

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Karine Pereira de Andrade

**ENTENDENDO O PAPEL DAS NEUROTROFINAS EM LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTIL**

Porto Alegre

2022

Karine Pereira de Andrade

**ENTENDENDO O PAPEL DAS NEUROTROFINAS EM LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador(a): Prof. Dra. Caroline Brunetto de Farias

Porto Alegre

2022

Karine Pereira de Andrade

**ENTENDENDO O PAPEL DAS NEUROTROFINAS EM LEUCEMIA LINFOIDE
AGUDA INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em
Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Nadja Schroder - UFRGS

Fábio Klamt - UFRGS

Marcelo Land - UFRJ

Caroline Brunetto de Farias - UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Nádia, minha mãe, e ao Eduardo, meu pai, que me ensinaram os valores que tenho como pilares fundamentais de formação. Obrigada por impulsionarem meus sonhos e acreditarem em mim para realizá-los. Ao meu irmão, André, por sempre me enxergar como seu melhor exemplo.

Às memórias de meu avô José, que há um ano partiu de sua vida terrena, na qual sempre estive ao meu lado. A ele, agradeço por sua presença em minha criação e por todo seu amor. A minha avó, Maria, que me proporciona o carinho, o cuidado e o afeto que só se encontra no colo da vó.

Ao meu companheiro, Allan, que encarou essa jornada comigo desde antes de começar e me manteve firme durante todo o percurso. Pelas inúmeras horas de estudo, pela ajuda com as tarefas, pelos desabafos ouvidos, pelos conselhos dados e pela força para continuar a cada etapa.

À Caroline, minha orientadora, que me acolheu sem ao menos me conhecer e me conduziu bravamente pelo caminho da pesquisa em câncer infantil. Obrigada, Carol, por guiar e produzir esse trabalho com a tua experiência impecável, empatia nos momentos difíceis e amizade durante esses anos. Te admiro muito e foi um prazer trabalhar contigo, quinta-feira após quinta-feira.

Ao professor Rafael, por abrir as portas do seu laboratório para esse trabalho, por suas contribuições valiosas e incentivos que me engrandeceram. Aos colegas de laboratório, pesquisadores que são uma grande inspiração, obrigada pela colaboração, desabafos e trabalho em conjunto, em especial para Mariane. Aos colegas que participaram ativamente neste trabalho, Meg, Gustavo e Livia, obrigada pelas ideias originais e discussões para tornar o estudo conciso.

À Livia, amiga que o mestrado me presenteou, obrigada pelas horas de conversa, experimentos intermináveis, estratégias para contornar os obstáculos e pelo teu otimismo para construir esse trabalho. Nossa amizade ultrapassa as paredes do laboratório e agradeço por tua companhia na minha vida.

As minhas amigas, Ingrid, Diane e Juliana por me apoiarem em cada passo, ouvirem minhas angústias e darem conselhos que nem sempre eu gostaria de ouvir, mas que eram necessários.

Aos meus amigos Gregory, Laiza, Leo e Yasmin, agradeço por tornarem sempre mais divertidos os momentos de lazer e entenderem o que é importante para mim, tornando isso também importante para vocês.

Aos pacientes e seus familiares, agradeço por acreditarem na pesquisa com esperança e sobretudo, pela coragem de seguir em frente e enfrentar a batalha contra o câncer.

“A wife who loses a husband is called a widow. A husband who loses a wife is called a widower. A child who loses his parents is called an orphan. There is no word for a parent who loses a child. That’s how awful the loss is.”

Trecho do livro *An Orphan’s Tale* de Jay Neugeboren.

RESUMO

A leucemia é a neoplasia pediátrica mais comum, sendo uma doença heterogênea em que seus subtipos diferem de acordo com características celulares e moleculares, resposta à terapia e risco de recorrência, traçando assim diferentes desfechos. Estudos que investigam mecanismos biológicos envolvidos com esta neoplasia e possíveis alvos moleculares são de extrema importância para o melhor entendimento da doença, prognóstico e definição de novos tratamentos. Sabe-se que alterações nos níveis de neurotrofinas (NT), fatores de crescimento envolvidos na sobrevivência neuronal e processos de plasticidade, estão associados com o desenvolvimento de cânceres. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que baixos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em Medula Óssea (MO) e Sangue Periférico (SP) estão relacionados com o pior prognóstico e doença ativa em pacientes pediátricos. Porém, os motivos que causam esse desfecho são desconhecidos. Este trabalho, portanto, objetiva caracterizar o papel das NTs em leucemia linfóide aguda (LLA) a partir de uma amostragem populacional, investigando a relação dessas proteínas com características clínicas da doença. Para isto, amostras (MO e SP) de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA e atendidos nos serviços de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/RS) e do Hospital da Criança Conceição (GHC/RS) foram coletadas entre 2011 e 2021. Os níveis de Nerve Growth Factor (NGF), BDNF e pro-BDNF foram analisados por teste de ELISA. Além disso, a avaliação da expressão gênica de componentes da via de sinalização de NTs, como seus receptores e proteínas que clivam suas moléculas precursoras (pro-neurotrofinas - pro-NT), foi realizada com ferramentas de bioinformática. Em relação à expressão gênica, encontrou-se NGF e sortilin menos expressos em amostras tumorais quando comparados com amostras de indivíduos saudáveis. BDNF e o receptor de neurotrofina P75^{NTR} foram encontrados superexpressos em amostras de LLA do tipo T, quando comparadas com LLA do tipo B. As enzimas de conversão de pro-NTs a NTs foram encontradas superexpressas em amostras de pacientes pediátricos com LLA. Quanto aos níveis proteicos, observou-se uma tendência de níveis menores de NTs em amostras coletadas no diagnóstico de LLA, quando comparadas com amostras de indivíduos saudáveis. Uma correlação positiva entre BDNF e pro-BDNF foi encontrada. Dessa forma, é possível afirmar que existe um desbalanço das NTs no microambiente tumoral de LLA. Poucos dados estão disponíveis na literatura para comparação e este trabalho contribui para o embasamento científico no contexto de leucemias pediátricas.

Palavras chaves: neurotrofinas - leucemia pediátrica - BDNF - leucemia linfóide aguda

ABSTRACT

Leukemia is the most common pediatric cancer. It is a heterogeneous disease in which its subtypes differ according to cellular and molecular characteristics, response to therapy and risk of recurrence, tracing different outcomes. Studies that investigate biological mechanisms and possible molecular targets in this context are extremely important for improving the understanding of the disease, the patient's prognosis and the emergence of new treatments. Altered levels of neurotrophins (NT), a family of growth factors well known for its involvement in neuronal development, survival and plasticity, is associated with cancer's development. A recent work by our research group has shown that low levels of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Bone Marrow (BM) and Peripheral Blood (PB) are related to poor prognosis and active disease in pediatric patients. However, the reasons for this outcome are unknown. Then, the present work aims to characterize the role of NTs in acute lymphoid leukemia (ALL), investigating the relationship of these proteins with clinical features of the disease. For this purpose, samples (BM or PB) from pediatric patients diagnosed with ALL and treated at the Pediatric Oncology services of the Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA/RS) and the Conceição Children's Hospital (GHC/RS) were collected between 2011 and 2021. The levels of Nerve Growth Factor (NGF), BDNF and pro-BDNF were analyzed by ELISA. The gene expression of NT's signaling pathway components, such as their receptors and proteins that cleave their precursor molecules (pro-neurotrophins - pro-NTs), was performed using bioinformatics tools. NGF and sortilin were found less expressed in tumor samples when compared with health samples, while BDNF and P75^{NTR} were found overexpressed in T-cell tumor and B-cell tumor samples, respectively. Enzyme convertases from pro-NTs to NTs were overexpressed in disease samples. Protein levels were lower in samples at diagnosis when compared to healthy individuals. A correlation between pro-BDNF and BDNF levels during disease was found. Therefore, it is possible to affirm that NTs are altered in tumor-microenvironment in childhood ALL. Further studies are required to understand their complete role in this context.

Keywords: neurotrophins - childhood leukemia - prognosis - BDNF - ALL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação das células sanguíneas (hematopoiese).....	12
Figura 2 – Curva de Sobrevida Kaplan-Meier de acordo com a idade ao diagnóstico de LLA.....	15
Figura 3 – Esquema de tratamento para pacientes pediátricos com LLA.....	16
Figura 4 – Vias de sinalização de BDNF.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)

Doença Residual Mínima - DRM

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA

Leucemia Linfóide Aguda - LLA

Leucemia Linfóide Aguda do tipo B - LLA-B

Leucemia Linfóide Aguda do tipo T - LLA-T

Leucemia Mieloide Aguda - LMA

MMPs - Metaloproteinases

NCI - Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute*)

NGF - Fator de Crescimento Nervoso (*Nerve Growth Factor*)

NT-3 - Neurotrofina 3 (*Neurotrophin-3*)

NT-4 - Neurotrofina 4 (*Neurotrophin-4*)

NTs - Neurotrofinas

OMS - Organização Mundial da Saúde -

p75^{NTR} - Receptor de neurotrofinas P75

pro-NTs - pro-neurotrofinas

SP - Sangue Periférico

Sistema Nervoso Central - SNC

TrkA - Receptor de tropomiosina relacionado à quinase A (*tropomyosin receptor kinase A*)

TrkB - Receptor de tropomiosina relacionado à quinase B (*tropomyosin receptor kinase B*)

TrkC - Receptor de tropomiosina relacionado à quinase C (*tropomyosin receptor kinase C*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Câncer Infantil	11
1.2	Leucemias Pediátricas	12
1.3	Leucemia Linfoide Aguda	13
1.4	Neurotrofinas	17
1.5	Neurotrofinas e Câncer	19
2	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO	24
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	27
6	REFERÊNCIAS	28
	ANEXO A – CARTAS DE APROVAÇÃO DA PESQUISA EM COMITÊS DE ÉTICA: INSTITUTO DO CÂNCER INFANTIL/HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE	35
	ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DA PESQUISA EM COMITÊ DE ÉTICA: HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO/GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO	40
	ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE	44
	ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS - HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO	47
	ANEXO E - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE	50
	ANEXO F - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer infantil

O câncer infantil representa de 0,5 % a 3 % de todos tumores na maioria das populações, sendo as neoplasias pediátricas mais comuns as leucemias, os tumores do sistema nervoso central e os linfomas (BRASIL, 2017). No ano de 2020, foi estimado um total de 8.460 novos casos de câncer infantil no Brasil pelo Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), sendo 4.310 para o sexo masculino e 4.150 para o sexo feminino (INCA, 2020).

