



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

CAIO BEZERRA MACHADO

**ESTUDO TRANSLACIONAL DE UM INIBIDOR DA ENZIMA POLI-ADP-RIBOSE
POLIMERASE-1 (*PARP1*) EM MODELOS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA p190+**

FORTALEZA
2023

CAIO BEZERRA MACHADO

ESTUDO TRANSLACIONAL DE UM INIBIDOR DA ENZIMA POLI-ADP-RIBOSE
POLIMERASE-1 (*PARP1*) EM MODELOS DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA p190+

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Orientadora: Profa Dr.^a Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza.

FORTALEZA, CE
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M13e Machado, Caio Bezerra.
Estudo translacional de um inibidor da enzima poli-ADP-ribose polimerase-1 (PARP1) em modelos de leucemia linfoblástica aguda p190+ / Caio Bezerra Machado. – 2023.
108 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes.
Coorientação: Prof. Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza.
1. BCR-ABL. 2. Leucemia Linfóide Aguda. 3. Poli-ADP-ribose polimerase. I. Título.

CDD 610

CAIO BEZERRA MACHADO

ESTUDO TRANSLACIONAL DE UM INIBIDOR DA ENZIMA POLI-ADP-RIBOSE
POLIMERASE-1 (*PARP1*) EM MODELOS DE LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA p190+

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Wallax Augusto Silva Ferreira
Instituto Evandro Chagas (IEC)

Aos meus familiares e amigos.

Aos meus professores de uma vida inteira.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gardênia Maria Chaves Bezerra e Alexandre Campos Machado, que, diante de quaisquer alternativas, sempre priorizaram a minha educação, dando vez as escolhas e oportunidades que culminaram neste trabalho.

Aos meus irmãos e suas famílias, à minha família de sangue e de coração, por todo o companheirismo ao longo do trajeto. Ao meu avô, Antônio Lacerda Machado, médico e pesquisador, pelo qual a paixão da investigação científica nasceu em mim.

À minha orientadora, Caroline Aquino Moreira-Nunes, que me recebeu como aluno e amigo no decorrer deste trabalho e para além dele, cujas palavras orientam o pensamento científico, mas também acalentam alma e coração nos momentos mais necessários.

Ao meu coorientador, Lucas Eduardo Botelho de Souza, que, para além da orientação, me cedeu tremendo suporte técnico e científico através do acesso ao Laboratório de Transferência Gênica no Hemocentro de Ribeirão Preto. À todos do “Lab TG”, meu muito obrigado, imensurável em palavras, pelo apoio, hospitalidade, paciência e laços de amizade que perduram para além do distanciamento espacial.

Aos professores, participantes tanto da banca qualificadora quanto da banca examinadora, André Salim Khayat e Wallax Augusto Silva Ferreira, por aceitarem os convites e por contribuírem com o início, desenvolvimento e finalização deste projeto.

Ao laboratório de Farmacogenética do NPDM, UFC, e a todos os seus integrantes, em especial ao companheiro de bancada e amigo Emerson Lucena da Silva, pela eterna disposição em ser útil e pelas iniciativas muitas vezes tomadas no sentido de ensinar os colegas e impulsionar o presente trabalho.

À todos os profissionais que trabalham no NPDM, à coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, pelo apoio institucional e pelas condições essenciais para realização deste projeto.

À todos os meus amigos, próximos e distantes, muitos previamente citados, aos que caminham ao meu lado por muitos anos e aos feitos ao longo da caminhada, obrigado pelo apoio emocional e pelo ensinamento de que o fardo dividido se torna mais leve.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pelo apoio financeiro fornecido a esta pesquisa.

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton

RESUMO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é um distúrbio clonal de células hematopoiéticas que pode apresentar diversos tipos de caracterização genética. Um dos piores prognósticos para LLA envolve a presença de translocação do cromossomo 9 para o cromossomo 22 (t(9;22)) dando origem ao oncogene *BCR-ABL p190+*. Pacientes adultos portadores de LLA de subtipo *BCR-ABL p190+* possuem taxas pobres de sobrevida em 5 anos por não responderem aos tratamentos clássicos com inibidores de tirosina-quinase disponíveis no mercado. Entretanto, estudos recentes utilizando inibidores de poli-ADP-ribose polimerase-1 (PARP1) mostram a efetividade destes fármacos sob a progressão de tumores com altos níveis de instabilidade genômica, sendo essa uma das características da presença do gene quimérico *BCR-ABL p190+*. Apesar disso, ainda não existe aprovação para o uso de inibidores de PARP (PARPi) no tratamento de nenhum subtipo leucêmico. Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial de inibição de PARP como terapia para o tratamento de modelos de LLA *BCR-ABL p190+*. O perfil de expressão de PARP1 foi caracterizado através de PCR em tempo real em diferentes linhagens representativas de malignidades hematológicas. A seguir, foi utilizada uma linhagem representativa de LLA *BCR-ABL p190+* e outras linhagens representativas de malignidades de linfócitos B para análise citotóxica com um PARPi, AZD2461, e com o inibidor de BCR-ABL, Imatinibe. Foram avaliados parâmetros fenotípicos associados aos tratamentos assim como a modulação da expressão de *PARP1* e *BCR-ABL p190*. Por fim, o nível de expressão de *PARP1* foi mensurado em pacientes portadores de LLA *BCR-ABL p190+*, sendo comparado a doadores saudáveis. O tratamento com AZD2461 apresentou níveis de citotoxicidade similares aos de Imatinibe no tratamento de malignidades *BCR-ABL p190+*, além de apresentar marcadores apoptóticos de maneira precoce e modular a expressão de *BCR-ABL* de maneira similar. Análises em pacientes com um maior *n* amostral são necessárias, entretanto os achados apontam para uma hiperexpressão significativa de *PARP1* em coortes de pacientes *BCR-ABL p190+*. Assim, o estudo farmacológico da via de inibição da enzima PARP1 tem potencial como alvo na terapia para LLA *BCR-ABL p190+*, sendo capaz de limitar a viabilidade das células em linhagens leucêmicas representativas desta malignidade.

Palavras-chave: BCR-ABL; Leucemia Linfóide Aguda; poli-ADP-ribose polimerase

ABSTRACT

Acute Lymphoid Leukemia (ALL) is a clonal disturbance of hematopoietic cells that may present a diverse set of molecular characteristics. Although pediatric patients have high curative rates, survival probability is low for adult patients afflicted with the disease. One of the worst prognosis of ALL revolves around the presence of a translocation of the chromosome 9 and 22 (t(9;22)) which originates the oncogene *BCR-ABL p190+*. Adult ALL patients from the subtype *BCR-ABL p190+* have a low 5-year overall survival due to non-responsiveness to the conventional tyrosine-kinase inhibitors available in the oncological practice. However, recent studies utilizing poly-ADP-ribose polymerase-1 (PARP1) inhibitors demonstrate the effectiveness of this drug class when treating tumors with high rates of genomic instability, which is a hallmark associated with the presence of the chimeric gene *BCR-ABL p190+*. Even then, PARP inhibitors (PARPi) still have no approval for use as treatment in any cases of hematological malignancies. In this context, this study aims to evaluate the potential of PARP inhibition as a treatment option for models of ALL *BCR-ABL p190+*. *PARP1* expression profile was characterized through real-time PCR in a cohort of cell models representative of hematological malignancies. A cell line representative of ALL *BCR-ABL p190+* and other cell lines representative of B-cell malignancies were then used for cytotoxic assays utilizing a PARPi, AZD2461, and the BCR-ABL inhibitor, Imatinib. Phenotypical parameters associated with the proposed treatments were analyzed, as well as *PARP1* and *BCR-ABL p190* expression. Finally, *PARP1* expression levels were measured in LLA *BCR-ABL p190+* patients, being compared to healthy donors. The usage of AZD2461 present cytotoxic levels similar to that of Imatinib when treating BCR-ABL positive malignancies, also inducing presentation of premature death markers and modulating *BCR-ABL* expression in a similar manner. Patient analysis with a larger *n* are still warranted, however the experimental findings point towards *PARP1* significant overexpression in *BCR-ABL p190+* patient cohorts. Thereby, the pharmacological study of PARP1 inhibition has potential as a therapeutic option in the treatment of ALL *BCR-ABL p190+*, being able to limit cell viability in cell lines representative of this malignancy.

KEYWORDS: BCR-ABL; Acute Lymphoid Leukemia; Poli-ADP-Ribose Polimerase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Características fenotípicas inerentes à carcinogênese.....	23
Figura 2 – Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de resistência no câncer	25
Figura 3 – Protocolos hyper-CVAD e mini-hyper-CVD.....	29
Figura 4 – Pontos de quebra e fusões da translocação BCR-ABL.....	34
Figura 5 – Representação estrutural de Poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) e seus domínios funcionais.....	36
Figura 6 – Modos de adição e alongamento de cadeias de ADP-ribose.....	38
Figura 7 – Mecanismo de ação de poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) e fatores regulatórios	39
Figura 8 – Modelo esquemático de parthanatos.	43
Figura 9 – Aplicabilidade clínica do conceito de letalidade sintética.....	45
Figura 10 – Diferenças estruturais entre Olaparib e o análogo AZD2461	49
Figura 11 – Comparação da expressão de <i>PARP1</i> entre um painel de células saudáveis e linhagens leucêmicas	62
Figura 12 – Comparação da expressão de <i>PARP1</i> entre modelos de malignidades linfóides e células saudáveis	63
Figura 13 – Ganhos e perdas cromossomais na linhagem SUP-B15.....	64
Figura 14 – Perfil de arrasto no ciclo celular da linhagem SUP-B15 após tratamento de 24 horas com AZD2461 ou Imatinibe	68
Figura 15 – Indução de apoptose precoce na linhagem SUP-B15 após tratamento com AZD2461	70
Figura 16 – Níveis de expressão do biomarcador BCR-ABL p190 e da proteína PARP1 na linhagem SUP-B15 após tratamento com AZD2461 ou Imatinibe.....	71
Figura 17 – Tratamento com AZD2461 revela maiores níveis de PARP1 em população pré-apoptótica	72
Figura 18 – Comparação da expressão de PARP1 entre pacientes portadores de LLA BCR-ABL p190+ e doadores saudáveis.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxas de incidência de leucemia pediátrica na primeira infância (< 5 anos), por milhão, de acordo com o subtipo leucêmico no Brasil de 1999 a 2010.....	27
Tabela 2 – Indicações para realização de TCTH em primeira remissão de pacientes de LLA pediátrica de acordo com o protocolo BFM-AIEOP 2009.....	30
Tabela 3 – Citogenética e anormalidades moleculares em Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.....	33
Tabela 4 – Inibidores de Poli-ADP-Ribose (PARP) aprovados e seus usos clínicos.....	46
Tabela 5 – Inibidores de Poli-ADP-Ribose (PARP) investigados em malignidades hematológicas.....	50
Tabela 6 – Caracterização das linhagens leucêmicas humanas.....	52
Tabela 7 – Concentração inibitória mínima para viabilidade de 50% das células (CI50) de diferentes linhagens em 72 horas de incubação com diferentes drogas, medido em valores nanomolares (nM).....	65
Tabela 8 – Concentração inibitória mínima para viabilidade de 50% das células (CI50) na linhagem SUP-B15 em 24 e 48 horas de incubação com diferentes drogas, medido em valores nanomolares (nM).....	66
Tabela 9 – Características clínicas dos pacientes analisados portadores de LLA e positivos para BCR-ABL p190.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-amino-actinomicina D
ABCB	<i>ATP binding cassette subfamily B</i>
aCGH	Hibridação Genômica Comparativa
ADM2	<i>Aberration Detection Method 2</i>
ADPRS	ADP-ribosilserina hidrolase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Subdomínio Cataliticamente Ativo
ATM	Serina/Treonina quinase ATM
BCR-ABL	BCR ativador de RhoGEF e GTPase – ABL proto-oncogene
BRCA	Gene associado ao reparo do DNA BRCA
BRCT	Domínio de Auto-Modificação
CAR-T	Células T com Receptores de Antígenos Quiméricos
CDKN1A	Inibidor de Ciclinas Dependente de Quinase 1A
cDNA	DNA complementar
CI50	Concentração Inibitória para 50% das Células
CNA	Alteração de Número de Cópias
CNN	Células não-neoplásicas
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CTD	Domínio C Terminal
DEK	Proto-oncogene DEK
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNC	Doenças Não-Comunicáveis
DRM	Doença Residual Mínima
EBV	Epstein-Barr Vírus
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ERK2	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>
ETV6	ETS fator de transcrição variante 6
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
H2AX	Histona Variante H2A.X
HD	Subdomínio Helicoidal

IKZF1	<i>Zinc finger 1</i> da família IKAROS
ITQ	Inibidor de tirosina-quinase
JAK	Janus Kinase
KMT2A	Lisina metiltransferase 2A
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LF	Linfoma Folicular
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MDM2	Proto-oncogene MDM2
MIF	Mediana da Intensidade de Fluorescência
MM	Mieloma Múltiplo
MYC	MYC proto-oncogene
NK	<i>Natural Killers</i>
NMP	Neoplasma Mieloproliferativo
OARD1	O-acil-ADP-ribose deacilase 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína Tumoral p53
PAR	Poli-ADP-Ribose
PARP	Poli-ADP-Ribose Polimerase
PARPi	Inibidor de Poli-ADP-Ribose Polimera
PARG	Poli-ADP-Ribose Glicohidrolase
PBS	Tampão Fosfato
PBX1	<i>PBX homeobox 1</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ph+	Philadelphia Positivo
PI	Iodeto de Propídio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinase
qPCR	PCR em Tempo Real Quantitativa
RAD51	RAD51 Recombinase
RAS	RAS proto-oncogene

RDD	Resposta a Danos no DNA
RPM	Rotações por Minuto
RRH	Reparo por Recombinação Homóloga
RUNX1	Fator de Transcrição 1 da Família RUNX
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TCTH	Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas
TCF3	Fator de Transcrição 3
TCR	Receptor de Células T
TLX1	Leucemia de células T homeobox 1
TLX3	Leucemia de células T homeobox 3
TP53	Gene da Proteína Tumoral p53
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing 1</i>
WGR	Domínio Conservado de Aminoácidos Trp-Gly-Arg
WNT	Gene WNT
Zn	<i>Zinc-Fingers</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Problema a ser pesquisado	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Especificos	21
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Câncer	22
3.2 Leucemia Linfoblástica Aguda	26
3.2.1 Etiopatogênese e Epidemiologia	26
3.2.2 Protocolos de Tratamento e Obstáculos	28
3.2.3 Caracterização Molecular	32
3.2.4 <i>BCR-ABL</i> na LLA	33
3.3 Poli-ADP-Ribose Polimerases (PARP)	35
3.3.1 Estrutura de PARP1 e PARilação	35
3.3.2 Interações moleculares de PARP1	40
3.3.3 Mecanismos de inibição e letalidade sintética	43
3.3.4 Inibidores de PARP na clínica	46
3.3.5 PARP e neoplasias hematológicas	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Modelos Celulares	52
4.2 Substâncias Químicas	53
4.3 Avaliação Molecular	53
4.3.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa	53
4.3.2 Desenho de <i>Primers</i> e Validação da Expressão Gênica por <i>Real-Time</i> PCR Quantitativo (qPCR)	54
4.3.3 Extração de DNA	55
4.3.4 Análise de hibridização genômica comparativa baseada em matriz (aCGH)	55
4.3.5 Alteração de Número de Cópias (CNAs)	56
4.4 Avaliação Fenotípica	57
4.4.1 Ensaio de Citotoxicidade por <i>Alamar Blue</i>	57
4.4.2 Perfil de Arrasto do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	58
4.4.3 Indução e quantificação de apoptose precoce por Citometria de Fluxo	59
4.4.4 Alteração nos níveis de PARP1 intracelulares	59
4.4.5 Determinação de alteração nos perfis de expressão molecular	60

	17
4.5 Pacientes	61
4.5.1 Aspectos Éticos e Coleta	61
4.5.2 Amostras Biológicas	61
5. RESULTADOS	62
5.1 Caracterizações Moleculares	62
5.1.1 Expressão de <i>PARP1</i> em linhagens leucêmicas	62
5.1.2 Alterações no número de cópias genômicas por <i>aCGH array</i>	63
5.2 Avaliações fenotípicas em linhagens linfóides	65
5.2.1 Determinação de concentrações inibitórias mínimas	65
5.2.2 Avaliação de alteração do ciclo celular	67
5.2.3 Capacidade de indução de apoptose precoce	69
5.2.4 Alterações no perfil de expressão e apresentação de <i>PARP1</i>	70
5.3 Validação de biomarcadores em amostras de pacientes	72
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	93
ANEXO B – ARTIGOS GERADOS	96

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a terapêutica oncológica tradicional, com a utilização de agentes citotóxicos, vem se mostrando pouco eficiente para o tratamento das mais diversas malignidades. Assim sendo, o surgimento de novas moléculas para o manejo e tratamento de pacientes oncológicos se torna imprescindível no sentido de que melhores prognósticos possam ser alcançados (TAYLOR; ESKANDER, 2017).

