION

Tumors of the Ewing sarcoma (ES) family are

malignant properties of ES have been attributed to EWS/FLI1 proteins acting as aberrant transcription factors [4].

Before chemotherapy became available, only about 10% of patients with ES survived [1]. A decrease in