O câncer infantil é uma doença invasiva e possui um crescimento mais acelerado que os tumores que acometem os adultos. A doença atinge preferencialmente células indiferenciadas, principalmente dos tecidos sanguíneo e de sustentação, e por esta razão a resposta ao tratamento oncológico é melhor quando comparada aos cânceres adultos, que atingem preferencialmente células especializadas. Dessa forma, existem boas chances de cura e um bom prognóstico associado (BRASIL, 2006), sendo extremamente importante o seu diagnóstico precoce, pois assim se possibilita o tratamento da doença em seus estágios iniciais, além de menos tempo de exposição das crianças e adolescentes aos agentes quimio-radioterápicos (GRABOIS, 2011).

Ao contrário dos tumores adultos, os quais possuem causas multifatoriais bem descritas, como fatores genéticos determinantes e exposição contínua a fatores de risco, as causas do câncer infantil são pouco detalhadas na literatura. Entre as causas já reportadas, estão as alterações no início do processo embrionário para neuroblastomas, bem como anomalias congênitas para tumores de Wilms e também condições genéticas, tais como síndrome de Down para leucemias e síndrome de Li-Fraumeni para osteossarcomas (GRABOIS, 2011).

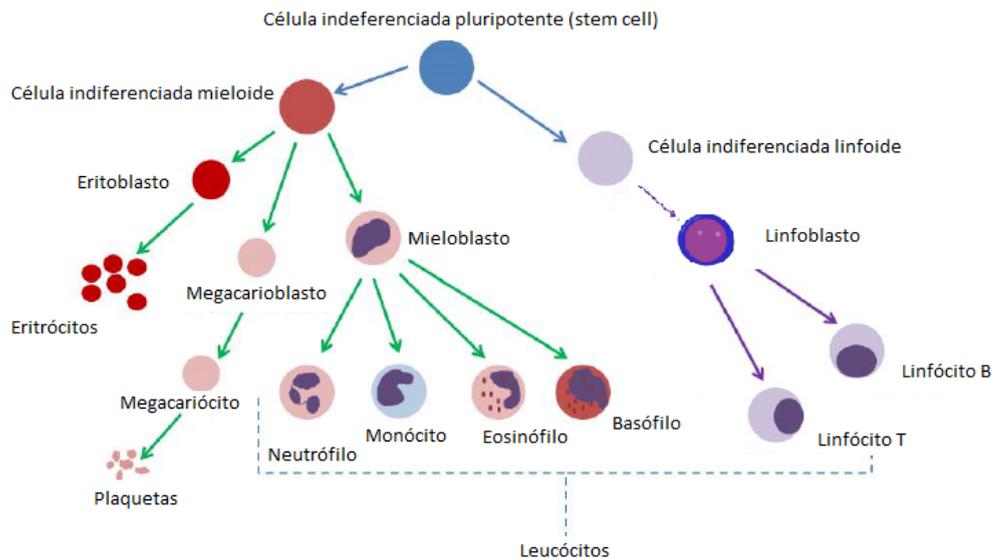
Apesar do bom prognóstico, o câncer infantil é a primeira causa de morte por doenças entre crianças e adolescentes no Brasil. No ano de 2018 foram registradas 2.565 mortes no Atlas de Mortalidade por Câncer do INCA. Desta forma, a fim de melhorar esses números, deve-se priorizar políticas públicas em saúde para o diagnóstico precoce da doença, além da condução de estudos que identifiquem seus mecanismos causais proporcionando melhorias no entendimento científico e avanços na terapêutica.

1.2 Leucemias pediátricas

As leucemias são caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos mal formados na medula óssea e no sangue, o qual resulta na perda da capacidade funcional do tecido hematopoiético (HOFFBRAND et al, 2006; SILVA-JUNIOR, 2019). Conforme a Classificação Internacional de Doenças para a Oncologia da Organização Mundial da Saúde (OMS), a categorização das leucemias é descrita a partir de diferenças morfológicas, imunofenotípicas e citogenéticas entre as linhagens leucocitárias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013).

O estágio de maturação das células determina se a doença será classificada como aguda ou crônica, uma vez que a primeira é derivada da proliferação de células imaturas progenitoras das células sanguíneas na medula óssea, chamadas blastos, e a segunda é derivada de células já maduras (GRIMWADE, 2016). Das leucemias agudas, a leucemia linfóide aguda (LLA) acomete as células precursoras dos linfócitos B ou T, enquanto que na leucemia mieloide aguda (LMA) ocorre a proliferação clonal de precursores de mielócitos, neutrófilos, monócitos eritrócitos e megacariócitos (SETH & SINGH, 2015; GRIMWADE, 2016) (figura 1).

Figura 1 - Formação das células sanguíneas (hematopoiese)



Fonte: Adaptado de Mateos et al, 2015.

Embora seja considerada uma doença rara e esporádica, a leucemia em crianças e adolescentes é o tipo de câncer infantil mais frequente. Os sintomas são decorrentes da proliferação clonal de blastos leucêmicos na medula óssea e incluem fadiga, palidez, dispneia

aos esforços, febre, dor de cabeça, tontura e quase síncope. Estes, ocorrem devido a diferentes graus de anemia, trombocitopenia e neutropenia. Também é possível a infiltração da doença além da medula óssea, com a apresentação clínica de linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia e lesões renais (KAPLAN, 2019). Dessa forma, reconhecer os sintomas assim que eles se mostram presentes é essencial para a identificação por familiares e responsáveis resultando no diagnóstico precoce.

O diagnóstico é realizado através da correlação entre os sintomas clínicos e os resultados laboratoriais como a contagem de blastos e de leucócitos no sangue e medula óssea. O aspirado de medula óssea é necessário para o diagnóstico final de leucemia, sendo responsável por determinar seu subtipo através das técnicas de análise morfológica e citometria de fluxo (KAPLAN, 2019). Uma vez estabelecido o diagnóstico, define-se também a conduta terapêutica a ser implementada, com base nas características de cada subtipo da doença e de como ela se manifesta em cada paciente.

1.3 Leucemia Linfóide Aguda

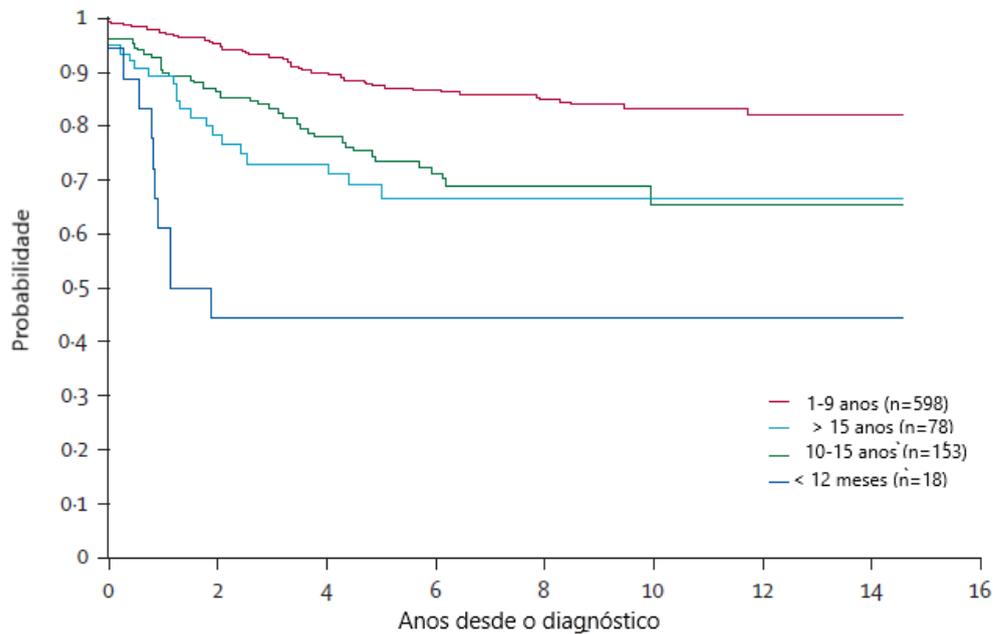
A LLA é a neoplasia mais comum na infância, correspondendo a 40 % dos casos de câncer nessa faixa etária (SETH & SINGH, 2015). Seu pico de incidência ocorre entre 2 e 5 anos de idade, com uma leve prevalência em meninos, sendo quatro vezes mais frequente que a LMA (PUI *et al*, 2008; SILVA, 2009; SOUSA *et al*, 2015). É uma doença heterogênea na qual os subtipos diferem de acordo com características celulares e moleculares, resposta à terapia e risco de recorrência, traçando assim diferentes desfechos (SOUSA *et al*, 2015).