Um grande desafio ainda existente dentro do contexto das neoplasias é o tratamento de pacientes adultos acometidos por leucemia linfoblástica aguda (LLA) que, mesmo quando tratados, apresentam taxas de sobrevivência de apenas 40%. Alguns dos principais fatores envolvidos na baixa sobrevida estão relacionados a uma citogenética agressiva das células tumorais e uma baixa tolerância dos pacientes aos quimioterápicos (KANSAGRA; DAHIYA; LITZOW, 2018).

Um dos perfis mais agressivos na LLA ocorre na presença do cromossomo Filadélfia, uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 que gera o oncogene BCR-ABL e suas proteínas de isoformas p210 e p190, entretanto a isoforma p190 é a predominante em LLA. É sabido que, independente da isoforma, estas proteínas estão envolvidas em mecanismos que desregulam o ciclo celular e levam assim ao processo carcinogênico (EL FAKIH et al., 2018).

O atual tratamento para pacientes cromossomo Philadelphia positivo (Ph+) nos diferentes tipos de câncer envolve o uso de inibidores de tirosina-quinase (ITQ) e apresenta resultados satisfatórios (JIAO et al., 2018). Entretanto, paciente adultos portadores de LLA Ph+ ainda possuem mau prognóstico devido a baixa responsividade da isoforma p190 aos ITQ e, portanto, diversas abordagens terapêuticas são necessárias para um tratamento eficaz (MISHRA et al., 2006).

Neste contexto surgem os inibidores de Poli-ADP-Ribose Polimerase 1 (PARP1), uma enzima responsável pelo reparo de fitas simples e duplas de DNA celular, com intuito de apresentar uma via medicamentosa alternativa para a apoptose de células tumorais. Apesar de a inibição de PARP1 por si não ser letal a célula, quando associada a mutações nos genes associados ao reparo do DNA *BRCA1/2* (*BRCA1/2*), reguladores da via de reparo por recombinação homóloga (RRH), a falta de capacidade de reparo do material genético pode levar à morte celular em um processo conhecido como letalidade sintética (BYRUM; VINDIGNI;

MOSAMMAPARAST, 2019; D'ANDREA, 2018; LORD; ASHWORTH, 2016; MCCANN; HURVITZ, 2018).

Investigações recentes sobre a eficácia de inibidores de PARP1 (PARPi) em diferentes malignidades identificaram que, mesmo na ausência de mutações em *BRCA1/2*, alguns tumores podem apresentar fenótipos de deficiência em RRH, um estado celular nomeado de *BRCAness* em referência a perda de funções associadas a *BRCA*. A presença de translocações e rearranjos cromossômicos, assim como outros tipos de cicatrizes genômicas, são grandes marcadores de instabilidade genômica, sendo indicativos de *BRCAness*, e estão presentes em diversos casos de leucemogênese, como em leucemias Ph+ (BYRUM; VINDIGNI; MOSAMMAPARAST, 2019; WATKINS et al., 2014).

Além disso, a translocação de *BCR-ABL1* é uma grande indutora de instabilidade genômica devido, principalmente, a promoção de vias de reparo não conservativas, como a junção de extremidades não-homóloga, e, portanto, se aproxima, ainda que hipoteticamente, de modelos celulares com fenótipo *BRCAness* (ABDULMAWJOOD et al., 2021; NIEBOROWSKA-SKORSKA et al., 2012; SLUPIANEK et al., 2011).

Inibidores de PARP já são aprovados para o uso como monoterapia no tratamento de neoplasias de ovário e de mama e, em diversos estudos clínicos, os resultados destes medicamentos se mostram superiores aos das quimioterapias tradicionais (MCCANN; HURVITZ, 2018). Entretanto, o uso destes fármacos para o tratamento de pacientes portadores de LLA Ph p190+ e refratários aos tratamentos tradicionais ainda não é investigado e a maioria dos estudos clínicos na área da oncohematologia ainda são escassos e se encontram em fases iniciais (MAN; MORRIS; KENG, 2017).

1.1 Problema a ser pesquisado

O acometimento por LLA Ph+ ainda significa um mau prognóstico para pacientes adultos devido a baixa eficácia dos tratamentos e altas taxas de remissão. Os principais medicamentos utilizados nos tratamentos padrões são antigos e, portanto, não acompanham os avanços observados no tratamento de outros tipos de câncer. Sendo assim, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é extremamente necessário no intuito de melhorar a qualidade de vida para pacientes

LLA Ph p190+ (KANSAGRA; DAHIYA; LITZOW, 2018; MAN; MORRIS; KENG, 2017; MISHRA et al., 2006).

Neste contexto, o uso de inibidores de PARP pode apresentar potencial terapêutico no tratamento de pacientes LLA Ph p190+ e pacientes pediátricos em LLA refratária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de inibição da enzima Poli-ADP-Ribose Polimerase 1 (PARP1) em modelos de leucemia linfoblástica aguda como potencial terapia para pacientes do subtipo *BCR-ABL* p190+.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a expressão gênica da enzima PARP1 em modelos *in vitro* de leucemias e linfomas de diferentes subtipos;
- Avaliar o efeito fenotípico de um inibidor de PARP, AZD2461, em linhagens de leucemia linfoblástica aguda, SUP-B15 (*BCR-ABL* p190+), e linfomas, Raji (MYC-IGH) e Namalwa;
- Analisar a expressão gênica da enzima PARP1 em amostras de pacientes com LLA de subtipo *BCR-ABL* p190+;
- Propor a enzima PARP1 como um potencial alvo terapêutico para pacientes com LLA de subtipo *BCR-ABL* p190+.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reporta o câncer como sendo uma das principais causas de morte mundialmente entre populações idosas. De acordo com a OMS, doenças não-comunicáveis (DNC), que incluem câncer como um dos maiores agentes, são responsáveis por 71% das mortes globalmente a cada ano, e o progresso nas metas globais para prevenção e controle das DNCs ainda é lento. Como uma clara barreira para melhora da expectativa de vida no mundo, é esperado que a prevalência do câncer aumente nos próximos anos e a estimativa é de que mais de 28 milhões de pessoas sejam afetadas em 2040 (BENNETT et al., 2018; FITZMAURICE et al., 2019; SUNG et al., 2021).

Enquanto a incidência e as taxas de mortalidade possuem alta variância entre os diferentes subtipos de tumores, 18% de todas as mortes relacionadas ao câncer em 2020 foram atribuídas a tumores de pulmão enquanto tumores de pulmão, mama, cólon, estômago, fígado e esôfago foram, em conjunto, responsáveis por aproximadamente 50% das taxas de mortalidade por câncer no mesmo ano (SUNG et al., 2021).

Leucemias e linfomas são um grupo de diversas desordens de tecidos hematológicos e linfoides, tendo como característica a acelerada expansão clonal de populações neoplásticas de linhagens celulares imuno-hematológicas no sangue periférico/medula óssea e nos linfonodos dos pacientes acometidos, respectivamente (ARMITAGE et al., 2017; JULIUSSON; HOUGH, 2016). Linfomas não-Hodgkin estão entre os 10 tipos de câncer mais incidentes no mundo e, somados, leucemias e linfomas afetam mais de 400 mil pessoas a cada ano, existindo ainda falta de tratamentos eficazes entre alguns dos diferentes subtipos leucêmicos (FITZMAURICE et al., 2019; JULIUSSON; HOUGH, 2016).

Enquanto estruturas biológicas, tumores são altamente dependentes da hiperexpressão de mecanismos de proliferação celular e sobrevivência que amparam o crescimento tumoral mesmo em cenários que seriam, em outras situações, adversos (**Figura 1**). O status maligno de clones neoplásicos é atingido através de eventos multifatoriais da fisiologia normal humana, estilo de vida, exposição a agentes ambientais e predisposições genéticas que, em conjunto, levam à falha na maquinaria de reposta a danos no DNA (RDD) e, conseqüentemente, induzem o acúmulo de

mutações no material genético e anormalidades cromossômicas (HANAHAN, 2022; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015; PETERS; GONZALEZ, 2018).

Figura 1. Características fenotípicas inerentes à carcinogênese.



Fonte: Adaptada de Hanahan, 2022.

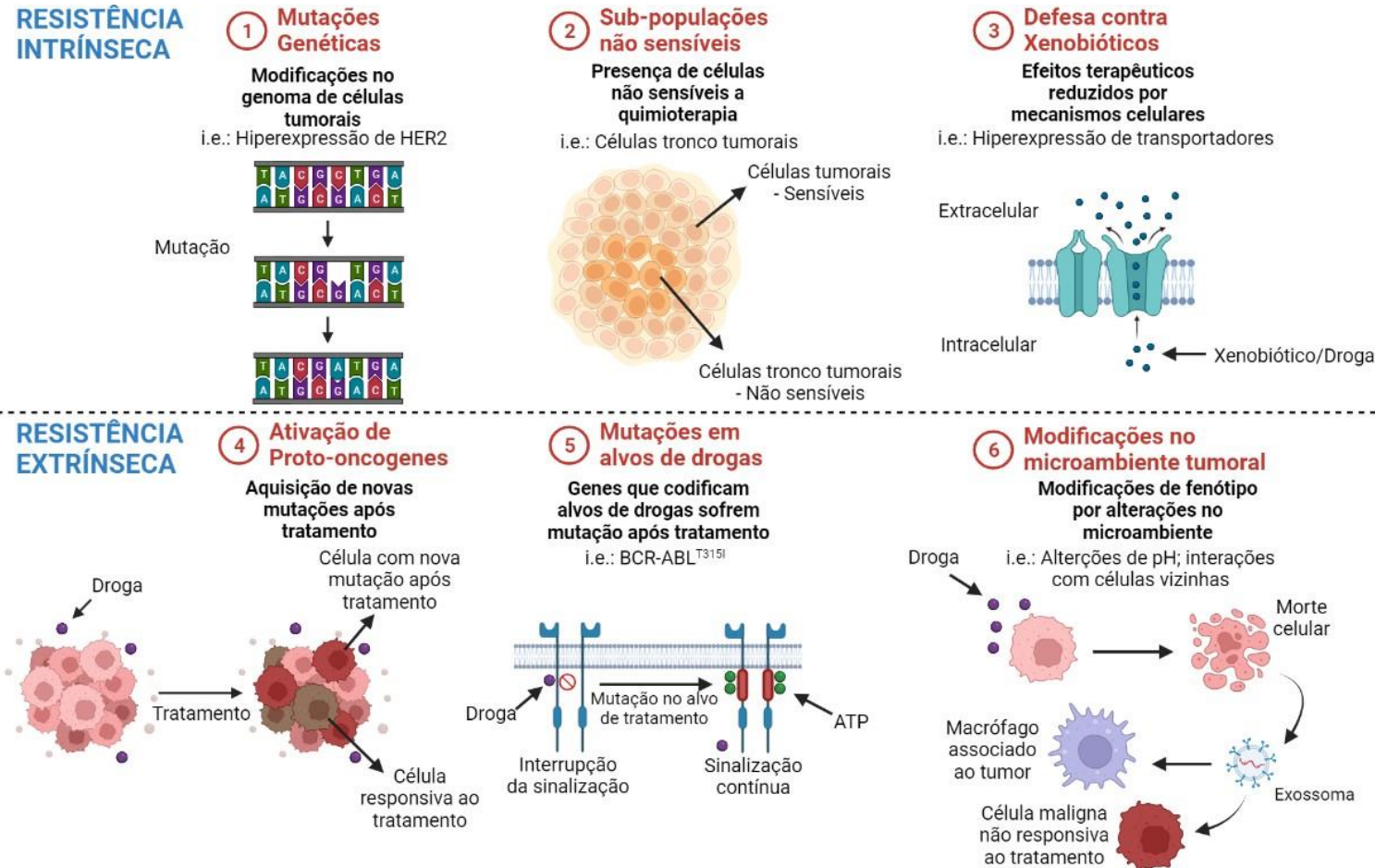
As opções tradicionais em imuno-quimioterapia para o tratamento do câncer focam no uso de agentes citotóxicos que são capazes de sobrepor os mecanismos de sobrevivência dos clones neoplásicos, induzindo a apoptose, assim como na habilidade de capacitar o sistema imune do hospedeiro para impedir o crescimento contínuo das células malignas (BULK; VERDEGAAL; MIRANDA, 2018; HAJDU; VADMAL, 2013; VARGAS; APETOH, 2017). Apesar de representarem grandes marcos no manejo clínico de pacientes oncológicos, as terapias acima mencionadas ainda enfrentam um grande obstáculo na ocorrência de efeitos colaterais severos devido aos seus perfis de toxicidade sobre a homeostase de

populações celulares saudáveis (JASRA; ANAMPA, 2018; KENNEDY; SALAMA, 2020; PORTUGAL et al., 2017).

Outro grande obstáculo para a devida efetividade dos atuais tratamentos para o câncer é a emergência dos casos altamente perigosos de multirresistência a drogas, que são os maiores responsáveis pela refratariedade terapêutica no câncer. Casos de multirresistência podem ser intrínsecos, existindo inerentemente em um tumor mesmo antes de exposição ao tratamento, ou adquiridos, emergindo como resposta dos clones neoplásicos a pressão seletiva exercida pelo perfil de citotoxicidade farmacológica, e ambos os mecanismos podem acontecer simultaneamente e cooperar para a progressão da malignidade (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020; WANG; ZHANG; CHEN, 2019).