Aproximadamente 85 % dos diagnósticos de LLA possuem os precursores dos linfócitos do tipo B acometidos, caracterizando o subtipo LLA do tipo B (LLA-B) (JASINSKI *et al*, 2020). Estudos citogenéticos já demonstraram que alterações no número cromossômico bem como translocações cromossômicas nessas células estão relacionadas à patogênese do subtipo, possuindo implicações diretas no prognóstico e contribuindo para determinar o risco durante a estratificação (BHOJWANI, 2015). Por exemplo, pacientes que apresentam a translocação t(12;21) [ETV6-RUNX1] ou hiperdiploidismo (> 50 cromossomos) geralmente possuem bons prognósticos e uma sobrevida global de mais de 90 %, quando comparados à pacientes de mesma faixa etária e com outras alterações genéticas (MOORMAN, 2016; CHILTON *et al*, 2014, MOORMAN, 2010).

A LLA do tipo T (LLA-T), a qual acomete células precursoras dos linfócitos T, somada a outros subtipos raros, completa os diagnósticos de LLA em aproximadamente 15 % (JASINSKI *et al*, 2020) dos casos. Historicamente, pacientes com estes subtipos apresentam piores prognósticos do que os pacientes com LLA-B (RAETZ & TEACHEY, 2016), porém esse desfecho vêm sendo diferente nos últimos anos, representado por melhorias na sobrevida dos pacientes como resposta aos tratamentos de intensificação com drogas específicas, como dexametasona, asparaginase e altas doses de metotrexato (BHOJWANI, 2015). Aliado a isto, a utilização dos dados de Doença Residual Mínima (DRM), a qual é caracterizada como a detecção de células leucêmicas em menores proporções quando comparadas à avaliação morfológica, pode indicar o prognóstico nesse subtipo da doença. Estudos demonstraram que resultados de DRM negativos ao final do tratamento de indução são preditores de melhores desfechos tanto em LLA-T quanto em LLA-B, enquanto que a apresentação de DRM negativo de forma tardia - após o final do tratamento de indução - também é um preditor de sobrevida e bom desfecho em LLA-T. Da mesma forma, se a DRM for positiva nesse momento, as chances de recaída são aumentadas (SCHRAPPE *et al.*, 2011; PUI *et al*, 2017).

Além das características biológicas da doença e da resposta ao tratamento avaliado pela DRM, outros fatores são tradicionalmente levados em consideração para análise de prognóstico, estratificação de risco e definição de protocolo terapêutico em LLA, como a idade ao diagnóstico e a contagem de leucócitos. Estudos clínicos demonstraram que crianças com LLA diagnosticadas na faixa etária de 1-9 anos, possuíam melhores desfechos de sobrevida do que crianças diagnosticadas antes de completarem 1 ano de vida ou então em uma idade mais avançada da infância ou já na adolescência (figura 2) (PUI *et al*, 2008; PUI *et al*, 2001). Ademais, uma alta contagem de leucócitos (> 50.000 leucócitos por mm^3) também é um fator associado ao alto risco pelos critérios do *National Cancer Institute* (NCI-HR) (KATO & MANABI, 2018) e a um pior desfecho clínico (PUI *et al*, 1998). Em LLA-T, a alta contagem de leucócitos foi associada a um maior risco de recaída em Sistema Nervoso Central (SNC) (PUI, 2006). A utilização desses dois critérios - idade e contagem leucocitária - para criação de um sistema de classificação de risco foi essencial para as comparações de tratamentos de crianças com LLA. Atualmente, sabe-se que aproximadamente $\frac{2}{3}$ das crianças diagnosticadas na faixa de 1-9 anos e que possuem uma contagem de leucócitos menor que $50 \times 10^9/\text{L}$ são classificadas com um risco de recaída baixo ou intermediário (PUI *et al*, 2001; PUI *et al*, 2008).

Figura 2 - Curva de Sobrevida Kaplan-Meier de acordo com a idade ao diagnóstico de LLA



Fonte: Adaptado de PUI *et al*, 2008.

Todas essas características são fundamentais para a conduta terapêutica escolhida para cada paciente. A escolha do tratamento baseado na estratificação de risco é uma importante estratégia terapêutica utilizada para crianças com LLA. Essa abordagem permite que crianças que são classificadas como de baixo risco, utilizem terapias menos invasivas e menos tóxicas, enquanto que crianças consideradas de alto risco e com um pior prognóstico, sejam submetidas a um tratamento mais intensivo e que aumente suas chances de cura (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Para o sucesso do tratamento, o controle da doença em medula óssea ou demais tecidos afetados é necessário, bem como a prevenção da extensão da doença em sítios-santuários, locais os quais são de difícil acesso terapêutico, como o SNC e testículos (SETH & SING, 2015). Atualmente, há diversos protocolos de tratamento disponíveis, desenvolvidos através de estudos clínicos colaborativos promovidos por organizações internacionais de apoio à pesquisa e combate às leucemias infantis (PUI, *et al*, 2019; KATO & MANABE, 2018).

O tratamento para LLA tipicamente consiste nas seguintes fases: indução, seguida de consolidação e manutenção do tratamento por 1 a 2,5 anos com um esquema terapêutico menos invasivo (KATO & MANABE, 2018). A fase de indução tem o objetivo de eliminar as

células leucêmicas da medula óssea a ponto da doença entrar em remissão, caracterizada por apresentar um percentual menor que 5 % de blastos ao final deste período, por avaliação morfológica (KAPLAN, 2019). Sabe-se que pacientes que atingem esse objetivo entre o dia 7 e 14 da indução possuem melhores prognósticos do que os pacientes que atingem esse objetivo tardiamente. Já os pacientes que não atingem a contagem de blastos >5% ao final da indução possuem um alto risco de recaída (SETH & SING, 2015). O período de consolidação ocorre para erradicar células leucêmicas residuais, utilizando combinações de agentes citotóxicos, e é importante para evitar metástase no SNC (PUI et al, 2009). Para pacientes com recaída precoce, nesse momento pode-se então realizar um tratamento de re-indução (BUCHANAN et al, 1998). Uma vez que a remissão da doença é atingida, inicia-se o período de manutenção, o qual é o menos intenso do tratamento e possui objetivo de impedir a recorrência da doença (KAPLAN, 2019). As principais drogas utilizadas em cada fase do tratamento estão descritas na figura 3.

Figura 3 - Esquema de tratamento para pacientes pediátricos com LLA



Fonte: Adaptado de KATO & MANABE, 2018.

Nos últimos anos, houve um aumento de aproximadamente 90 % nas taxas de sobrevivência de crianças acometidas com LLA (PUI *et al*, 2008). Isto se explica tanto por avanços na facilidade de acesso aos serviços de saúde que proporcionaram uma melhora nos diagnósticos adiantados, quanto pelo desenvolvimento de novos tratamentos baseados em alvos terapêuticos específicos (SOUSA et al, 2015). A medicina de precisão, a qual utiliza medicamentos para inibir a progressão do câncer através do bloqueio do mecanismo de ação de moléculas específicas (ELZAGALLAAI et al, 2020), visa não apenas diminuir o número de óbitos de crianças e adolescentes com leucemias, mas também diminuir os efeitos que os tratamentos convencionais, como a quimioterapia, podem acarretar ao longo prazo (FORREST, 2018). Da mesma forma, a imunoterapia é uma abordagem terapêutica

promissora para a melhora dos desfechos em LLA, principalmente para os casos de recaída e/ou relapso (VROOMAN & SILVERMAN, 2016).

Entretanto, apesar de todos os avanços terapêuticos, a leucemia ainda é a principal causa de morte entre os cânceres em crianças e adolescentes no Brasil e na América Latina (TORRES-ROMAN et al, 2020). Um estudo recente demonstrou que as taxas de mortalidade de crianças e adolescentes com leucemias linfóides agudas estão aumentadas no período entre 2006-2010 (SILVA et al, 2014) no Brasil. Dessa forma, estudos que elucidem os mecanismos biológicos e a variabilidade genética por trás da doença são de extrema importância para a diminuição dessas taxas. Além disso, estudos que investigam possíveis marcadores biológicos e novos alvos terapêuticos também podem contribuir para a definição de um melhor ou pior prognóstico ao diagnóstico, bem como para a escolha e a condução do tratamento pela equipe médica.

Recentemente, em um estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Câncer e Neurobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em colaboração com o Instituto do Câncer Infantil, foi demonstrado que níveis diminuídos da proteína BDNF, avaliada em Medula Óssea e Sangue Periférico, ao diagnóstico estão associados ao pior prognóstico e à doença ativa em leucemias infantis (PORTICH et al, 2016). Desfechos similares foram identificados em neuroblastomas (THIELE et al, 2009) e tumores de Wilms (EGGERT et al, 2001), porém os motivos que levam a esses resultados ainda são desconhecidos.

1.4 Neurotrofinas

As neurotrofinas (NTs) são fatores de crescimento amplamente conhecidos por atuarem no desenvolvimento, sobrevivência e plasticidade dos neurônios (HILLIS et. al, 2016). A família é formada por 4 proteínas: Fator de Crescimento Nervoso (*Nerve Growth Factor - NGF*), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor - BDNF*), Neurotrofina 3 (*Neurotrophin-3 - NT-3*) e Neurotrofina 4 (*Neurotrophin-4 - NT-4*). Cada neurotrofina se liga a um receptor transmembrana específico, com alta afinidade. Respectivamente, NGF se liga ao receptor de tropomiosina relacionado à quinase A (*tropomyosin receptor kinase A - TrkA*), BDNF e NT-4 ao receptor de tropomiosina relacionado à quinase B (*tropomyosin receptor kinase B - TrkB*) e NT-3 ao receptor de tropomiosina relacionado à quinase C (*tropomyosin receptor kinase C - TrkC*). Ainda, as neurotrofinas ligam-se com baixa afinidade ao pan receptor p75^{NTR}. A ligação entre

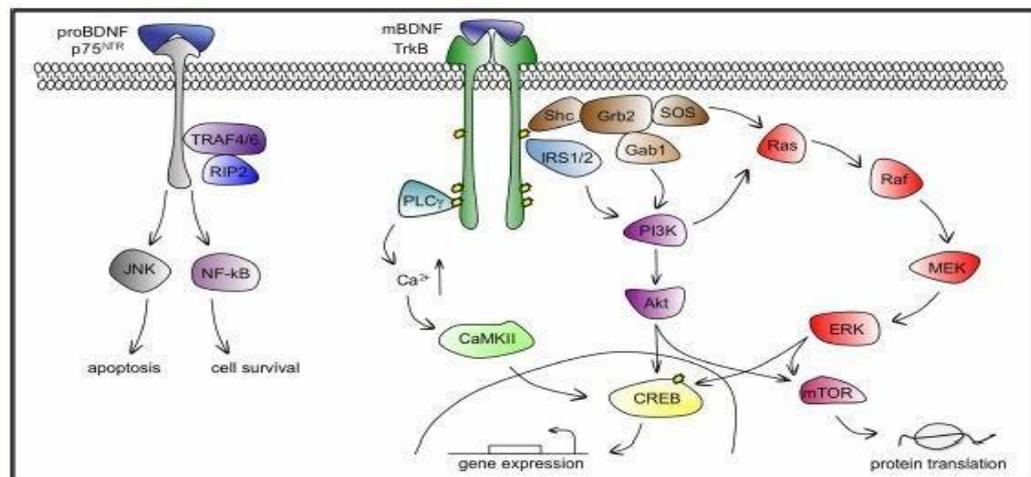
NT-receptor desencadeia uma cascata de sinalização que pode levar à proliferação celular ou a apoptose, dependendo do contexto celular e do complexo NT-receptor ativado (COSTA et al, 2018).

As neurotrofinas são sintetizadas por moléculas precursoras maiores, com uma sequência de propeptídeo adicionada à cadeia terminal N, chamadas pro-neurotrofinas (pro-NTs). Essas proteínas são biologicamente ativas e ligam-se com alta afinidade ao complexo formado pelo pan receptor p75^{NTR} e o seu co-receptor sortilin, desencadeando também uma via de sinalização induzindo a célula a apoptose. As pro-NTs, quando liberadas na matriz extracelular, são proteoliticamente clivadas para neurotrofinas por enzimas da família das plasminas ou por metaloproteases (MMPs) (LEE et al, 2001; GRAY&ELLIS, 2008). Intracelularmente, são clivadas por enzimas da família das furinas. Essa reação proteolítica interfere crucialmente para expressão da proteína madura e conseqüentemente para o desfecho celular, visto que quando as pro-NTs não estão clivadas em neurotrofinas o efeito biológico é antagônico - a morte celular - ao da via tradicional - a proliferação celular.

Além disso, sabe-se que o desfecho celular também é influenciado pela expressão e interações de NTs e seus receptores. A co-expressão de receptores TRKs e p75^{NTR} modula a especificidade de ligação de cada NT ao seu receptor específico, pela indução de mudanças conformacionais nos domínios intra e extracelulares dos receptores (ESPOSITO et al, 2001). Da mesma forma, os níveis das pro-NT também parecem ser modulados pela expressão de p75^{NTR}, encontrando-se aumentados quando este encontra-se superexpresso (KEFEE, 2016), resultando em desfechos apoptóticos para as células (MASOUDI, 2009).

Um exemplo da via de sinalização de NTs é demonstrado na figura 4. Caso BDNF ligue-se a TrkB, seu receptor de alta afinidade, desencadeia-se 3 cascatas de ativação intracelular com PLC γ , PI3K e ERK, levando à fosforilação do fator de transcrição CREB, o qual medeia a transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação celular. Por outro lado, a ligação entre pro-BDNF - a pro-neurotrofina a precursora de BDNF - e o receptor p75^{NTR} pode desencadear duas rotas celulares, uma que leva à apoptose através da proteína JNK e outra que leva à sobrevivência celular através da proteína NF-kB (Figura 4).

Figura 4 - Vias de sinalização de BDNF



Fonte: CUNHA et al, 2010.

Historicamente, a primeira neurotrofina descrita foi o NGF pela cientista Rita Levi-Montalcini em 1956, revolucionando o campo de estudos em neurologia e rendendo-a o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1986. A partir de então, as outras neurotrofinas foram identificadas e suas funções, bem como seu mecanismo de ação acima descrito, foram amplamente estudados. Atualmente, seu papel de formar uma rede de fatores de crescimento que orquestram a geração e a manutenção de diversas populações neuronais é bem estabelecido (ICHIN et al, 2012).

Ao passo que as referências sobre neurotrofinas se construía sólidas para o sistema nervoso central e periférico, também se estudava a expressão e secreção dessas proteínas em outras células e tecidos. Dessa forma, se reconhece hoje o papel das neurotrofinas no desenvolvimento cardíaco, na neovascularização e no balanceamento homeostático do sistema imune (VEGA, 2003; REICHARDT, 2006). Para este último, sabe-se que linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos secretam neurotrofinas que atuam tanto de forma autócrina quanto de forma parácrina para a diferenciação, proliferação, ativação e sobrevivência dessas células (VEGA, 2003; SKAPER, 2018). Justamente por atuar dualmente com funções de proliferação celular ou ativando mecanismos de apoptose, desbalanços nas vias das neurotrofinas estão relacionados tanto com doenças neuropsiquiátricas como Alzheimer e depressão (MITRE et al, 2016), quanto diversos tipos de cânceres (SHI, 2014).

1.5 Neurotrofinas e cânceres

A comunicação entre o sistema nervoso e o tumor, conhecido como *nerve-cancer crosstalk*, é um tópico efervescente que vem sendo bastante estudado e apontado como tendência para avanços investigacionais no cenário do câncer (WANG, 2021). Trabalhos recentes evidenciam que a infiltração nervosa em tumores sólidos e a consequente liberação de neurotransmissores e fatores de crescimento induzem a proliferação e crescimento das células tumorais, bem como o avanço da doença para metástases (JOBILING et al, 2015; BOILLY et al, 2017). Nesse sentido, a complexidade das vias de ativação a partir da ligação NT-receptor está relacionada a uma diversidade de funções controladas pelas NTs e pro-NTs em diferentes processos celulares, incluindo a tumorigênese (GRIFFIN et al, 2018).

O papel das neurotrofinas em cânceres difere entre tumores sólidos e hematológicos, bem como depende diretamente de cada etiologia tumoral. Para tumores sólidos, em geral, as NTs estão relacionadas com a proliferação e a diferenciação celular, observada em neuroblastomas, câncer de mama, pulmão e próstata (SHI, 2014; VAISHNAVI, 2015; DESMET & PEEPER, 2006), além de baixo prognóstico e risco aumentado de metástases (CHOI et al, 2016; TANAKA et al, 2014). Em câncer colorretal, a expressão de BDNF e TrkB foi associada com metástases peritoneais, linfonodais e hepáticas. Além disso, pacientes com maior coexpressão de BDNF-TrkB tiveram um pior prognóstico da doença (TANAKA, 2014). Resultados semelhantes foram encontrados para glioma, nos quais a alta expressão de pro-BDNF, p75^{NTR} e sortilin foram associados com a malignidade tumoral. Ainda, em câncer pancreático, a via de sinalização ativada a partir da ligação de NGF-TrkA regula a proliferação e a invasão das células tumorais pancreáticas (JIANG, 2020).

Entretanto, para doenças hematopoiéticas, o papel das neurotrofinas não é tão bem definido como em tumores sólidos, apresentando resultados controversos. Primariamente, NGF e BDNF estão relacionados com diferenciação, proliferação e sobrevivência de células hematopoiéticas como linfócitos B e T, neutrófilos, monócitos e mastócitos (VEGA, 2003). Em condições de estresse, a secreção de BDNF demonstrou-se aumentada e exerceu um efeito anti-apoptótico em cultura celular de linfócitos B, enquanto que pro-BDNF diminuiu nas mesmas condições (FAUCHAIS, 2008). Em sangue periférico (SP) de pacientes com mieloma múltiplo, CHU et al (2013) encontraram níveis aumentados de BDNF quando comparados a SP de indivíduos saudáveis, induzindo ao processo de angiogênese por aumento da migração celular. Além disso, em linfomas de Burkitt sem a infecção pelo vírus de Epstein-Barr, a ativação da via de sinalização PI3K pela ligação de NGF-TrkA medeia a inibição da apoptose (HILLIS, 2016). Já em linfoma difuso de grandes células B, a exposição a rituximabe - um

agente imunoterápico utilizado para o tratamento da doença - induz a secreção de NGF e BDNF, sendo essa regulada por condições apoptóticas (BELANGER, 2011). Em leucemia linfocítica crônica, Talbot (2009) verificou que BDNF é uma parte importante do secretoma de células de leucemia linfocítica crônica, o que induz um efeito de pro-sobrevivência dessas células.