Independentemente de serem intrínsecas ou adquiridas, vias de multirresistência conferem aos tumores a capacidade de escapar dos efeitos de impedimento da proliferação e sobrevivência exercidos pelos tratamentos citotóxicos através de mecanismos como o aumento do efluxo de drogas pela hiperexpressão de transportadores transmembranares, a regulação positiva de proteínas da via de RDD, realização de alterações epigenéticas que modificam a expressão de oncogenes e por alterações diretas no microambiente tumoral (**Figura 2**) (MACHADO et al., 2021; WANG; ZHANG; CHEN, 2019).

Figura 2. Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de resistência no câncer.



Legenda: ① Mutações genéticas podem levar a alterações na expressão de genes relacionados a resistência celular e monitoramento de ciclo. ② Tumores heterogêneos podem conter subpopulações resistentes a drogas citotóxicas, levando à remissão após tratamento. ③ Alguns transportadores de membrana protegem as células de toxinas ambientais, como drogas citotóxicas, e reduzem as suas concentrações intracelulares. ④ Após tratamento, novos oncogenes podem ser ativados, levando ao aumento de taxas de proliferação e diminuição da responsividade aos tratamentos. ⑤ Mutações em genes que codificam alvos de drogas podem reduzir a eficiência destas drogas em células mutadas. ⑥ O tratamento pode alterar o microambiente tumoral e levar a comunicação entre células sensíveis e seus arredores. A troca de elementos de resistência com macrófagos associados ao tumor e outras células tumorais levam a maior resistência à quimioterapia. Fonte: Adaptado de Machado *et al*, 2021.

A necessidade de evitar os perfis altamente tóxicos da imuno-quimioterapia convencional e a urgência em superar os casos emergentes de multirresistência tumoral tem instigado um interesse crescente nos campos da medicina de precisão e de terapias moleculares alvo-específicas nas últimas décadas. Apesar de serem alternativas relativamente novas na prática oncológica, a grande especificidade e os resultados clínicos positivos alcançados através de terapias moleculares alvo-específicas já lhes consolidaram como uma perspectiva promissora para o futuro no gerenciamento do câncer (LEE; TAN; OON, 2018; MACHADO et al., 2021).

3.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

3.2.1 Etiopatogênese e Epidemiologia

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia do sistema hematopoiético que se caracteriza pela expansão clonal anormal de células precursoras de linhagens linfocitárias, levando a hiperproliferação de células B, T ou, mais raramente, *Natural Killers* (NK). Enquanto as leucemias são a malignidade mais comum entre pacientes pediátricos, a LLA é o subtipo leucêmico mais comum entre estes mesmos pacientes e 85% dos casos de LLA apresentam fenótipo hiperproliferativo de células B (LUCA, 2021).

Os eventos que levam à transformação maligna são complexos e multifatoriais de modo que as taxas de incidência de LLA sofrem influência tanto de fatores sócio-econômicos e ambientais como de fatores relacionados à miscigenação populacional e etnias. Rastreios epidemiológicos em populações dos Estados Unidos demonstram uma maior incidência de LLA em populações de origem espanhola, seguido por populações caucasianas e uma incidência consideravelmente menor em populações afro-americanas (FUJITA et al., 2021; RIES et al., 1999).

No Brasil, a análise de casos de leucemias na primeira infância (< 5 anos) demonstra uma taxa média de incidência 3 vezes maior de LLA comparado a outras leucemias agudas não-linfóides e uma maior frequência de acometimento de pacientes do sexo masculino. Entretanto, os valores previamente mencionados se referem à médias nacionais e a **Tabela 1** resume as intensas variações que são observadas entre as regiões geográficas do país (REIS et al., 2016).

Tabela 1. Taxas de incidência de leucemia pediátrica na primeira infância (< 5 anos), por milhão, de acordo com o subtipo leucêmico no Brasil de 1999 a 2010.

Região Geográfica	RCPB (população)	n	Razão (M/F)	Razão (LLA/LANL)
Norte	Belém (1999-2003)	65	1.63	3.65
	Manaus (2011-2005)	81	1.74	3.61
Nordeste	Aracajú (2004-2008)	12	2.73	–
	Fortaleza (2002-2006)	71	1.68	2.73
	João Pessoa (2003-2007)	18	0.78	2.56
	Natal (2011-2005)	16	0.96	1.67
	Recife (2003-2007)	36	0.62	3.00
	Salvador (2001-2005)	49	1.08	2.27
	Teresina (2000-2002)	12	0.96	1.00
	Centro-Oeste	Campo Grande (2000-2003)	14	0.75
Cuiabá (2002-2006)		28	1.10	8.11
Distrito Federal (1999-2002)		38	1.07	5.41
Goiânia (2005-2009)		45	1.44	6.39
Sudeste	Belo Horizonte (2001-2005)	45	1.01	3.48
	Grande Vitória (2004-2008)	34	1.56	2.08
	São Paulo (2006-2010)	198	1.31	3.39
Sul	Curitiba (2004-2008)	61	0.88	3.59
	Porto Alegre (2002-2006)	42	2.14	2.53
Média			1.09	3.00

RCPB: Registro de câncer baseado na população; LLA: Leucemia Linfóide Aguda; LANL: Leucemias agudas não-linfoblásticas.

Fonte: Adaptado de Reis *et al.* 2016.

Tomando como referência levantamentos epidemiológicos de períodos anuais prévios realizados nas capitais estaduais do Brasil, é constatada uma crescente dos casos de LLA nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste e um declínio do número de casos em São Paulo. A interpretação destes dados, entretanto, deve ser feita com cautela, pois é provável que estas variações estejam refletindo tanto alterações ambientais e demográficas destas regiões como também alterações organizacionais do Sistema Único de Saúde (SUS), que vieram a proporcionar uma maior notificação de casos em regiões com prévia subnotificação e descentralização dos atendimentos em regiões de alta densidade demográfica, como São Paulo (REIS *et al.*, 2016).

Apesar da grande incidência de casos de LLA pediátrica, os avanços em diagnóstico e tratamento das últimas décadas tornaram este um subtipo leucêmico de baixo risco de mortalidade, com taxas de sobrevivência em 5 anos maiores que 90% (INABA; MULLIGHAN, 2020). O prognóstico, entretanto, piora conforme a idade dos pacientes acometidos avança, principalmente pelo perfil citotóxico agressivo dos protocolos de quimioterapia intensa que estabelecem doses limitantes mais baixas para pacientes mais velhos em relação a crianças (ALDOSS; STEIN, 2018; COCCARO et al., 2019).

Entretanto, o prognóstico para pacientes acometidos por LLA é notadamente pior em países de baixo grau de desenvolvimento econômico. No Brasil, mesmo casos de LLA pediátrica possuem taxas de sobrevida em 5 anos após o diagnóstico abaixo de 70% e pacientes adultos portadores de malignidades linfóides possuem taxas de sobrevida ainda mais baixas, próximas a 46% considerando o mesmo período de 5 anos. Além disso, as taxas de sobrevida no Brasil parecem caminhar em sentido contrário aos avanços mundiais, permanecendo estagnadas ou mesmo decaindo em relação a análises epidemiológicas de períodos anuais prévios (ALLEMANI et al., 2018; DA SILVA; LATORRE, 2020).

3.2.2 Protocolos de Tratamento e Obstáculos

Protocolos de tratamento convencionais para LLA não seguem um padrão unificado, sendo personalizados com base em fatores de risco do paciente e preferências do centro de saúde o qual realiza o tratamento. Entretanto, o princípio em comum se baseia nas fases do tratamento que se dividem em pré-remissional, sendo esta a fase de indução que tem por objetivo levar a remissão da doença na medula óssea, e a fase pós-remissional, que engloba as fases de consolidação do tratamento, com uso de quimioterapia intensa para diminuir os níveis de doença residual mínima, e a fase do tratamento de manutenção (NCCN GUIDELINES FOR PATIENTS, 2021).

Agentes citotóxicos costumeiramente utilizados nos ciclos quimioterápicos incluem antraciclina, agentes alquilantes, antimetabólicos, alcalóides, terapias enzimáticas e corticoesteróides. Protocolos combinatórios destes agentes podem ser de alta intensidade, como hyper-CVAD, que significa o uso hiperfracionado de ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dexametasona, ou de menor intensidade, como mini-hyper-CVD, que é normalmente voltado para uso em pacientes em idade

mais avançada e se baseia em hyper-CVAD, porém utilizando concentrações mais baixas de quimioterápicos e excluindo o uso da classe das antraciclinas (**Figura 3**) (JABBOUR et al., 2018; KANTARJIAN et al., 2000; NCCN GUIDELINES FOR PATIENTS, 2021; OTHMAN et al., 2022).

Figura 3. Protocolos hyper-CVAD e mini-hyper-CVD.

Hyper-CVAD	Mini-hyper-CVD
<ul style="list-style-type: none"> • Ciclofosfamida: 300 mg/m² intravenosa por 3 horas a cada 12 horas dos dias 1 ao 3 • Vincristina: 2 mg intravenosa nos dias 4 e 11 • Doxorubicina: 50mg/m² intravenosa no dia 4 • Dexametasona: 40 mg diariamente dos dias 1 ao 4 e dos dias 11 ao 14 • Metotrexato: 200 mg/m² intravenosa por 2 horas seguido por 800 mg/m² intravenosa por 24 horas no dia 1 • Citarabina: 3 g/m² por 2 horas a cada 12 horas, sendo aplicada 4 vezes entre os dias 2 e 3 • Metilprednisolona: 50 mg intravenosa duas vezes ao dia dos dias 1 ao 3 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclofosfamida: 150 mg/m² intravenosa a cada 12 horas dos dias 1 ao 3 • Vincristina: 2 mg intravenosa nos dias 1 e 8 • Dexametasona: 20 mg diariamente dos dias 1 ao 4 e dos dias 11 ao 14 • Metotrexato: 250 mg/m² intravenosa no dia 1 • Citarabina: 0,5 g/m² a cada 12 horas, sendo aplicada 4 vezes entre os dias 2 e 3

Legenda: Utilizados para fase de indução no tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda, os protocolos descritos podem ainda sofrer variações de acordo com as preferências do centro de saúde ou do profissional responsável pela prescrição, como administração de mesma em conjunto de ciclofosfamida, buscando atenuação de efeitos adversos.

Fonte: Kantarjian *et al.*, 2000; Jabbour *et al.*, 2018.

A utilização de ciclos quimioterápicos para o tratamento é acompanhada, como já bem descrito na literatura e na prática clínica, de diversos eventos adversos relacionados a desregulação da homeostase tecidual e citotoxicidade sob células saudáveis. Náusea, estomatite, pancitopenia, neuropatia e nefrotoxicidade são efeitos comuns em pacientes oncológicos sobre esquema quimioterápico, além de eventos adversos considerados severos como infecções, hepatotoxicidade e eventos trombóticos (LOCATELLI et al., 2021; NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018; WEST et al., 2021). O prognóstico de pacientes adultos é, em geral, pior que o de pacientes pediátricos devido a existência de toxicidades limitantes de concentrações

quimioterápicas que limitam a agressividade, e conseqüentemente a efetividade, do esquema terapêutico (ALDOSS; STEIN, 2018).

Apesar das altas taxas de sobrevida alcançadas no tratamento de LLA, taxas de relapso ainda atingem 15-20% dos pacientes, podendo este relapso ser medular ou extramedular, com focos de relapso no sistema nervoso central (SNC) ou nas gônadas. A preocupação quanto a proliferação de células leucêmicas no SNC tornou, por muito tempo, a irradiação cranial profilática em um padrão no tratamento de LLA, entretanto, na última década, protocolos de tratamento intratecal utilizando metotrexato mostraram-se capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e substituir a irradiação cranial com efetividade comparável, diminuindo efeitos adversos e possíveis sequelas terapêuticas, principalmente em paciente pediátricos (GAUDICHON et al., 2019; JEHA et al., 2019; PUI et al., 2009; VEERMAN et al., 2009).

Uma alternativa no tratamento curativo de LLA é a realização de transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Indicações para TCTH, entretanto, continuam controversas e podem variar entre pacientes adultos e pediátricos, e até mesmo entre subpopulações de pacientes pediátricos a depender da idade. A **Tabela 2** reúne indicações para TCTH em primeira remissão e, de maneira geral, as recomendações baseiam na associação de fatores como citogenética de alto risco, mensuração da doença residual mínima (DRM) em dias específicos do tratamento e resposta do paciente à prednisolona, podendo também ser indicada em virtude de fatores individuais indicativos de mau prognóstico, como falha em remissão sob primeiro protocolo de indução (DEFILIPP et al., 2019; MERLI et al., 2019).

Tabela 2. Indicações para realização de TCTH em primeira remissão de pacientes de LLA pediátrica de acordo com o protocolo BFM-AIEOP 2009.

Hierarquia de Critérios	Resultados de DRM por PCR				
	DRM-RP	DRM-RM	DRM PT2 $\geq 10^{-3}$ a $< 10^{-2}$	DRM PT2 $\geq 10^{-2}$	Sem resultados de DRM
Sem RC no dia 33	Não indicado	DCNC	DCNC	DCNC	DCNC
t(4;11)	Não indicado	DC	DC	DCNC	DC
Hipodiploidia < 44 cromossomos	Não indicado	DC	DC	DCNC	DC

RRP + LLA-T	Não indicado	Não indicado	DC	DCNC	DC
Nenhuma das características acima	Não indicado	Não indicado	DC	DCNC	Não indicado

DC: Transplante permitido com doador de HLA compatível; DCNC: Transplante permitido com doador de HLA compatível ou não-compatível; DRM: Doença Residual Mínima; DRM-RM: Doença residual mínima – risco médio; DRM-RP: Doença residual mínima – risco padrão; LLA-T: Leucemia linfóide aguda de células T; PCR: *Polymerase Chain Reaction*; PT2: Ponto de tempo 2 para mensuração de DRM (dia 78 após início do tratamento); RC: Resposta completa; RRP: Resposta ruim a prednisolona; TCTH: Transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Fonte: Adaptado de Merli *et al.*, 2019.

Em décadas recentes, a introdução de terapias alvo-específicas passou a ser incorporada aos ciclos quimioterápicos em pacientes portadores de LLA com fenótipos bem definidos. O uso de ITQs para pacientes *BCR-ABL* positivos e *Ph-like* e combinações de protocolos de indução convencionais com novas opções de imunoterapia no uso de rituximab, um inibidor de CD20, e blinatumomab, um inibidor bi-específico de CD19 e CD3, trouxe considerável melhora a sobrevida de pacientes refratários e de pior prognóstico (RAFEI; KANTARJIAN; JABBOUR, 2019; VROOMAN; SILVERMAN, 2016).