Juntos, esses dados corroboram com os achados para tumores sólidos, os quais apontam as neurotrofinas como proteínas que estimulam a tumorigênese e a proliferação celular. Todavia, outros trabalhos reportam que baixos níveis de BDNF podem estar associados com um pior prognóstico em leucemia linfocítica crônica e a uma resposta lenta ao tratamento em mieloma múltiplo. Nesse sentido, também foi verificado que o NGF inibe a proliferação de células leucêmicas por regulação negativa da proteína ciclina A1, essencial para a progressão da doença (CHAN, 2009). Em um trabalho de revisão recente, Azoulay e Horowitz (2021) abordam que os resultados que relacionam BDNF à proliferação celular em sua maioria são realizados *in vitro*, e os poucos estudos com amostragem de pacientes acometidos por doenças hematológicas, relacionam altos níveis de BDNF com um melhor desfecho da doença. Ainda, é importante levar em consideração o microambiente tumoral, o qual não é possível reproduzir *in vitro*.

Dessa forma, é possível afirmar que os níveis de neurotrofinas parecem ser influenciados pela própria doença hematológica em si, sendo impossível uma generalização de seu papel nesse grupo patológico. Com exceção do trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, propulsor deste estudo, especificamente para leucemias infantis, ainda não há literatura prévia que investigue o papel das NTs nessa doença.

2. JUSTIFICATIVA

A leucemia é a principal causa de morte entre patologias que acometem crianças e adolescentes. Uma vez que essa doença se caracteriza justamente pela proliferação desregulada de células precursoras dos linfócitos na medula óssea e no sangue, investigar vias de sinalização que estejam intrinsecamente ligada a manutenção dessas células é essencial para descobertas que geram tanto um melhor entendimento da doença, quanto que suportem cientificamente avanços na terapêutica.

Utilizando como propulsor um estudo recente do grupo de pesquisa, o qual identificou baixos níveis de BDNF ao diagnóstico em pacientes pediátricos com leucemias, o presente estudo busca compreender melhor o papel das neurotrofinas no contexto do câncer hematopoiético pediátrico, tendo em vista que alterações nessas vias podem levar a diferentes desfechos da doença. Dessa forma, este trabalho tem como hipótese inicial que níveis de BDNF, pro-BDNF e NGF em pacientes pediátricos com leucemias apresentarão alterações quando comparados a níveis destas mesmas proteínas em crianças e adolescentes saudáveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar o papel das neurotrofinas em leucemia pediátrica a partir de uma amostragem populacional, investigando a relação dessas proteínas com características clínicas da doença.

3.2 Objetivos específicos

- Mensurar os níveis de BDNF, NGF e pro-BDNF em amostras de medula óssea ou sangue periférico de pacientes acometidos com leucemia linfóide aguda infantil por teste imuno-enzimático (ELISA), em diferentes momentos da doença.
- Mensurar por ELISA os níveis de BDNF, NGF e pro-BDNF em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis por teste imuno-enzimático (ELISA).
- Analisar a expressão diferencial de neurotrofinas e seus receptores (BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75^{NTR}, sortilin) a partir de amostras de leucemia infantil disponíveis em banco de dados públicos por ferramentas de bioinformática.
- Analisar a expressão diferencial de enzimas conversoras de pro-NTs a NTs (MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, furina e plasmina) a partir de amostras de leucemia infantil disponíveis em banco de dados públicos por ferramentas de bioinformática.
- Analisar a resposta de células de pacientes acometidos com leucemia linfóide aguda em meio de cultura ao tratamento com BDNF.
- Relacionar os níveis de neurotrofinas avaliados com características clínicas da doença: risco, subtipo, recorrência, remissão e prognóstico.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo submetido à revista *Cancer Biomarkers*.

Cancer Biomarkers

Neurotrophins as potential biomarkers for poor prognosis in childhood acute lymphoid leukemia (ALL)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Neurotrophins as potential biomarkers for poor prognosis in childhood acute lymphoid leukemia (ALL)
Short Title:	Neurotrophin's role in pediatric leukemia
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Regular Section
Keywords:	neurotrophins - childhood leukemia - prognosis - BDNF - ALL
Corresponding Author:	Caroline Brunetto de Farias, PhD in Cellular and Molecular Biology Children's Cancer Institute, Porto Alegre/Brazil BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Children's Cancer Institute, Porto Alegre/Brazil
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Karine de Andrade, Biologist
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Karine de Andrade, Biologist Gustavo Michaelson Michaelson, Biotechnologist Livia Dutra, Biomedical, Msc in Cellular and Molecular Biology Rebeca Marques, Pediatric Oncologist, Msc in Medical Sciences Daniela Benincasa, Pediatric Oncologist Júlia Portich, Physician, Hematologist Jiseh Loss, Pediatric Oncologist Lauro Gregianin, Pediatric Oncologist André Brunetto, Oncologist, Msc. in Oncology and Radiotherapy Marialva Sinigaglia, PhD in Genetics and Molecular Biology Rafael Roesler, PhD in Biochemistry, PostDoc in Neurobiology Mariane Jaeger, PhD in Cellular and Molecular Biology Caroline de Farias, PhD in Cellular and Molecular Biology
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	BACKGROUND: Neurotrophins (NTs) are growth factors involved in development and survival of several types of cells. Their mechanism is extensively related to cancer, however in Acute Lymphoid Leukemia (ALL), its role remains unclear. OBJECTIVE: The study aims to investigate the NT's role in childhood ALL, assessing gene expression of the main genes of this pathway and measuring its protein levels. METHODS: NT's genes expressions in pediatric samples collected in a public genomic data repository were performed in R software. ALL pediatric patient's samples in different moments of disease were collected from 2011 to 2021 in Brazil's health institutions. The protein levels were measured by ELISA test according to manufacturer indication. RESULTS: NGF and sortilin were found overexpressed in health samples

	<p>when compared with tumor samples, while BDNF and P75NTR were found overexpressed in T-cell tumor and B-cell tumor samples, respectively. Enzyme convertases from pro-NTs to NTs were overexpressed in disease samples. Protein levels were lower in samples at diagnosis when compared to healthy individuals. A correlation between pro-BDNF and BDNF levels during disease was found. CONCLUSIONS: NTs are altered in tumor-microenvironment in childhood ALL. Further studies are required to understand their complete role in this context.</p>
Suggested Reviewers:	
Order of Authors (with Contributor Roles):	<p>Karine de Andrade, Biologist</p> <p>Gustavo Michaelen Michaelen, Biotechnologist</p> <p>Livia Dutra, Biomedical, Msc in Cellular and Molecular Biology</p> <p>Rebeca Marques, Pediatric Oncologist, Msc in Medical Sciences</p> <p>Daniela Benincasa, Pediatric Oncologist</p> <p>Júlia Portich, Physician, Hematologist</p> <p>Jiseh Loss, Pediatric Oncologist</p> <p>Lauro Gregianin, Pediatric Oncologist</p> <p>André Brunetto, Oncologist, Msc. in Oncology and Radiotherapy</p> <p>Marialva Sinigaglia, PhD in Genetics and Molecular Biology</p> <p>Rafael Roesler, PhD in Biochemistry, PostDoc in Neurobiology</p> <p>Mariane Jaeger, PhD in Cellular and Molecular Biology</p> <p>Caroline de Farias, PhD in Cellular and Molecular Biology</p>
Additional Information:	
Question	Response

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Embora as neurotrofinas sejam amplamente conhecidas pela manutenção e desenvolvimento de diversas células e tecidos, no contexto do câncer, seu papel se confunde e se combina com outros fatores, como a etiologia e a agressividade da doença. Torna-se necessário, então, avaliar essas proteínas de forma específica a cada tipo de câncer. Para neoplasias hematopoiéticas, os resultados da literatura são escassos, principalmente de estudos que avaliem a família em amostras biológicas de pacientes. De forma inédita, este trabalho investigou o comportamento das neurotrofinas em leucemia infantil, contribuindo para elucidar os mecanismos da sua via de sinalização em um microambiente em desbalanço. A partir de três abordagens diferentes - gênica, proteica e celular - desenhou-se um caminho para tentar entender em qual ponto as neurotrofinas poderiam contribuir neste desequilíbrio, refletindo em características clínicas como recaída e um pior prognóstico. Foi possível apontar importantes diferenças quando comparados grupos de indivíduos saudáveis e indivíduos acometidos com a doença. Mesmo sem força estatística devido ao pequeno número de pacientes em cada momento avaliado, percebeu-se que as três neurotrofinas (pro-BDNF, BDNF e NGF) estão diminuídas ao diagnóstico quando comparados com momentos em que a doença está em remissão ou com os indivíduos saudáveis. Além disso, também foi possível descartar uma disfunção na conversão entre pro-neurotrofinas e neurotrofinas como causa da alteração em leucemias, já que encontrou-se uma correlação positiva entre pro-BDNF e BDNF e os níveis de ambas seguem o mesmo padrão durante os momentos da doença. Com os resultados de expressão gênica, é possível inferir que a complexa relação entre neurotrofinas e seus receptores varia entre os próprios subtipos de leucemia, e que as enzimas de conversão de pro-neurotrofinas a neurotrofinas estão atuantes no contexto da doença. Encorajamos mais trabalhos que possam contribuir para desvendar o mecanismo de ação dessas proteínas em leucemias pediátricas para que assim seja viável explorar as neurotrofinas como moléculas marcadoras e indicadoras de prognóstico.

6. REFERÊNCIAS

AZOULAY, David; HOROWIT, Netanel. Brain-derived neurotrophic factor in hematological malignancies: From detrimental to potentially beneficial. **Blood Reviews**. n.100871, Jul 2021.

BACHIS, Alessia et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Alters Brain-Derived Neurotrophic Factor Processing in Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9477–9484, Jul. 2012

BHOJWANI, Deepa; YANG, Jun J.; PUI, Ching-Hon. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 47-60, Feb. 2015.

BOILLY, Benoni et al. Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer. **Cancer Cell**, v. 31, n.3, p. 342-354, Mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL.Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Protocolo de diagnóstico precoce para oncologia pediátrica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. Brasília, Ministério da Saúde, 2017.

BUCHANAN, G. R. et al. Reinduction therapy in 297 children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: a Pediatric Oncology Group Study. **Blood**, v. 72, n. 4, p. 1286-92, Oct. 1988.

CHAN CB et al. NGF inhibits human leukemia proliferation by downregulating cyclin A1 expression through promoting acinus/CtBP2 association. **Oncogene**. v.28, n.43, p.3825-36, Oct. 2009.

CHILTON L. et al, High hyperdiploidy among adolescents and adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): cytogenetic features, clinical characteristics and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 7, p. 1511-8, Jul. 2014.

CHOI, Bongkun et al. Upregulation of brain-derived neurotrophic factor in advanced gastric cancer contributes to bone metastatic osteolysis by inducing long pentraxin 3. **Oncotarget**, v. 7, n.34, p 55506-55517, Aug. 2016.

CHU, Zhang-Bo et al. Role of brain-derived neurotrophic factor in bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**. v.33, n.4, p.485-490, Aug. 2013.

COSTA, Rui; PERESTRELO, Tânia; ALMEIDA, Ramiro. PROneurotrophins and CONSequences. **Molecular Neurobiology**. v. 55, n. 4, p.2934-2951, Apr 2018.

CUNHA, Carla; BRAMBILLA, Ricardo; THOMAS, Kerrie. A simple role for BDNF in learning and memory? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.3, n. 1, Feb. 2010.

DESMET, C. J.; PEEPER, D. S. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n., p. 755-759, Apr. 2006.

EGGERT, Angelikka *et al.* Expression of the Neurotrophin Receptor TrkB Is Associated With Unfavorable Outcome in Wilms' Tumor. **Journal of Clinical Oncology**, Huntington, v. 19. n. 3,p. 689-696, 2001.

ELZAGALLAAI, Abdelbaset; CARLETON, Bruce; RIEDER, Michael. Pharmacogenomics in Pediatric Oncology: Mitigating Adverse Drug Reactions While Preserving Efficacy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.6 n.66 p. 679-699. Sep 2020.

ESPOSITO D, PATEL P, STEPHENS RM et al (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. **The Journal of Biological Chemistry** v.276, n.35, p.32687–32695, Aug 2001.

FORREST, Suzanne; GEOERGER, Birgit; JANEWAY, Katherine. Precision medicine in pediatric oncology. **Current Opinion in Pediatrics**. v. 30, n.1, p.17-24, Feb 2018.

GRABOIS, Marília Fornaciari. **O acesso à assistência oncológica infantil no Brasil**. 2011. 166 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

GRAY, Kelly; ELLIS, Ellis, Vincent. Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. **FEBS Letters**. v.582, n.6, p. 907–10, 2008.

GRIFFIN, Nathan; FAULKNER, Sam; JOBLING, Phillip; et al. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. **Pharmacological Research**, vol. 135, p. 12–17, 2018.

GRIMWADE, Lizz F.; FULLER, Kathryn A.; ERBER, Wendy N. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. **Methods**, Minnesota, v. 112, p. 39–45, Jun 2016.

HILLIS, Jennifer; O'DWYER, Michael; GORMAN, Adrienne. Neurotrophins and B-cell malignancies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n.1, p. 41-56, Jan 2016

HOFFBRAND, Victor A.; MOSS, Paul, A.H. **Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ICHIM, Gabriel; TAUSZIG-DELAMASURE, Servane; MEHLEN, Patrick. Neurotrophins and cell death. **Experimental Cell Research**. v.318 n. 11 p.1221-8, Jul 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. **Câncer Infantojuvenil**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil>. Acesso em: 17 jan. 2021.

JASINSKI, Sylwia et al. Immunotherapy in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Advances and Ongoing Challenges. **Paediatric Drugs**, v. 22, n. 5, p. 485-499, Oct. 2020.

JIANG, Jie et al. NGF from pancreatic stellate cells induces pancreatic cancer proliferation and invasion by PI3K/AKT/GSK signal pathway. **Journal of cellular and molecular medicine**. v. 24, n. 10, p. 5901-5910, May 2020.

JOBLING, Philip et al. Nerve-Cancer Cell Cross-talk: A Novel Promoter of Tumor Progression. **Cancer Research**, v.75, n.9, p.1777-81, May 2015.

KAPLAN, Joel A. Leukemia in Children. **Pediatrics in Review**, v. 40, n. 7, p. 319-331, Jul. 2019.

KATO, Motohiro; MANABE, Atsushi. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics Internacional: official journal of the Japan Pediatric Society**, v. 60, n. 1, Jan 2018.

KEEFE Kathleen; SHEIKH Imran; SMITH George. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury. **International Journal of Molecular Sciences**. 2017;v.18, n.3, p.548, Mar 2017.

LEE et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science**. v. 294, n. 5548, p. 1945-8, Nov 2001.

MASOUDI, Raheleh et al. Biological activity of nerve growth factor precursor is dependent upon relative levels of its receptors. **The Journal of Biological Chemistry**. v.284, n. 27. p. 18424–18433, Jul 2009.

MATEOS, Marion K *et al.* Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. **Translational Pediatrics**, Hong-Kong, v. 4, n. 2, p. 76-92, apr. 2015.

MITRE, Mariela; MARIGA, Abigail; CHAO, Moses V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clinical Science**, vol. 131, no. 1, p. 13–23, 2016.

MOORMAN, Anthony V. *et al.* Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 5, May 2010.

MOORMAN, Anthony V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407-16, Apr. 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment, Pediatric Treatment Editorial Board. National Cancer Institute, atualizado em 04/02/2021. Disponível em:

<https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>. Acesso em 24/04/2021. [PMID: 26389206]

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **CID-0 – Classificação Internacional de Doenças para Oncologia**. 3 ed. São Paulo: Edusp, 2013.

PANG PT et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, v.306, n. 5695, p. 487-91, Oct. 2004

PORTICH, Júlia *et. al.* Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. **Cancer biomarkers**, Amsterdam, v. 17. p.347-352, 2016.

PUI, Ching-Hon; EVANS, Willian. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 605-15, Aug. 1998.

PUI, Ching-Hon; CAMPANA, Dario; EVANS, William E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 10, Oct. 2001

PUI, Ching-Hon. Central nervous system disease in acute lymphoblastic leukemia: prophylaxis and treatment. **Hematology**, v. 142, n.6, 2006

PUI, Ching-Hon; ROBISON, Leslie L.; LOOK, Thomas. Acute lymphoblastic leukemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p-1030-43, Mar. 2008.

Pui, Chin-Hon *et al.* Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. **The New England Journal of Medicine**, v.360, p. 2730-41, Set. 2009.

PUI, Ching-Hon *et al.* Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. **Leukemia**, v.31, n. 2, p. 333-339, Feb, 2017.

PUI, Ching-Hon *et al.* International Collaboration to Save Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Global Oncology**, v.5, p. 1-2, May 2019.

RAETZ, Elizabeth A.; TEACHEY, David T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Hematology**, v.1, p. 580-588, Dec. 2016.

REICHARDT, Louis.. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B Biological Sciences**. v. 361 n.1473 p.1545-64, Sep 2006.

SETH, Rachna. SINGH, Amitabh. Leukemias in Children. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 9, p. 817–824, Feb. 2015.

SCHRAPPE, Martin *et al.* Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. **Blood**, v. 118, n. 8, p. 2077-84, Aug. 2011.

SHI, Jian. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n.2. p. 149-157. Dec. 2014

SILVA, Fernanda Azevedo. **Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicações das infecções em sua patogênese**. 2009, 116 f. Tese (doutorado em Oncologia) - Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, Franciane; ZANDONADE, Eliana; ZOUAIN-FIGUEIREDO, Glaucia. Analysis of childhood leukemia mortality trends in Brazil, from 1980 to 2010. **Journal of Pediatrics (Rio de Janeiro)**. v. 90, n. 6, p. 587-92, Nov/Dec 2014.

SILVA-JUNIOR, Alexander Leonardo *et al.* Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. **Plos One**, San Francisco, v. 14, n. 8, Aug. 2019.

SKAPER, Stephen. Neurotrophic factors: An Overview. **Methods in Molecular Biology**. v. 1727, p. 1-17, 2018.

SOUSA, Daniel Willian Lustosa de *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 223–229, Aug 2015.