Atualmente, a mais nova perspectiva no tratamento de casos de LLA refratária ou em relapso se pauta no uso de células T com receptores de antígenos quiméricos (CAR-T) geneticamente direcionadas para atingir antígenos de membrana como CD19, CD20 ou CD22 de células tumorais, ou até mesmo em modelos combinatórios com uma mesma célula T tendo mais de um antígeno como alvo. Dificuldades da utilização de CAR-T envolvem os altos custos de produção e o tempo necessário para modificar geneticamente células autólogas de pacientes que, muitas vezes, estão em fases leucêmicas avançadas. Na tentativa de mitigar esses obstáculos, protocolos para produção em larga escala de CAR-T halogênicos estão sendo estabelecidos e padronizados em centros de saúde mundialmente (MARTINO *et al.*, 2021; PEHLIVAN; DUNCAN; LEE, 2018; SHAH *et al.*, 2021).

O uso de protocolos quimioterápicos convencionais, apesar de altamente efetivos em pacientes pediátricos, está atualmente limitado pelas altíssimas concentrações já utilizadas, sendo inviável a busca por taxas de sobrevida melhores em pacientes com doença refratária ou em relapso através de maiores concentrações de drogas nesta única estratégia. Assim, as novas opções de tratamento alvo-específicos e de imunoterapia são o caminho a ser seguido no objetivo de aumentar

a sobrevivência de pacientes acometidos por LLA, proporcionando menos efeitos adversos e sequelas terapêuticas.

3.2.3 Caracterização Molecular

Em sua maioria, casos emergentes de LLA infantil não possuem uma causa unificada e bem definida, sendo muitas vezes associados a exposição da mãe em período pré-natal ou do bebê, pós-natal, a fatores de risco como radiação ionizante e pesticidas utilizados em agricultura (KUMAR; VASHIST; RATHEE, 2014). O risco de incidência de LLA infantil também está relacionado à presença de condições genéticas como síndrome de Down, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom, apesar de as funções que as alterações cromossômicas relacionadas a estas síndromes possuem na leucemogênese ainda não estarem bem caracterizadas (BHOJWANI; YANG; PUI, 2015; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Genomas de tumores de LLA pediátrico tendem a ser relativamente simples, contendo poucas mutações em genes codificantes de proteínas. Grande número destas mutações, entretanto, ocorre em genes de elevada importância para a homeostase celular como *TP53*, genes da família de *Ras*, Fosfatidilinositol 3-kinase (*PI3K*) e Janus kinase (*JAK*). A perda de função de genes supressores de tumor ou a ativação constitutiva de oncogenes acaba induzindo a desregulação do ciclo celular, hiperativação de sinais de transcrição e diminuição da capacidade de diferenciação linfocitária, promovendo o fenótipo hiperproliferativo associado a leucemias agudas (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; PAGLIARINI; SHAO; SELLERS, 2015)

Alterações cromossômicas podem ser detectadas em aproximadamente 75% dos casos LLA infantil e são importantes ferramentas no estabelecimento de um prognóstico confiável. Em linhagens progenitoras de células B, alterações frequentes incluem hiperdiploidia com mais de 50 cromossomos, que se configura como um bom prognóstico, hipodiploidia, com menos de 44 cromossomos, que indicam mutações em *TP53* e são de maior risco, e rearranjos cromossômicos incluindo *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* e rearranjos de *KMT2A* com diversos possíveis sítios de quebra (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; MULLIGHAN, 2012).

Em LLA de linhagem de células T, mutações mais comuns envolvem translocações de fatores de transcrição, como *TLX1* e *TLX3*, e genes de receptores de células T (*TCR*), entretanto, mutações comuns a LLA de células B também podem ser observadas, como *ETV6-RUNX1* e rearranjos de *KMT2A*. Dentre todas as

alterações descritas, rearranjos e translocações cromossômicas são fatores cruciais na leucemogênese e grandes marcadores da instabilidade genômica tumoral (DEANGELO; JABBOUR; ADVANI, 2020; JABBOUR et al., 2015; MULLIGHAN, 2012; SHAGO, 2017). A **Tabela 3** agrega as alterações cromossômicas mais comuns na LLA de células B e suas frequências.

Tabela 3. Citogenética e anormalidades moleculares em Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

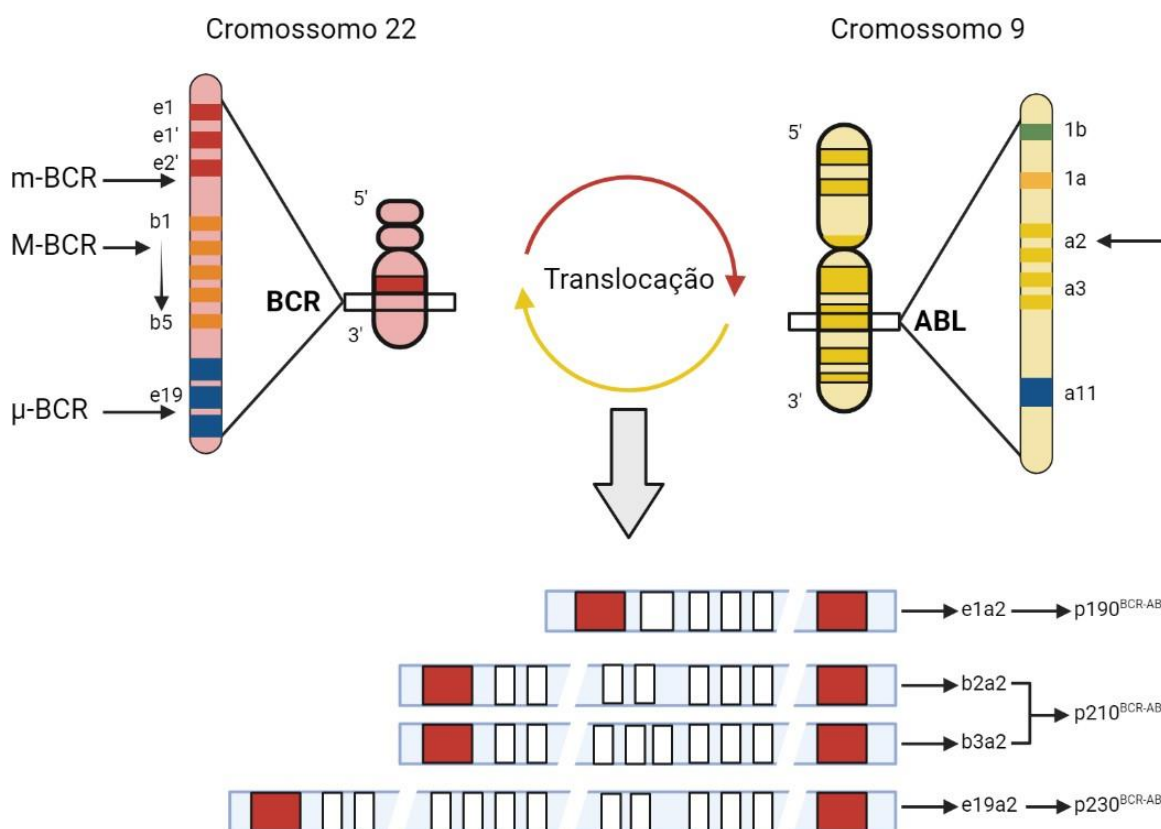
Citogenética	Genes envolvidos	Frequência em adultos (%)	Frequência em crianças (%)
Hiperploídia (> 50 cromossomos)	–	7	25 – 30
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)</i>	2	22 – 25
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	25	2 – 4
t(4;11)(q21;q23) e outras translocações de <i>KMT2A</i>	<i>KMT2A</i>	5 – 10	<5
Baixa hipodiploidia	<i>TP53</i> em baixa hipodiploidia	8 – 10	2 – 3
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>	3	4
t(1;14)(q11), ex: (p13;q11), (p15;q11)	<i>TCRα</i> e <i>TCRδ</i>	20 – 25	10 – 20
<i>BCR-ABL1-like</i> ; Philadelphia-like	Diversos	10 – 30	15
Ikaros	<i>IKZF1</i>	25 – 35	12 – 17

Fonte: Adaptado de DeAngelo, Jabbour e Advani, 2020.

3.2.4 *BCR-ABL* na LLA

Apesar de possuir baixa frequência na população pediátrica, a translocação t(9;22)(q34;q11), precursora do gene quimérico *BCR-ABL* e originária do cromossomo Filadélfia, possui grande relevância clínica devido ao mau prognóstico o qual induz. A proteína BCR-ABL, normalmente associada a leucemias mielóides crônicas (LMC), manifesta fenótipo diferente do convencional quando em casos de LLA devido ao ponto de quebra mais curto na região *BCR*, originando um transcrito de menor peso molecular identificado como p190 (**Figura 4**) (NOGUEIRA et al., 2019; SHAGO, 2017).

Figura 4. Pontos de quebra e fusões da translocação BCR-ABL.



Legenda: A proteína BCR-ABL convencional da leucemia mielóide crônica possui ponto de quebra entre os exons b2 e b3 da região gênica de *BCR*, originando um transcrito de 210 kDa, ou p210, enquanto a forma mais observada em casos de leucemia linfóide aguda possui ponto de quebra mais curto e tamanho de 190 kDa, ou p190. Esporadicamente, o ponto de quebra de BCR pode acontecer ainda mais a frente nos éxons de *BCR*, dando origem a um transcrito de 230 kDa, ou p230, relacionado a fenótipos leucêmicos raros.

Fonte: Adaptado de Nogueira *et al.*, 2019.

O prognóstico de pacientes portadores de LLA p190+ foi revolucionado pelo surgimento das terapias alvo-específicas no início dos anos 2000. O uso de mesilato de imatinibe, um ITQ com ação direcionada para a proteína BCR-ABL1, associado a protocolos de quimioterapia convencionais, proporcionou um aumento considerável nas taxas de sobrevida e remissão molecular completa de pacientes *BCR-ABL* positivos. As altas taxas de remissão alcançadas permitem a um maior número de pacientes a realização de transplantes alogênicos de células-tronco hematopoiéticas e significam uma maior possibilidade de sobrevida livre de doença para este subtipo leucêmico, até então, visto como um péssimo prognóstico (DALLE *et al.*, 2019; SAINI; BRANDWEIN, 2017).

Obstáculos ainda envolvidos no uso de ITQ se relacionam diretamente com efeitos não-específicos que estes medicamentos podem ter e, até mesmo, casos de resistência emergentes. Buscando aumentar a especificidade de inibição, foram desenvolvidos inibidores de segunda-geração, nilotinibe e dasatinibe, que possuem menor força de interação com outras tirosino-quinases, propiciando menos efeitos *off target* ao seu uso, e, no intuito de transpassar mecanismos de resistência, o inibidor de terceira-geração, ponatinibe, segue em estudos clínicos. A relação entre o uso de inibidores de segunda-geração, entretanto, e o melhor prognóstico do paciente ainda não é totalmente estabelecida e o uso de ponatinibe é relacionado a fatalidades cardiovasculares que devem ser monitoradas atentamente na prática clínica (DALLE et al., 2019; MA et al., 2019; SAINI; BRANDWEIN, 2017).

Por fim, a presença de *BCR-ABL1* em células tumorais está altamente relacionado a maior instabilidade genômica pelo acúmulo de radicais livres de oxigênio, através da desregulação do potencial de membrana mitocondrial, e promoção de vias de reparo não conservativas, como a junção de extremidades não-homóloga, sendo responsável pelo consequente aumento da carga mutacional de células tumorais e progressão leucêmica acelerada (ABDULMAWJOOD et al., 2021; NIEBOROWSKA-SKORSKA et al., 2012; SLUPIANEK et al., 2011).

3.3 Poli-ADP-Ribose Polimerases (PARP)

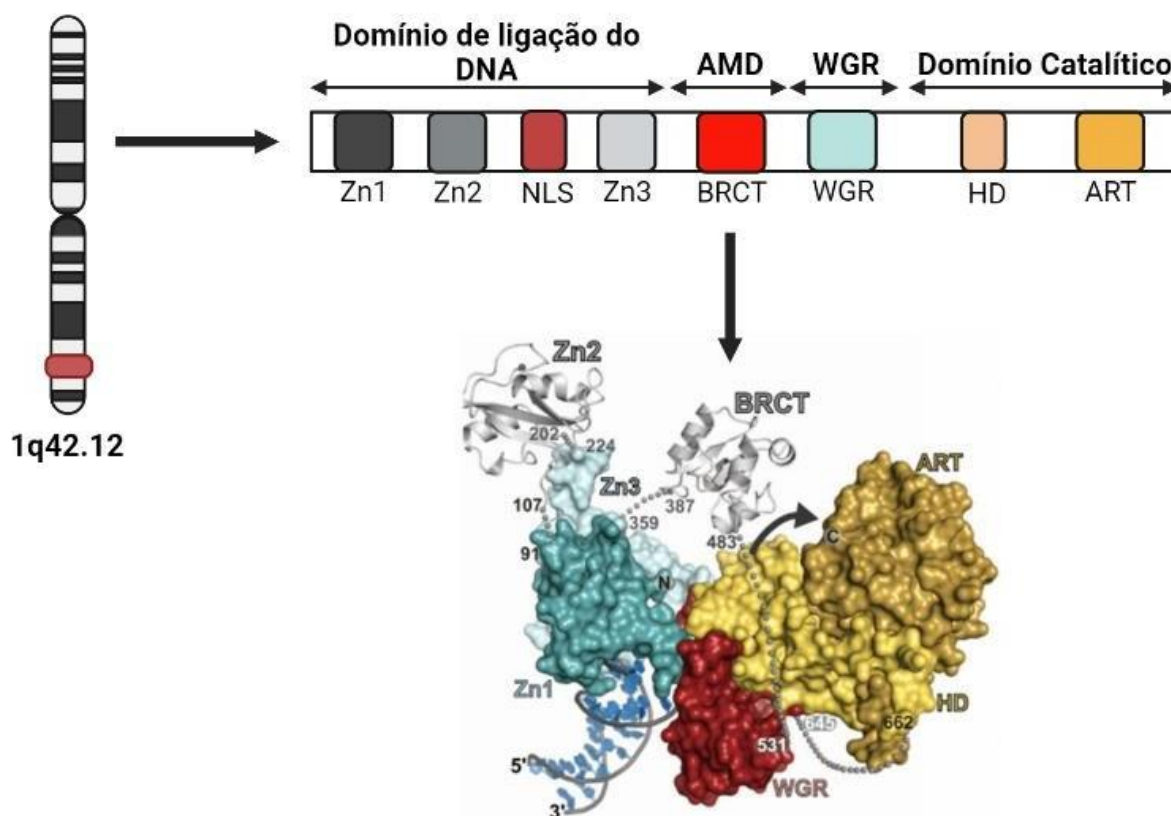
3.3.1 Estrutura de PARP1 e PARilação

Poli-ADP-Ribose Polimerases (PARP) são uma grande família contendo mais de dezoito enzimas que são responsáveis por diversos processos regulatórios do ciclo celular. Entre todos os membros da família, PARP1 é a melhor caracterizada atualmente e representa a linha de frente no reparo ao dano do material genético nuclear (PASCAL, 2018).

Através de ligação direta ao DNA, PARP1 é capaz de reconhecer quebras em fitas simples e duplas e recrutar mecanismos de reparo através da auto-adição de cadeias de ADP-ribose, em um processo denominado como PARilação (EL-KHAMISY et al., 2003; FISHER et al., 2007). Este processo consiste em uma modificação pós-traducional de proteínas onde a adição de cadeias de ADP-ribose aos seus aminoácidos acarreta em mudanças conformacionais e regulação funcional das mesmas (GIBSON; KRAUS, 2012; MCCANN; HURVITZ, 2018).

PARP1 é constituída por diferentes domínios funcionais entre estes três subdomínios de *zinc-fingers* responsáveis por reconhecer e ligar a enzima ao DNA (Zn1, Zn2 e Zn3), um domínio de auto-modificação onde substratos PAR são adicionados (BRCT), um domínio conservado de aminoácidos Trp-Gly-Arg e responsável por transferir o sinal de ativação dos *zinc-fingers* para o domínio catalítico (WGR), um subdomínio helicoidal inibitório da ação catalítica de PARP1 (HD) e o subdomínio cataliticamente ativo e responsável pela transferência das cadeias de PAR (ART) (**Figura 5**) (LORD; ASHWORTH, 2017).

Figura 5. Representação estrutural de Poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) e seus domínios funcionais.



Legenda: O gene codificante de PARP1 encontra-se no braço longo do cromossomo 1 e é formado por um domínio de ligação ao DNA constituído de três *zinc-fingers* Zn1, Zn2 e Zn3 e uma região de localização nuclear NLS, um domínio de auto-modificação (AMD) formado pelo terminal carboxi-protéico de susceptibilidade ao câncer de mama (BRCT), pelo domínio de transdução de sinal WGR e pelo domínio catalítico com sua região inibitória do subdomínio helicoidal (HD) e sua região catalítica propriamente dita do subdomínio de ADP-ribosil transferase (ART).

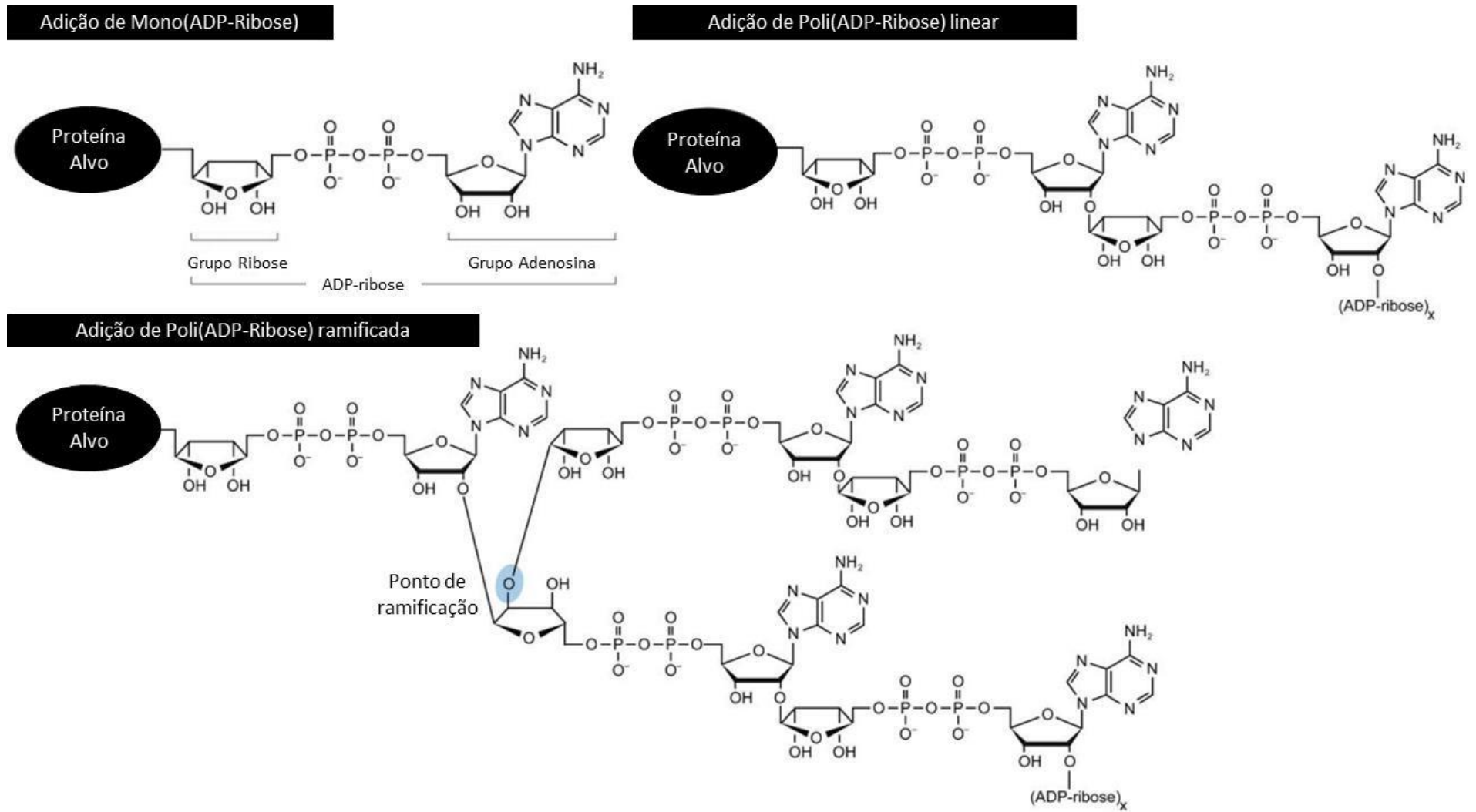
Fonte: Adaptado de Machado *et al*, 2020.

Quando dano no material genético é identificado, PARP1 se auto-PARila e sinaliza para o recrutamento de outras enzimas responsáveis pela maquinaria de RDD (LANGELIER et al., 2011; LEUNG, 2014). O processo de PARilação pode acontecer através da formação de longas cadeias lineares de PAR ou através da ramificação de cadeias já existentes, sendo o alongamento de cadeias lineares o mecanismo preferencial de ação de PARP1 (**Figura 6**) (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019; ROLLI et al., 1997; RUF et al., 1998).

O mecanismo de auto-PARilação de PARP1 ainda é controverso, com dúvidas existentes sobre se esta ação acontece de maneira monomérica, com uma mesma enzima funcionando como catalisador e acceptor da reação, ou através da formação de dímeros, onde uma molécula de PARP1 funcionaria exclusivamente como catalisadora e outra molécula como acceptora de cadeias de PAR. Evidências para as duas hipóteses existem e, enquanto domínios de diferentes moléculas de PARP1 possuem capacidade de se associar *in vitro*, ainda não é certa qual a relevância funcional desta associação *in vivo* (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019).

Após sinalização de dano do DNA, porém antes de a RDD poder iniciar, PARP1 precisa se desligar do sítio de quebra do material genético para permitir a ligação da maquinaria de reparo. Esse desligamento ocorre devido ao acúmulo de cargas negativas advindas das adições sucessivas de ADP-ribose que interagem com grande força de repulsão com as moléculas de DNA. Após desvinciliação, o processo de PARilação é revertido e PARP1 retorna a sua conformação original e inativa (LANGELIER et al., 2011; LEUNG, 2014; WANG et al., 2017).

Figura 6. Modos de adição e alongamento de cadeias de ADP-ribose.

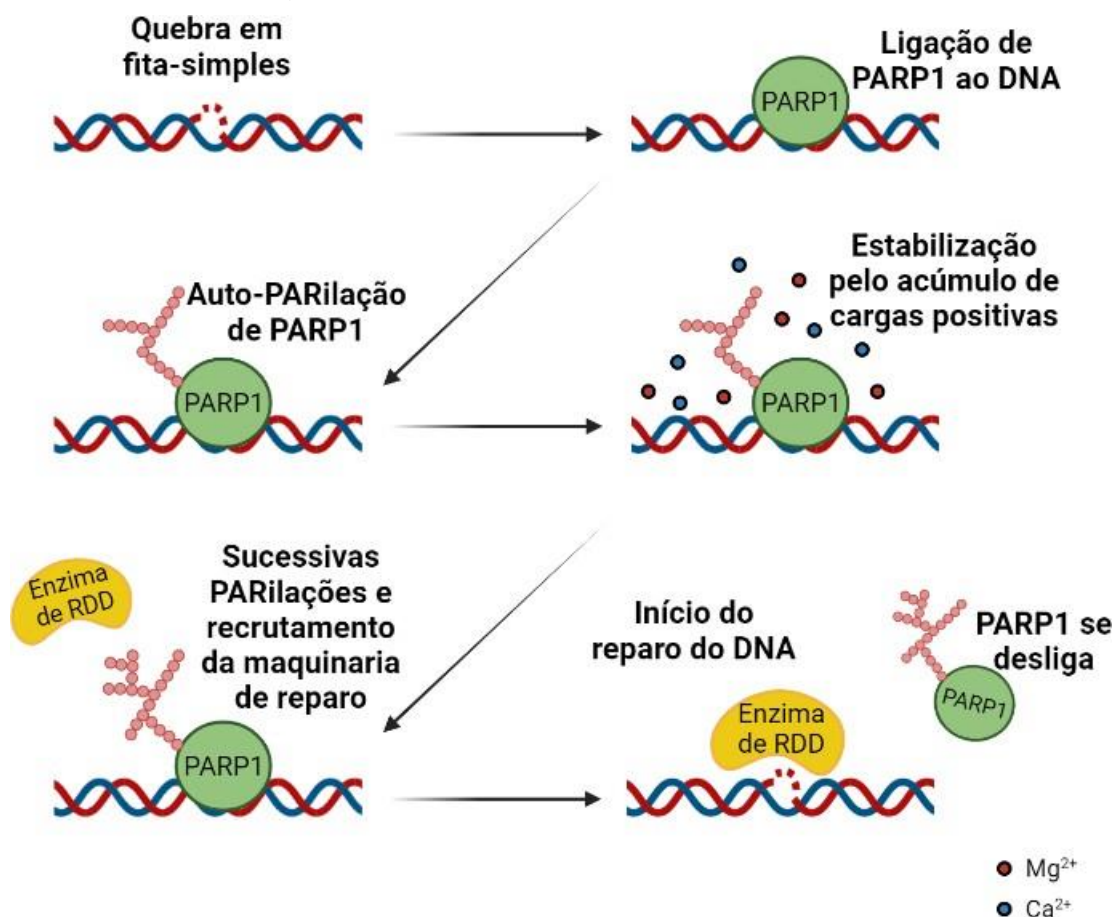


Legenda: Ramificações ocorrem através da ligação direta de grupamentos de ribose.

Fonte: Adaptado de Leung, 2014.

Apesar de o acúmulo de cargas negativas ser essencial para o mecanismo geral de PARP1, durante o processo de alongamento das cadeias de PAR é necessária a presença de proteínas acessórias de carga positiva e cátions para estabilizar as forças eletroestáticas da região de ligação ao DNA (**Figura 7**) (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019; KUN et al., 2004). Além da presença de cofatores, a atividade de síntese de PARP1 também é modulada por modificações pós-traducionais, como metilação e acetilação, e por outras interações proteína-proteína, como as mediadas por ERK2 e p53 (COHEN-ARMON et al., 2007; GIBSON; KRAUS, 2012; KASSNER et al., 2013).

Figura 7. Mecanismo de ação de poli-ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) e fatores regulatórios.



Legenda: Dano ao DNA multifatorial gera quebras em fita-simples que são reconhecidas por PARP1. Após ligação, PARP1 se auto-PARila e o acúmulo de cargas positivas ao redor do sítio de quebra estabiliza a ligação de PARP1 ao DNA. O processo contínuo de PARilação leva ao recrutamento de enzimas envolvidas com o mecanismo de reparo. PARP1 então se desliga do DNA devido ao acúmulo de cargas negativas das cadeias de ADP-ribose e a forte interação eletroestática com as moléculas de DNA, dando espaço para que a resposta ao dano no DNA (RDD) se inicie.

Fonte: Adaptado de Machado *et al*, 2020.

Para além da auto-PARilação de PARP1 na sinalização de RDD, vias de adição de ADP-riboses participam também da regulação de outros processos essenciais como regulação de expressão gênica, remodelamento de regiões de cromatina, vias apoptóticas, regulação do ciclo celular, biogênese de RNAs e até controle do ciclo circadiano, consolidando PARPs como importantes marcadores para a homeostase celular (CHAUDHURI; NUSSENZWEIG, 2017; ELEAZER; FONDUFE-MITTENDORF, 2021; KRAUS; HOTTIGER, 2013; KRIETSCH et al., 2013; ZHAO et al., 2015)

3.3.2 Interações moleculares de PARP1

Entre todas as enzimas da família das PARPs, o domínio catalítico se apresenta majoritariamente conservado entre PARP1 a PARP6, entretanto, nem todas as PARPs possuem capacidade para PARilação em longas cadeias, algumas sendo capazes apenas de adições monoméricas de mono-ADP-ribose, denominando-se MARilação (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019; VYAS; CHANG, 2014).

Apesar da complementariedade e sobreposição de funções entre os membros da família, a atividade catalítica de PARP1 representa 90% da formação dos polímeros de PAR em uma célula sendo, juntamente a PARP2, a proteína mais associada a sinalização para o RDD. A ação de PARP2 na catálise de PAR age, diferentemente de PARP1, preferencialmente ramificando as cadeias poliméricas e é proposta como sendo dependente da ação inicial de PARP1, onde PARP1 realizaria a primeira ligação de ADP-ribose ao aminoácido alvo, assim como alongamento desta cadeia inicial, e PARP2 coordenaria a ramificação desta cadeia, e das cadeias subsequentes, de maneira acessória (KUTUZOV et al., 2020).

Ademais a ação dos próprios membros da família de PARPs, PARP1 realiza interações covalentes e não-covalentes com diversas proteínas intracelulares, com destaque para a atividade de p53. Interações diretas entre PARP1 e p53 são mediadas pelo domínio C terminal (CTD) de p53, que é extremamente básico e apresenta maior afinidade por PARP1 auto-PARilada. Esta ligação inicial possui caráter não-covalente, baseando unicamente em interações eletrostáticas, entretanto é necessária para que PARP1 possa covalentemente PARilar p53 em sítios aceptores (FISCHBACH et al., 2018).

Apesar de não possuir funcionalidade totalmente esclarecida, a PARilação de p53 acarreta em mudanças estruturais com consequências como aprisionamento

nuclear de p53 (KANAI et al., 2007) e diminuição da afinidade de p53 pelo DNA, além do aumento da afinidade de p53 na formação de complexos multiméricos de proteína-proteína (FISCHBACH et al., 2018).