TALBOT, Hugo et al. BDNF belongs to the nurse-like cell secretome and supports survival of B chronic lymphocytic leukemia cells. *Scientific Reports*. v.10, n. 12572, Jul. 2020.

TANAKA, Koji et. al. Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. *PLoS One*, v.9, n.5, May 2014.

THIELE, Carol, LI, Zhijie, MCKEE, Amy. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v.1 n.15(19) p.5962-7, Sep. 2009.

TORRES-ROMAN, J. Smith et al. Leukemia mortality in children from Latin America: trends and predictions to 2030. *BMC Pediatrics*. v. 20, p. 511, Nov. 2020.

VAISHNAVI, Aria; LE, Ahn; DOEBELE, Robert. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discovery*, v. 5, n.1, p. 25-34, Dec. 2014.

VEGA, José et al. Neurotrophins and the immune system. *Journal of Anatomy*. 2003 Jul; v.203 n.1 p.1-19, Jul 2003.

XIOUNG, Jing et al. ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro. *Neuro-oncology*. v. 15, n.8, p.990-1007, Aug 2013.

WANG, Huan et al. Role of the nervous system in cancers: a review. **Cell Death Discovery**. v.7, n.76, Apr. 2021.

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA -
INSTITUTO DO CÂNCER INFANTIL / HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas

Pesquisador: Caroline Brunetto de Farias

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 22403219.6.0000.5327

Instituição Proponente: INSTITUTO DO CANCER INFANTIL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: INSTITUTO DO CANCER INFANTIL DO RIO GRANDE DO SUL
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.829.020

Apresentação do Projeto:

O câncer infantil representa de 0,5% a 3% de todos tumores na maioria das populações, sendo a leucemia a neoplasia mais comum na infância. A leucemia caracteriza-se pelo acúmulo de leucócitos mal formados na medula óssea e no sangue, o qual resulta na perda da capacidade funcional do tecido hematopoietico e oportuniza o estabelecimento de infecções e outras enfermidades. Além disso, é uma doença heterogênea em que seus subtipos diferem de acordo com características celulares e moleculares, resposta à terapia e risco de recorrência, traçando assim diferentes desfechos. Estudos que investiguem mecanismos biológicos envolvidos com esta neoplasia e possíveis alvos moleculares são de extrema importância para o melhor entendimento da doença, prognóstico e definição de novos tratamentos. Sabe-se que alterações nos níveis de neurotrofinas, uma família de proteínas conhecidas pela plasticidade neural, estão associados com o desenvolvimento de patologias, como doenças mentais e cânceres. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que baixos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) estão relacionados com o pior prognóstico e doença ativa em pacientes pediátricos. Porém, os motivos que causam esse desfecho ainda são desconhecidos. Este trabalho, portanto, objetiva investigar a via de sinalização entre BDNF e seus receptores (TrkB e p75NTR), ao avaliar tanto os

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ç
HCPA



Continuação do Parecer: 3.829.020

níveis das proteínas quanto a atividade enzimática envolvida neste processo. Propõe-se, também, elucidar o papel da proteína precursora do BDNF, proBDNF na cascata de ativação celular gerada quando esta se encontra ativa. Por fim, espera-se relacionar os resultados das análises biológicas com as características clínicas dos pacientes, como os fatores de risco (idade e contagem de leucócitos ao diagnóstico) e a resposta ao tratamento. Desta forma, este trabalho contribuirá para o aumento do embasamento científico no quadro das leucemias pediátricas, bem como para o melhor entendimento dos prognósticos e estágios da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este trabalho tem como objetivo principal investigar os níveis de proBDNF-p75NTR e BDNF-TrkB em pacientes pediátricos com leucemias e em sujeitos saudáveis, avaliando as vias de sinalização envolvidas neste processo.

Objetivo Secundário:

- Verificar os níveis plasmáticos das proteínas proBDNF, BDNF, TrkB e p75NTR através da técnica de Western Blott, em amostras de sangue e/ou medula óssea de sujeitos saudáveis e pacientes pediátricos.
- Analisar a expressão gênica das proteínas BDNF, trkB e p75NTR a partir da quantificação de seus respectivos RNAm.
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas envolvidas na clivagem de proBDNF em BDNF (furinas, plasminas e metaloproteases) pelas técnicas de imunofluorescência (ELISA e Western Blott).
- Realizar a caracterização clínica dos pacientes através dos dados disponíveis em prontuários médicos das instituições envolvidas, com informações referentes ao diagnóstico, subtipo da doença, estágio, tratamento, resposta ao tratamento e desfecho clínico.
- Relacionar os níveis de BDNF e das demais proteínas avaliadas com os dados do diagnóstico, estágios pré tratamento, durante e pós tratamento e desfecho clínicos dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, entretanto possíveis riscos ou desconfortos relacionados ao procedimento de coleta podem ocorrer. O participante da pesquisa pode sentir algum desconforto durante a coleta de sangue periférico como mal-estar passageiro

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL ç
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.829.020

ou mancha roxa no local da coleta. Durante a coleta de medula óssea podem ocorrer complicações relacionadas à anestesia e à coleta propriamente dita, como dor local, que é facilmente controlada com analgésicos comuns. A participação na pesquisa não agrega riscos a estes procedimentos que já são realizados na rotina dos procedimentos do tratamento ou de doação. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário.

Benefícios: A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, poderá nos ajudar a entender melhor esta doença e beneficiar futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda 1 com a seguinte justificativa:

A única alteração realizada na Emenda 1 do supracitado projeto foi no campo de número de CNPJ da Instituição Colaboradora (Hospital Nossa Senhora da Conceição). Esclarece-se que o CNPJ anteriormente cadastrado não estava vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Nossa Senhora da Conceição, não migrando automaticamente o projeto para aprovação nesta Instituição.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda 1 aprovada.

Parecer liberado Ad-Referendum anterior à data prevista de relatoria, visando agilizar a sua tramitação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_150428	01/02/2020		Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.829.020

Básicas do Projeto	_E1.pdf	10:07:24		Aceito
Outros	Emenda_01_20190695.pdf	01/02/2020 10:04:11	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	resposta_pendencia.docx	24/12/2019 09:46:00	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	termo_relatorio_parcial.pdf	24/12/2019 09:42:27	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	anuencia_.pdf	24/12/2019 09:41:53	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	relacao_integrantes_pesquisa.pdf	24/12/2019 09:41:17	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_daniela_roth.pdf	24/12/2019 09:37:15	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_karine_andrade.pdf	24/12/2019 09:37:02	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_rafael_santos.pdf	24/12/2019 09:32:31	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_Rafael_roesler.pdf	24/12/2019 09:32:20	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_mariane_jaeger.pdf	24/12/2019 09:32:09	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_livia_fratini.pdf	24/12/2019 09:31:56	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_lauro_gregianin.pdf	24/12/2019 09:30:23	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_jiseh_loss.pdf	24/12/2019 09:30:02	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_caroline_brunetto.pdf	24/12/2019 09:29:46	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_bruna_almeida.pdf	24/12/2019 09:28:56	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:39	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:22	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:08	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_submissao_v4.docx	24/12/2019 09:25:22	Caroline Brunetto de Farias	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL
HCPA



Continuação do Parecer: 3.829.020

Investigador	projeto_submissao_v4.docx	24/12/2019 09:25:22	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_submissao_v4.pdf	24/12/2019 09:25:08	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_submissao_v4_alteracoes_destacadas.pdf	24/12/2019 09:24:53	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	pendencias_CEP.pdf	05/11/2019 08:53:20	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	delegacao_funcoes.pdf	05/11/2019 08:52:36	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_responsaveis_v3.pdf	05/11/2019 08:50:56	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_doadores_v3.pdf	05/11/2019 08:50:41	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale_menores_v2.pdf	05/11/2019 08:50:27	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	30/09/2019 17:47:16	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	29/09/2019 22:16:34	Caroline Brunetto de Farias	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA - HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO/GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas

Pesquisador: Caroline Brunetto de Farias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 22403219.6.3003.5530

Instituição Proponente: HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEICAO SA

Patrocinador Principal: INSTITUTO DO CANCER INFANTIL DO RIO GRANDE DO SUL
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.933.982

Apresentação do Projeto:

Pendência: "Com os dados de identificação na ficha clinica consegue-se reconhecer o paciente da unidade, que deve ser protegido, assim, na ficha clínica, deve-se identificar o paciente por número (código) ao invés de nome ou iniciais."

Resposta: " O campo que identificava o paciente com suas iniciais foi retirado e substituído pelo código do paciente, que será numerado de forma corrida conforme o fluxo de coletas em cada instituição."

Objetivo da Pesquisa:

Resposta à pendência para ajuste no sigilo da identificação do paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

...

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

...

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 3.933.982

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

...

Recomendações:

..