A ativação de p53, entretanto, possui efeitos de disruptivo sobre a estabilidade de moléculas de PARP1, notadamente através da proteína ubiquitinadora MDM2 (GIANSANTI et al., 2022). MDM2 participa em um processo de auto-regulação negativa com p53 onde a ativação de p53 gera aumento da expressão de *MDM2*, responsável por ubiquitinar p53, marcando-o para degradação por complexos de proteossomas (KOO; SHARMA; NARAYAN, 2022). A atividade de MDM2 também é demonstrada como capaz de ubiquitinar e causar degradação de moléculas de PARP1, induzindo progressão de forquilhas de replicação do DNA e acúmulo de dano genético em modelos celulares de hiperexpressão de MDM2 (GIANSANTI et al., 2022).

Diferentemente de funções inibitórias atribuídas a fenótipos selvagens, mutações originando ganho de função oncogênica em p53 estão diretamente associadas a maior afinidade de PARP1 pelo DNA e maiores níveis de PAR intracelular (XIAO et al., 2020). A presença de p53 selvagem é, portanto, um marcador de resistência em células tumorais contra a efetividade de PARPis, enquanto modelos de câncer de mama expressando p53 com mutação em R273H se mostraram mais sensíveis a tratamentos sinérgicos utilizando o inibidor de PARP talazoparibe (IRENO et al., 2014; XIAO et al., 2020).

De maneira geral, a PARilação catalisada por PARP1 é dependente da existência de domínios específicos capazes de funcionar como aceptores de PAR nas proteínas-alvo, sendo a maioria destas proteínas também portadoras de domínios básicos funcionalmente semelhantes a CTD. Portanto, a hipótese para predição da atividade PARilativa de PARP1 consiste na existência de domínios nas proteínas-alvo que permitam interação inicialmente não-covalente com polímeros de PAR para que haja posterior adição e alongamento de ADP-ribose nos domínios aceptores (FISCHBACH et al., 2018; TELONI; ALTMAYER, 2016).

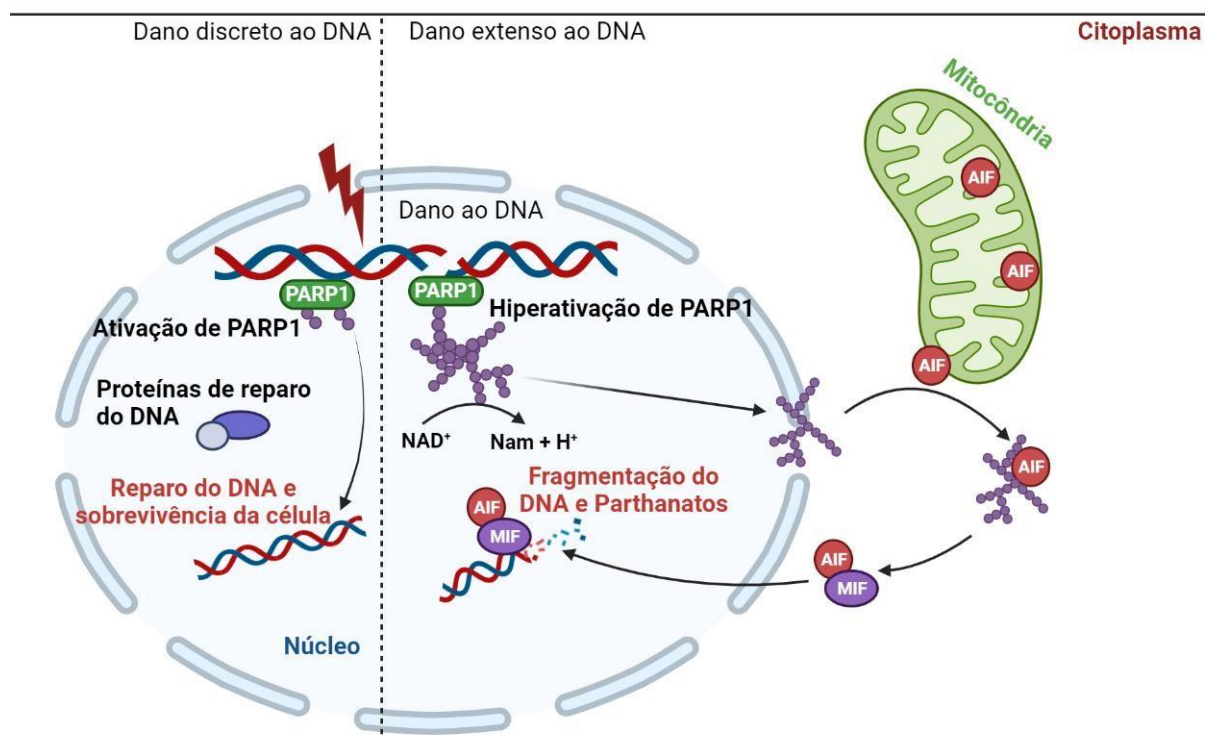
Atualmente, 92 proteínas são descritas comoceptoras diretas de PAR (DASOVICH et al., 2021), tendo atividade modulada diretamente por modificações mediadas por PARP1, incluindo importantes proteínas responsáveis pelo reparo e arranjo estrutural do DNA, como XRCC1 (DEMIN et al., 2021), e proteínas

responsáveis pela indução de apoptose em resposta a danos genotóxicos, como ATM e DEK (AKI; UEMURA, 2021; KAPPES et al., 2008).

Por fim, ainda mais importante na regulação a atividade catalítica de PARilação é o entendimento da cinética enzimática entre PARPs e ADP-hidrolases, enzimas que catalisam a quebra das ligações entre riboses, das quais poli-ADP-ribose glicohidrolase (PARG) é a principal representante, tendo ação complementada em menor escala por ADP-ribosilserina hidrolase (ADPRS) e O-acil-ADP-ribose deacilase 1 (OARD1) (BARKAUSKAITE; JANKEVICIUS; AHEL, 2015; PILLAY et al., 2021). PARG, assim como outras ADP-hidrolases, possui afinidade de interação elevada pela ligação glicolisídica existente entre os grupamentos de ribose em um polímero de PAR, mediando a quebra e liberação de sub-unidades de ADP-ribose (PILLAY et al., 2021).

Durante o alongamento de PAR na auto-PARilação de PARP1 em resposta a dano genotóxico, a realização de ligações não-covalentes de proteína-proteína é essencial para inibição da atividade de PARGs diretamente sobre o polímero em alongamento (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019). Entretanto, a atividade de PARG é ainda essencial na manutenção da homeostase celular devido ao perfil citotóxico de morte, denominado como parthanatos, associado ao acúmulo intracelular de PAR em cenários de dano genotóxico e hiperativação de PARP1 (**Figura 8**) (LIU et al., 2022; ZHOU et al., 2021).

Figura 8. Modelo esquemático de Parthanatos.



Legenda: Dano discreto ao DNA causa ativação de poli-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1), recrutamento da cascata de reparo e sobrevivência da célula. Danos extensos ao DNA causam hiperativação de PARP1 e acúmulo de polímeros de poli-ADP-ribose (PAR), com depleção de reservas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e conversão em nicotinamida (Nam). Cadeias de PAR interagem com o Fator Indutor de Apoptose (AIF) presente na membrana mitocondrial e causam sua liberação para o citosol onde este é complexado juntamente ao Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) e ambos migram para o núcleo. O complexo recém-formado possui atividade de endonucleases e medeia então a fragmentação do DNA e condensação da cromatina, induzindo a morte celular via parthanatos.

Fonte: Adaptado de Liu et al., 2022.

3.3.3 Mecanismos de inibição e letalidade sintética

Nos últimos anos, inibidores de PARP (PARPi) foram aprovados para o uso como tratamento em casos de câncer de ovário e de mama devido a demonstração da sensibilidade de tumores com mutações em *BRCA1/2* a estes fármacos (MCCANN; HURVITZ, 2018). *BRCA1/2* são genes supressores de tumor responsáveis por manter a estabilidade genômica através da modulação de reparo por recombinação homóloga (RRH), um mecanismo conservativo de reparo em quebras de fitas duplas do DNA (ZHAO et al., 2019).

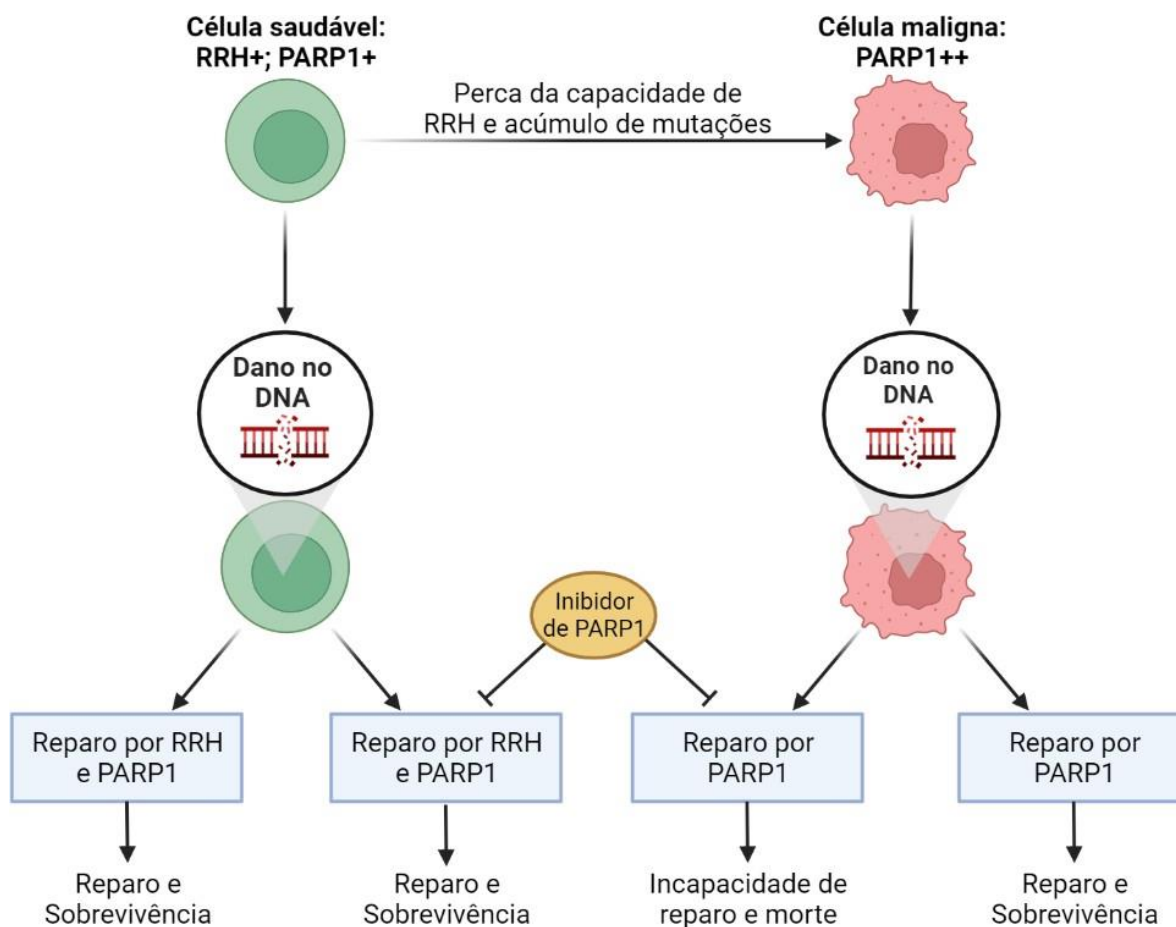
Entretanto, diversos tumores que não apresentam mutações diretas em *BRCA1/2* ainda podem apresentar um fenótipo correspondente a deficiência em

BRCA, conhecido como *BRCAness*, devido a modulações por parte de outras vias metabólicas que interagem diretamente com fatores de RRH e de estabilidade genômica (BYRUM; VINDIGNI; MOSAMMAPARAST, 2019; LORD; ASHWORTH, 2016). A presença de cicatrizes genômicas na forma de um acúmulo de mutações e, principalmente, de perda de heterozigose por rearranjos ou translocações cromossomais podem ser indicativos de uma maquinaria celular com fenótipo de *BRCAness* e consequente deficiência em RRH (WATKINS et al., 2014).

PARP1 é responsável por sinalizar danos no DNA, especialmente quebras em fitas-simples, portanto a sua inibição acarreta no agravamento dessas lesões e na sua conversão em quebras de fitas-duplas. Tumores deficientes em mecanismos de RRH, como tumores com fenótipo de *BRCAness*, são incapazes de reparar corretamente e com eficiência as quebras de fitas-duplas, sendo muito dependentes de vias de reparo mais propensas a erros como junções não homólogas das extremidades e, portanto, tendem à apoptose quando tratados com inibidores de PARP1 devido ao aumento crescente da instabilidade genômica celular (D'ANDREA, 2018; JIANG et al., 2019).

O uso de PARPi no tratamento de neoplasias representa, portanto, a primeira aplicação clínica do conceito de letalidade sintética, sendo este caracterizado como a capacidade de explorar vias metabólicas as quais uma célula é intrinsecamente defeituosa e induzir a morte celular através da manipulação farmacológica de outras vias as quais a célula se torna hiper-dependente (**Figura 9**) (LORD; ASHWORTH, 2017).

Figura 9. Aplicabilidade clínica do conceito de letalidade sintética.



Legenda: Durante o processo de carcinogênese, células previamente saudáveis podem perder proficiência na via de reparo por recombinação homóloga (RRH), apresentando um fenótipo de *BRCAness*, e passar a ser hiperdependentes de outras vias de reparo, como PARP1. No caso de dano sofrido pelo DNA, uma célula saudável possui uma gama de recursos disponíveis para lidar com esse dano e não é tão afetada pela inibição de PARP1, que é apenas uma destas vias. Uma célula maligna hiperdependente de PARP1 tende a apoptose quando exposta a inibidores de PARP devido à grande instabilidade genômica consequente da falta de vias de reparo alternativas e um acúmulo exagerado de mutações.

Fonte: Autoria Própria, (2023).

Além da inibição direta do processo de PARilação, outro meio pelo qual PARPis exercem sua atividade citotóxica é através da formação de complexos insolúveis de PARP-DNA, um processo conhecido como aprisionamento de PARP ou PARP *trapping*. Quando PARP1 se liga ao DNA e é incapaz de se desvencilhar, a maquinaria de RDD não consegue se ligar e agir sobre aquela sequência defeituosa, impedindo o reparo do DNA e induzindo agravamento do dano genético. Alguns PARPi são mais efetivos em aprisionar PARP1 do que outros, e alguns até induzem

a liberação precoce de PARP1, entretanto essas diferenças de atividade não possuem correlação direta com a capacidade destes fármacos em inibir o processo de PARilação em si (MURAI et al., 2012, 2014; ZANDARASHVILI et al., 2020).

3.3.4 Inibidores de PARP na clínica

Atualmente, quatro inibidores são aprovados para uso clínico, sendo estes o olaparib, rucaparib, niraparib e talazoparib, além de diversos inibidores que seguem em diferentes estágios de estudos clínicos. Entretanto, o uso terapêutico dos PARPi aprovados ainda é bastante limitado e se concentra principalmente no tratamento de câncer de mama e de ovário, com alguns usos em malignidades de próstata e pâncreas que apresentam defeitos na maquinaria de RRH (BALASUBRAMANIAM et al., 2017; HOY, 2018; ISON et al., 2018; KIM et al., 2015; SPIEGEL; VAN HOUTEN; DURRANT, 2021). A **Tabela 4** sumariza os inibidores aprovados e suas recomendações clínicas.

Tabela 4. Inibidores de Poli-ADP-Ribose (PARP) aprovados e seus usos clínicos.

Inibidor de PARP	Tipo Tumoral	Recomendação Clínica	Órgãos Regulamentadores
Olaparib	Câncer de ovário	Pacientes com mutação em <i>BRCA</i> ou RRH com resposta completa ou parcial a tratamento baseados em platina; Pacientes tratados com três ou mais linhas prévias de quimioterapia	FDA; EMA; ANVISA
	Câncer de mama	Pacientes com mutações em <i>BRCA</i> e tumor metastático HER2-negativo	
	Câncer de pâncreas	Manutenção de pacientes com mutação em <i>BRCA</i> que não progrediram após tratamento baseado em platina	
	Câncer de próstata	Pacientes com mutações em RRH e câncer metastático resistente a castração que progrediram após tratamento prévio	
Rucaparib	Câncer de ovário	Manutenção de pacientes em resposta completa ou parcial a tratamentos baseados em platina; Pacientes com mutação em <i>BRCA</i> e duas ou mais linhas de quimioterapia prévias	FDA; EMA
	Câncer de próstata	Pacientes com mutações em <i>BRCA</i> e câncer metastático resistente a castração que progrediram após tratamento prévio	

Niraparib	Câncer de ovário	Manutenção de pacientes em resposta completa ou parcial a tratamentos baseados em platina; Pacientes com mutação em <i>BRCA</i> e três ou mais linhas de quimioterapia prévias	FDA; EMA; ANVISA
Talazoparib	Câncer de mama	Pacientes com mutações em <i>BRCA</i> e tumor metastático ou localmente avançado que seja HER2-negativo	FDA; EMA; ANVISA

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; EMA: *European Medicines Agency*; FDA: *Food and Drug Administration*; RRH: Reparo por recombinação homóloga.

Fonte: Autoria Própria

Os diferentes PARPi disponíveis podem ser classificados de acordo com a capacidade de estabilizarem o subdomínio inibitório da ação catalítica, HD, e consequentemente modular a afinidade de PARP1 pelo DNA através de interações entre sítios alostéricos, promovendo o processo de PARP *trapping*. Inibidores de tipo 1 tendem a desestabilizar o HD, gerando maior afinidade de PARP1 pelo DNA; Inibidores de tipo 2, como olaparib e talazoparib, possuem baixa atividade sobre o HD e não influenciam de maneira significativa as interações alostéricas; Inibidores de tipo 3, como rucaparib e niraparib, atuam estabilizando o HD e promovendo seu efeito inibitório, levando a liberação precoce de PARP1 das quebras em fitas-simples (ZANDARASHVILI et al., 2020).

A capacidade de um PARPi em aprisionar PARP1 ao DNA está diretamente relacionado com sua capacidade citotóxica e com o grau de promoção de instabilidade genômica promovido pelo inibidor, tendo em vista que este aprisionamento proporciona, além da continuidade do dano genético não reparado, o escalonamento deste dano em fita-simples a um dano em fitas-duplas (SPIEGEL; VAN HOUTEN; DURRANT, 2021; ZANDARASHVILI et al., 2020).

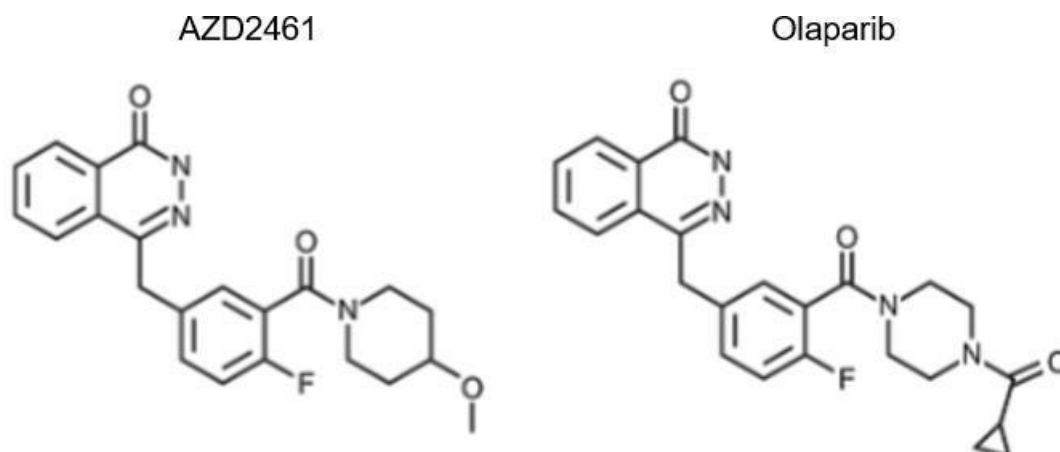
O mecanismo de ação dos PARPi convencionais consiste no mimetismo molecular de NAD, o qual PARPs utilizam como substrato para produção das cadeias de ADP-ribose. PARPis competem pelo sítio de ligação de NAD em uma cadeia de ADP-ribose e, após sua associação, impedem a continuação do crescimento da cadeia e levam ao bloqueio da atividade enzimática de PARPs. Devido à alta conservação da atividade catalítica entre as moléculas da família de PARP, a maioria dos inibidores aprovados na prática clínica possuem interações alostéricas adicionais no intuito de apresentarem maior seletividade apenas para PARP1/2 (FERRARIS, 2010; KUTUZOV et al., 2020; SLADE, 2020).

Apesar de representarem grandes avanços da pesquisa oncológica, o uso de PARPi ainda enfrenta obstáculos relacionados a resistência tumoral afetando diretamente a efetividade dos tratamentos. A elevada atividade de transportadores de membrana ABCB1, codificantes de glicoproteína-P, é uma via comum de multirresistência tumoral relacionada a resistência cruzada entre quimioterápicos, sendo responsável pelo efluxo de drogas para o meio extracelular, e é um importante fator inibitório da atividade citotóxica de olaparib, representando um desafio a ser superado na prática clínica (BAGLO et al., 2021; JIANG et al., 2019; LOMBARD et al., 2019).

Análises de transcriptoma de linhagens celulares sensíveis *versus* linhagens resistentes a olaparib sugerem que a resistência a PARPi pode também estar relacionada a hiperativação da sinalização canônica de WNT, uma via celular que desempenha papel pro-carcinogênico no crescimento de diversos tumores através da interação entre WNT/ β -catenina e fatores de transcrição nuclear, promovendo aumento de sinais proliferativos e de sobrevivência em células malignas (HU et al., 2021; TACIAK et al., 2018; YAMAMOTO et al., 2019).

Atualmente, novos PARPi menos suscetíveis a vias de multirresistência tumoral passam por fases de estudos pré-clínicos no intuito de potencializar as opções de tratamento disponíveis aos pacientes oncológicos. AZD2461 é uma droga com estrutura análoga ao olaparib, porém com pequenas mudanças em grupos funcionais que diminuem a sua afinidade por bombas de efluxo transmembranares (**Figura 10**). Apesar de a atividade de AZD2461 ser comparável à de olaparib em linhagens de câncer de mama com mutações em *BRCA1/2*, em linhagens que hiperexpressam glicoproteína-P, AZD2461 é capaz de manter sua atividade citotóxica enquanto olaparib se mostra ineficaz (O'CONNOR et al., 2016).

Figura 10. Diferenças estruturais entre Olaparib e o análogo AZD2461.



Legenda: Alterações em grupos funcionais tornam AZD2461 menos suscetível ao transporte para o meio extracelular através da ação de transportadores de membrana da família ABCB1.

Fonte: Adaptado de O'Connor *et al*, 2016.

Em estudos clínicos, AZD2461 apresenta apenas uma entrada registrada na plataforma *clinicaltrials.gov* onde foi investigado quanto a sua dose máxima tolerada, efeitos adversos, eventos hematológicos, farmacocinética e farmacodinâmica no tratamento de pacientes com tumores sólidos refratários. O estudo foi conduzido pela empresa *AstraZeneca* e, apesar de concluído em 2011, não possui resultados clínicos disponíveis na plataforma, gerando, portanto, uma lacuna quanto a efetividade e tolerabilidade do seu uso em humanos (NCT01247168).

Por fim, mesmo com diversas recomendações clínicas, o uso de PARPis não é isento efeitos colaterais aos pacientes. Devido aos perfis de inibição de diferentes enzimas da família das PARPs e as características únicas de cada inibidor em induzir PARP *trapping*, a ação de PARPis muitas vezes está associada a altas taxas de mielosupressão, anormalidades do sistema linfático, anemias, trombocitopenias, síndromes mieloproliferativas e até a eventos menos específicos como desordens gastrointestinais e renais (LAFARGUE *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2022).

É importante ressaltar também que, em geral, o tratamento com PARPis é associado ao uso de outras drogas citotóxicas no intuito de aumentar a eficiência dos tratamentos e sobrepor possíveis vias de resistência. O resultado desta associação, entretanto, aumenta a predisposição a eventos adversos severos que, por muitas vezes, acabam por desencorajar a continuidade de investigações clínicas. Portanto,

é imperativo para investigadores o conhecimento prévio do perfil de toxicidade de cada PARPi com o qual se pretende trabalhar e as possíveis interações medicamentosas com outras opções terapêuticas no tratamento oncológico (LAFARGUE et al., 2019; MADARIAGA et al., 2020).

3.3.5 PARP e neoplasias hematológicas

Na última década, os bons resultados obtidos com PARPi no tratamento de neoplasias ginecológicas instigou o interesse em expandir a sua aplicabilidade para outros tipos de malignidades que podem, potencialmente, se beneficiar de estratégias de letalidade sintética (MATEO et al., 2019).

Leucemias e linfomas são, atualmente, focos destes estudos de redirecionamento farmacológico devido a alta presença de rearranjos e translocações cromossômicas que atuam como *drivers* de neoplasias hematológicas, pressupondo uma maior instabilidade genômica e a presença de possíveis erros de mecanismos de reparo (FARAONI et al., 2019; MACHADO et al., 2020).

Um grande número de PARPis, incluindo os já estabelecidos na clínica assim como novas drogas experimentais, possuem investigações correntes ou passadas em etapas pré-clínicas e estão destacados na **Tabela 5**. De maneira geral, a efetividade de PARPis em malignidades hematológicas se mostra correlacionada com baixos níveis de atividade de RAD51 recombinase e altas taxas de fosforilação da histona H2AX, o que não é surpreendente tendo em vista a ação de ambos como biomarcadores da presença de quebras em fitas-duplas e da proficiência celular em RRH (MACHADO et al., 2020; PALLA et al., 2017; SKELDING; LINCZ, 2021; WASSING; ESASHI, 2021).

Tabela 5. Inibidores de Poli-ADP-Ribose (PARP) investigados em malignidades hematológicas.

Inibidor de PARP	Outras Nomenclaturas	Alvo Molecular	Malignidade Hematológica
Olaparib	AZD-2281; KU-59436	PARP-1/2/3	LLA; LMA; LLC; LMC; Linfoma de células T; MM; NMP; LNH
Rucaparib	AG-14699; PF-01367338	PARP-1/2/3	LLA; LMA;
Niraparib	MK4827	PARP-1/2	LMA; LNH
Talazoparib	BMN-673; MDV-3800	PARP-1/2	LLA; LMA; LLC; LMC; Linfoma de células T; NMP; LNH
Veliparib	ABT-888	PARP-1/2	LLA; LMA; LLC; LMC; Linfoma cutâneo de células T; Linfoma refratário; MM; NMP; LNH; LDGCB; LHc; LF; FLt

CEP-8983	CK-102	PARP-1/2	LLC
PJ34	-	PARP-1/2	LLA; LMA; LLC; LMC; MM
5F02	-	PARP-1 (não-NAD-like)	LMC
AG14361	-	PARP-1	LMC
6-(5H)-phenanthridinone	NSC 11021; NSC 40943; NSC 61083; PHEN	PARP-1	Linfoma de células T
KU-0058948	Análogo de homopiperazina, 14	PARP	LMA; LMC
NU1025	NSC 696807	PARP	LMC; Linfoma murino
AZD2461	1174043-16-3	PARP	Linfoma de células T

LLA: Leucemia Linfóide Aguda; LMA: Leucemia Mielóide Aguda; LLC; Leucemia Linfóide Crônica; LMC: Leucemia Linfóide Crônica; MM: Mielóma Múltiplo; NMP: Neoplasma mieloproliferativo; LNH: Linfoma não-Hodgkin; LDGCB: Linfoma difuso de grandes células B; LHc: Linfoma de Hodgkin clássico; LF: Linfoma folicular; LFt: Linfoma folicular transformado.

Fonte: Adaptado de Skelding e Lincz, 2021.

Investigações clínicas sobre a efetividade de PARPis em tumores hematológicos ainda são escassas e reúnem baixos números de pacientes, existindo resultados publicados apenas para os inibidores olaparib e veliparib. Os defechos clínicos observados, entretanto, apontam para melhora modesta em pacientes tratados com PARPis, tendo como principal vantagem do seu uso a baixa toxicidade quando administrados em forma de monoterapia e a capacidade de associação a outras estratégias terapêuticas (FRITZ et al., 2021; SKELDING; LINCZ, 2021).

Sendo assim, estudos utilizando PARPis para tratar malignidades hematológicas ainda possuem muitos campos a serem explorados, devendo-se buscar cada vez mais sobre o real benefício desta classe farmacológica em um contexto clínico e sobre biomarcadores que possam estar diretamente associados a sua efetividade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelos Celulares

Para o desenvolvimento deste projeto, serão utilizadas as linhagens leucêmicas representativas de malignidades: SUP-B15, Raji, Namalwa e Jurkat, gentilmente cedidas pelo Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, K562, FEPS e K-562 Lucena 1, gentilmente cedidas pela Dra. Vivian M. Rumjanek da Universidade Federal do Rio de Janeiro, além de linhagens de células saudáveis para fins comparativos, MRC-5 e MNP-01 (**Tabela 6**).

Tabela 6. Caracterização das linhagens leucêmicas humanas

Linhagens Celulares	Malignidade	Tipo Celular	Caracterização	Nível de Biossegurança
SUP-B15	Leucemia Linfóide Aguda	Linfócito B	Pseudodiploide com detecção de <i>BCR-ABL1</i> (e1-a2)	1
Raji	Linfoma de Burkitt	Linfócito B	Hipotetraploide com detecção de <i>MYC-IGH</i> ; EBV-positivo	2
Namalwa	Linfoma de Burkitt	Linfócito B	Pseudotriploide com 2% de poliploidia; EBV-positivo	2
Jurkat	Leucemia Linfóide Aguda	Linfócito T	Pseudodiploide com 5,3% de poliploidia	1
K562	Leucemia Mielóide Crônica	Blasto Granulocítico	Hipotriploide com detecção de <i>BCR-ABL1</i> (e14-a2)	1
FEPS	Leucemia Mielóide Crônica	Blasto Granulocítico	Derivada de K562 resistente a daunorrubicina	1
K-562 Lucena 1	Leucemia Mielóide Crônica	Blasto Granulocítico	Derivada de K562 resistente a vincristina	1
MRC-5	CNN	Fibroblasto Pulmonar	CNN	1
MNP-01	CNN	Epitélio Gástrico	CNN	1

CNN: Células não-neoplásicas.