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendência respondida

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1509055.pdf	17/03/2020 19:34:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_v5.pdf	17/03/2020 19:33:28	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	Resposta_Diligencia_GHC.pdf	17/03/2020 19:33:18	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	termodeanuencia_v2.pdf	20/02/2020 23:42:06	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	Emenda_01_20190695.pdf	01/02/2020 10:04:11	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	resposta_pendencia.docx	24/12/2019 09:46:00	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	termo_relatorio_parcial.pdf	24/12/2019 09:42:27	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	anuencia_.pdf	24/12/2019 09:41:53	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	relacao_integrantes_pesquisa.pdf	24/12/2019 09:41:17	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_daniela_roth.pdf	24/12/2019 09:37:15	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_karine_andrade.pdf	24/12/2019 09:37:02	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_rafael_santos.pdf	24/12/2019 09:32:31	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_Rafael_roesler.pdf	24/12/2019 09:32:20	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_mariane_jaeger.pdf	24/12/2019 09:32:09	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_livia_fratini.pdf	24/12/2019	Caroline Brunetto	Aceito

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 3.933.982

Outros	curriculo_livia_fratini.pdf	09:31:56	de Farias	Aceito
Outros	curriculo_lauro_gregianin.pdf	24/12/2019 09:30:23	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_jiseh_loss.pdf	24/12/2019 09:30:02	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_caroline_brunetto.pdf	24/12/2019 09:29:46	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	curriculo_bruna_almeida.pdf	24/12/2019 09:28:56	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_responsaveis_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:39	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:22	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_GHC_v1.docx	24/12/2019 09:27:08	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_submissao_v4.docx	24/12/2019 09:25:22	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_submissao_v4.pdf	24/12/2019 09:25:08	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_submissao_v4_alteracoes_destacadas.pdf	24/12/2019 09:24:53	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	pendencias_CEP.pdf	05/11/2019 08:53:20	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
Outros	delegacao_funcoes.pdf	05/11/2019 08:52:36	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_responsaveis_v3.pdf	05/11/2019 08:50:56	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_doadores_v3.pdf	05/11/2019 08:50:41	Caroline Brunetto de Farias	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tale_menores_v2.pdf	05/11/2019 08:50:27	Caroline Brunetto de Farias	Aceito

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

HOSPITAL NOSSA SENHORA
DA CONCEIÇÃO - GRUPO
HOSPITALAR CONCEIÇÃO



Continuação do Parecer: 3.933.982

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Março de 2020

Assinado por:

**Daniel Demétrio Faustino da Silva
(Coordenador(a))**

Endereço: Francisco Trein, 326 - Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde - Escola GHC
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2805 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

Título do Projeto: **Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas**

A criança ou adolescente pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é investigar proteínas que podem estar envolvidas com o desenvolvimento de leucemias. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Instituto do Câncer Infantil com participação dos Serviços de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital da Criança Conceição.

Se você permitir a participação da criança ou do adolescente pelo qual é responsável nesta pesquisa, apenas durante procedimentos que já fazem parte da rotina clínica do mesmo, iremos solicitar que o médico atendente colete 4 mL adicionais de sangue periférico ou medula óssea que serão enviados para o laboratório do estudo. Além disso, iremos acompanhar a evolução do paciente através da consulta de dados no prontuário.

Não são conhecidos riscos pela participação do paciente na pesquisa, entretanto possíveis riscos ou desconfortos relacionados ao procedimento de coleta podem ocorrer. O participante da pesquisa pelo qual você é responsável pode sentir algum desconforto durante a coleta de sangue periférico como mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta. Durante a coleta de medula óssea podem ocorrer complicações relacionadas à anestesia e à coleta propriamente dita, como dor local, que é facilmente controlada com analgésicos comuns. É importante que você saiba que a participação na pesquisa não agrega riscos a estes procedimentos que já são realizados na rotina assistencial e fazem parte do tratamento da criança ou adolescente pelo qual você é responsável. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o paciente receberá todo o atendimento necessário.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

assunto estudado, e, poderá nos ajudar a entender melhor a doença e beneficiar futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação da criança ou adolescente pelo qual é responsável, ou ainda, desistir da autorização e retirá-la, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o paciente pelo qual você é responsável recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação da criança ou adolescente pelo qual você é responsável na pesquisa e também não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da participação do paciente na pesquisa, ele receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o nome do paciente pelo qual você é responsável não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dra Caroline Brunetto de Farias, pelo telefone 51 3359.7616 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o responsável legal do participante e outra para os pesquisadores.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - responsáveis

Nome do responsável do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 3

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS - HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS

Título do projeto de pesquisa: Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas

Pesquisador responsável: Dra. Caroline Brunetto de Farias

Telefone de contato: (51) 3359-7616

Nome do participante do estudo:

Idade: _____ anos

Endereço:

Nome do representante legal:

Grau de parentesco com o participante da pesquisa:

Endereço:

Você, na condição de pai/mãe ou representante legal, está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico do Programa de Pós Graduação em Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul intitulada: "Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas", que tem como objetivo principal investigar proteínas que podem estar envolvidas com o desenvolvimento de leucemias. O tema escolhido se justifica pela importância de estudar os mecanismos biológicos dessa doença a fim de proporcionar conhecimento científico para avanços nos tratamentos. O trabalho está sendo realizado pela bióloga Karine Pereira de Andrade e sob a supervisão e orientação da Dra. Caroline Brunetto de Farias.

Para alcançar os objetivos do estudo, apenas durante procedimentos que já fazem parte da rotina clínica da criança/adolescente a qual você é responsável, iremos solicitar que o médico dela colete 4 mL adicionais de sangue periférico ou medula óssea que serão enviados para o laboratório do estudo. Além disso, iremos acompanhar a evolução do paciente através da consulta de dados no prontuário.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, entretanto possíveis riscos ou desconfortos relacionados ao procedimento de coleta podem ocorrer. O participante da pesquisa pode sentir algum desconforto durante a coleta de sangue periférico como mal-estar passageiro ou mancha roxa no local da coleta. Durante a coleta de medula óssea podem ocorrer complicações relacionadas à anestesia e à coleta propriamente dita, como dor local, que é facilmente controlada com analgésicos comuns. É importante você saber que a participação na pesquisa não agrega riscos a estes procedimentos que já são realizados na rotina assistencial e fazem parte do tratamento. Caso ocorra

alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o nome do paciente não aparecerá na publicação dos resultados.

Os dados obtidos serão utilizados somente para este estudo, sendo os mesmos armazenados pela pesquisadora principal durante 5 (cinco) anos e após totalmente destruídos (conforme preconiza a Resolução 466/12).

As mesmas informações que estão sendo fornecidas a você serão repassadas à criança/adolescente a qual você é responsável, e a pesquisa somente será realizada se a mesma concordar em participar e você consentir a sua participação.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, desistir de da autorização e retirar o consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o paciente recebe ou possa vir a receber na instituição

Eu _____, (pai/mãe ou representante legal) da criança/adolescente/familiar acima descrita, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e autorizo a participação da mesma(o) na pesquisa. Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- De que a participação da criança/adolescente/familiar é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a criança/adolescente na instituição.
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora Dra Caroline Brunetto de Farias, telefone 3359-7616, e-mail: carolbfarias@gmail.com e endereço: Laboratório de Câncer e Neurobiologia - 1º andar do Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Avenida Ramiro Barcelos 2350 - Santa Cecília, Porto Alegre - RS90035-007 2350 - Santa Cecília, Porto Alegre - RS, 90035-007) de segunda a sexta-feira, das 9h às 17h.
- Também que, se houver dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniela Montano Wilhelms, Coordenadora-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2805, endereço Av. Francisco Trein 326, Centro de Educação Tecnológica e Pesquisa em Saúde – CETPS (ESCOLA TÉCNICA GHC), 1º andar, das 08h às 12h e das 14h:30min às 15:30h.

Declaro que recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20__.

Assinatura do responsável legal: _____

Nome: _____

Assinatura da pesquisadora: _____

Nome da pesquisadora: Karine Pereira de Andrade

ANEXO E - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Termo de assentimento do menor

O termo de assentimento não elimina a necessidade de fazer o termo de consentimento livre e esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas**. Seus pais ou responsáveis permitiram que você participe. Nosso objetivo é entender melhor o desenvolvimento de leucemias infantis e isso ajudará no futuro no tratamento de outros pacientes.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de zero a 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir de participar.

Para a pesquisa iremos pedir sua autorização para que possamos coletar uma pequena quantidade de sangue e/ou medula óssea quando seu médico solicitar algum exame que seja necessário para o seu acompanhamento. Não será preciso nenhum procedimento adicional ao que você já realizará durante o seu tratamento ou acompanhamento.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa serão publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Caso você tenha qualquer dúvida pode procurar a pesquisadora responsável por este estudo, Dra. Caroline Brunetto de Farias pelos telefones: (51) 3359.7616 ou (51) 3331.8704 ou email: carolbfarias@gmail.com

Eu aceito participar da pesquisa **Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas**. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir sem nenhum problema. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Porto Alegre,

de

de

.

Nome do(a) menor

Nome do(a) pesquisador(a)

Assinatura do(a) menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

ANEXO F - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Entendendo a via de sinalização do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em leucemias pediátricas**. Seus pais ou responsáveis permitiram que você participe. Nosso objetivo é entender melhor o desenvolvimento de leucemias infantis e isso ajudará no futuro no tratamento de outros pacientes.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de zero a 18 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir de participar.

Para a pesquisa iremos pedir sua autorização para que possamos coletar uma pequena quantidade de sangue e/ou medula óssea e/ou tecido do tumor quando seu médico solicitar algum exame que seja necessário para o seu acompanhamento. Não será preciso nenhum procedimento adicional ao que você já realizará durante o seu tratamento ou acompanhamento.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa serão publicados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Caso você tenha qualquer dúvida pode procurar a pesquisadora responsável por este estudo, Dra. Caroline Brunetto de Farias pelos telefones: (51) 3359.7616 ou email: carolbfarias@gmail.com.

Eu _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura da/o criança/adolescente: _____

Nome: _____

Assinatura da pesquisadora: _____

Nome da pesquisadora: Karine Pereira de Andrade