Fonte: Autoria Própria, 2023

Os experimentos utilizando as linhagens foram realizados no laboratório de Farmacogenética do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará e no laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto (HEMORP).

As linhagens leucêmicas foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml), em estufa a 37°C com 5% de CO₂, com passagens regulares três vezes por semana. Em exceção ao descrito, a linhagem SUP-B15 foi mantida em RPMI 1640 suplementado exclusivamente com 20% de SFB e as linhagens FEPS e Lucena foram cultivadas em meios com 46 nM de daunorrubicina e 60 nM de vincristina, respectivamente.

As linhagens de células saudáveis MRC-5 e MNP-01 foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml), em estufa a 37°C com 5% de CO₂, com passagens regulares três vezes por semana utilizando-se Tripsina-EDTA 0,5% diluída a 10X em tampão fosfato (PBS) para desprendimento das células aderidas.

4.2 Substâncias Químicas

Os fármacos Mesilato de Imatinibe, Cloridrato de Doxorrubicina e a molécula AZD2461 foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Os fármacos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração estoque de 100 µM, e armazenados no freezer -20°C até seu uso.

4.3 Avaliação Molecular

4.3.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa

RNA total foi extraído com o reagente *TRIzol Reagent*® (*Invitrogen*TM) de acordo com instruções do fabricante e quantificado por absorbância utilizando o equipamento *NanoDrop* (*ThermoFisher Scientific*®).

A partir de 20ng de RNA total extraído foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) de acordo com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (*ThermoFisher Scientific*®). A etapa de conversão foi realizada no termociclador *Veriti*® *thermal cycler* (*Applied Biosystems*®).

As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C para estabelecimento de uma biblioteca de cDNA e permaneceram congeladas até sua análise.

4.3.2 Desenho de *Primers* e Validação da Expressão Gênica por *Real-Time* PCR Quantitativo (qPCR)

A síntese de *primers* foi realizada pela empresa *ThermoFisher™ Scientific* através da sequência transcrita completa dos genes *PARP1* (Referência: Hs00242302_m1), *BCR-ABL p190 (e1a2)* (Referência: Hs03024844_ft) e do gene *ACTB* (Referência: Hs01060665_g1), que foi usado como controle endógeno.

A reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando o kit *Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®)* para amostras de linhagens celulares, e para as amostras de pacientes o sistema *TaqMan® Gene expression assays (Applied Biosystems®)*. Os fragmentos amplificados foram quantificados pela análise dos dados fluorescentes através do software versão 1.1 no equipamento *QuantStudio® 5 (Applied Biosystems®)*.

Na análise de PCR em tempo real, a quantificação é baseada no *Cycle threshold (CT)*, que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). O CT é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis. Para determinar a linha de corte para a expressão gênica alterada em tecidos tumorais, o valor CT será determinado também em tecido normal.

Estabelecidos os CT de cada amostra, o cálculo do nível de expressão é realizado através do Método CT comparativo ou Método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, dessa forma, o nível de expressão do gene de interesse é relatado em relação ao do gene de referência para cada amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008):

$$\text{Expressão do Gene de Interesse} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

$$\text{Onde } \Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{gene de interesse}}) - (\text{CT}_{\text{endógeno}}) \text{ para cada triplicata}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\Delta\text{CT}_{\text{experimental}}) - (\Delta\text{CT}_{\text{controle}})$$

Para que o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ seja validado, deve-se assumir que a eficiência de amplificação do gene alvo e a eficiência de amplificação do controle interno devem ser aproximadamente iguais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Cada amostra em análise será realizada em triplicata para a validação da técnica e dos valores de CT, de acordo com os *guidelines* internacionais para avaliação de expressão gênica por PCR em Tempo real (BUSTIN et al., 2009).

A análise estatística utilizada será a análise de variância de uma via (ANOVA), para um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A linhagem modelo, SUP-B15, e as linhagens linfóides de maior expressão foram escolhidas para continuidade dos experimentos.

4.3.3 Extração de DNA

Ao atingirem a confluência total, células da linhagem SUP-B15 foram suspensas em PBS. O DNA foi extraído usando o *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega Corporation, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

A pureza e integridade do DNA foi avaliada no *Agilent 2200 TapeStation* (Agilent Technologies, USA) com *D1000 ScreenTape* (Agilent Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante, somente sendo utilizadas amostras com número de integridade de DNA (DIN) >7 para as análises posteriores.

4.3.4 Análise de hibridização genômica comparativa baseada em matriz (aCGH)

A identificação de alterações cromossômicas somáticas de ganhos e perdas de segmentos foi realizada utilizando a técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos de oligonucleotídeos (aCGH). Esta técnica permite a detecção de variações no número de cópias de segmentos de DNA da amostra teste em relação a uma amostra referência. Para o aCGH, foi utilizada a matriz *SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray G4869-60510 Kit*, 4x180K, da *Agilent*, contendo cerca de 120.000 sondas de aCGH, cobrindo o total de clones do consórcio ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays).

De forma resumida e ordenada, estão apresentados abaixo, os procedimentos adotados para realização o aCGH:

- Extração de DNA das células cultivadas, feita com o uso do Kit de Extração *Illustra – Tissue&Cells, GenomicPrep Mini Spin Kit*, da *GE Healthcare*, seguindo o protocolo do fabricante;
- Digestão enzimática do DNA extraído para a formação de fragmentos entre 200 a 500 pb, sendo realizada com o DNA de referência

(*HumanReference DNA Male or Female*), disponibilizado no kit *SureTag Complete DNA Labeling* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA);

- Marcação do DNA genômico digerido com Cy5-dUTP para as amostras avaliadas e Cy3-dUTP para o DNA de referência, utilizando-se o *Labeling Master Mix*, composto por água ultrapura, tampão de reativação 5x, 10x dNTPs, Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP e Exo-Klenow (DNA polimerase).
- Purificação das amostras, a partir de sua incubação na *Hybridization Master Mix*, por 3 minutos a 95 °C, seguida da incubação em um termociclador por 30 minutos a 37 °C e centrifugação do material por 1 minuto a 6000x g.
- Hibridização em uma lamínula específica, com adição de 100 µl da solução em cada um dos poços, encaixe da lâmina de microarranjo sobre a lamínula e transferência desse conjunto para um forno de hibridização com estante rotativa (G2545A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para incubação por 24 horas a 67°C com uma rotação de 20 rpm.
- Lavagens pós- hibridização para minimizar a exposição do gDNA marcado ao ozônio a partir da incubação das lâminas de aCGH em cubas de vidro contendo os tampões de lavagem aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 e Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2. Posteriormente, lâminas foram cobertas com uma lamínula protetora de ozônio, e encaixadas em um estojo para dar seguimento à etapa de escaneamento e extração de dados.
- A lâmina foi escaneada no *DNA Microarray Scanner with SureScan High-Resolution* (G2505C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e a imagem foi analisada com o *Agilent Feature Extraction* v.12.5, usando as configurações padrões.

4.3.5 Alteração de Número de Cópias (CNAs)

Os dados foram analisados por meio de uma série de métricas de controle de qualidade implementadas no software *CytoGenomics* 5.0.2.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). As CNAs foram calculadas usando o algoritmo *Aberration Detection Method 2* (ADM-2) com um ajuste de limiar de sensibilidade de

6 e um filtro de aberração com um número mínimo de sondas = 3 e um AvgAbsLogRatio mínimo = 0,25 no software *CytoGenomics* 5.0.2.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). A caracterização das regiões genômicas (arquivos BED) descritas como "ganho" ou "perda" foram extraídas e apenas regiões > 1 kb foram usadas para construir um arquivo de mapeamento de referência usando uma combinação das funções "intersectBed" e "multiIntersectBed" do pacote BEDtools do R. Todas as anotações genômicas foram feitas usando o genoma humano GRCh37/hg19 proveniente do Genome Browser da University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GX 14.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e o R v.3.6.2.

O ideograma mostrando as CNAs foram construídos usando o software online PhenoGram (<https://ritchielab.org/software/phenogram-downloads>) (WOLFE et al., 2013).

4.4 Avaliação Fenotípica

4.4.1 Ensaio de Citotoxicidade por *Alamar Blue*

As linhagens SUP-B15, Raji e Namalwa foram semeadas em placas de 96 poços em meio RPMI. A linhagem SUP-B15 foi semeada em concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço e as linhagens Raji e Namalwa com 2×10^4 células/poço (100 μ L/poço) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Quando plaqueada para tratamento de 24 horas, a linhagem SUP-B15 também foi semeada a 2×10^4 células/poço. As substâncias Mesilato de Imatinibe, Cloridrato de Doxorrubicina e AZD2461 foram diluídas em DMSO para solução de uso a 100 μ M.

A partir da solução de uso, foi feita uma diluição em RPMI para obtenção de uma concentração de 20 μ M, a partir da qual foram realizadas as diluições seriadas para a obtenção das concentrações de 10 μ M, 2 μ M, 0,4 μ M, 0,08 μ M, 0,016 μ M e 0,0032 μ M, que foram adicionadas na placa de 96 poços (100 μ L/poço), além do controle de crescimento positivo, não tratado, e do controle de crescimento negativo, onde não há adição de células ou fármacos, apenas meio RPMI. Todas as concentrações foram testadas em triplicata para cada linhagem após um período de incubação de 72 horas, com exceção da linhagem SUP-B15 que também foi tratada e analisada com todas as drogas em períodos de 24 e 48 horas.

Posteriormente, foi adicionado 20 μ L da solução de *Alamar Blue* na concentração de 0.02% diluído em meio RPMI e a placa foi incubada novamente em estufa a 5% de CO₂ por 5 horas para a linhagem SUP-B15 e por 3 horas para as linhagens Raji e Namalwa. A placa foi lida no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de excitação a 560nm e emissão a 590 nm (RAMPERSAD, 2012). A análise dos dados foi realizada através de um regressão não-linear do percentual de inibição x *log* da concentração, determinadas suas concentrações inibitórias para 50% das células (CI50) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5.01).

4.4.2 Perfil de Arrasto do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

As células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas em 1 ml de meio RPMI por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 500 μ l de meio RPMI contendo concentrações sub-inibitórias de AZD2461 ou Mesilato de Imatinibe, para concentração final de ambos a 1,5 μ M, e as células foram re-incubadas nos mesmos parâmetros por 24 horas. O controle negativo não foi tratado, sendo adicionado apenas 500 μ l de RPMI com igual volume de DMSO.

Após o término do tratamento, as células foram contadas em hemocitômetro para se certificar que não houve morte celular significativa e foram então coletadas, centrifugadas e lavadas com PBS 1x. As células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o *kit eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific®)*, tendo sido seguido o protocolo fornecido pela empresa fabricante. Foi preparada uma solução de RNase livre de DNA, contendo PBS 1x e 5% de SFB, e adicionado Iodeto de Propídio (PI) em uma alíquota da solução de RNase de modo a atingir a concentração final de 25 μ g/mL. As células fixadas e permeabilizadas foram então resuspendidas em 100 μ l da solução de RNase e PI preparada e foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente no escuro. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram resuspendidas em 400 μ l de solução de RNase.

Dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSymphony™). Os dados foram examinados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes, sendo analisados através do software Modfit

LTTM. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.4.3 Indução e quantificação de apoptose precoce por Citometria de Fluxo

As células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas em 1 ml de meio RPMI por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 500 µl de meio RPMI contendo concentrações sub-inibitórias de AZD2461 ou Mesilato de Imatinibe, para concentração final de ambos a 1,5 µM, e as células foram re-incubadas nos mesmos parâmetros por 24 horas. O controle negativo não foi tratado, sendo adicionado apenas 500 µl de RPMI com igual volume de DMSO.

Após o término do tratamento, as células foram contadas em hemocítmetro para se certificar que não houve morte celular significativa e foram então coletadas, centrifugadas e lavadas com PBS 1x. Foi preparada uma solução de trabalho de buffer de ligação de anexina-V a partir do reagente *10x Annexin-V Binding Buffer (InvitrogenTM)* e as células lavadas foram ressuspendidas em 100 µl desta solução, sendo então adicionados 5 µl do reagente *Annexin V, FITC conjugate (InvitrogenTM)* e mantidas as amostras em incubação a temperatura ambiente por 15 minutos no escuro. Passada a incubação, foram adicionados 5 µl do reagente 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (*BD PharmingenTM*) para distinção de células não-viáveis e as amostras foram ressuspendidas em mais 400 µl de solução de trabalho de buffer de ligação de anexina-V.

A fluorescência emitida foi analisada em dez mil eventos por citometria de fluxo (BD FACSymphonyTM). Os dados foram examinados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.4.4 Alteração nos níveis de PARP1 intracelulares

As células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas em 1 ml de meio RPMI por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 500 µl de meio RPMI

contendo concentrações sub-inibitórias de AZD2461 ou Mesilato de Imatinibe, para concentração final de ambos a 1,5 μ M, e as células foram re-incubadas nos mesmos parâmetros por 24 horas. O controle negativo não foi tratado, sendo adicionado apenas 500 μ l de RPMI com igual volume de DMSO.

Após o término do tratamento, as células foram contadas em hemocítmetro para se certificar que não houve morte celular significativa e foram então coletadas, centrifugadas e lavadas com PBS 1x. As células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o *kit eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific®)*, tendo sido seguido o protocolo fornecido pela empresa fabricante. O anticorpo *Recombinant Alexa Fluor® 647 Anti-PARP1 antibody [E102]*, adquirido através da empresa *Abcam®*, foi diluído em solução de RNase livre de DNA, contendo PBS 1x e 5% de SFB, em razão de 1:1000, assim como o isotipo controle *Recombinant Alexa Fluor® 647 Rabbit IgG, monoclonal [EPR25A]*, sendo então adicionados as amostras e incubados por 30 minutos no escuro. As amostras foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em solução de RNase.

A fluorescência emitida foi analisada em dez mil eventos por citometria de fluxo (BD FACSymphony™). Os dados foram examinados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.4.5 Determinação de alteração nos perfis de expressão molecular

As células foram cultivadas em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células/poço e mantidas em 1 ml de meio RPMI por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 500 μ l de meio RPMI contendo concentrações sub-inibitórias de AZD2461 ou Mesilato de Imatinibe, para concentração final de ambos a 1,5 μ M, e as células foram re-incubadas nos mesmos parâmetros por 24 horas. O controle negativo não foi tratado, sendo adicionado apenas 500 μ l de RPMI com igual volume de DMSO.

Após o término do tratamento, as células foram contadas em hemocítmetro para se certificar que não houve morte celular significativa e foram então coletadas e centrifugadas para retirada do sobrenadante. O RNA total das células foi extraído utilizando o *RNeasy® Mini Kit (Qiagen®)*, sendo seguidas as

recomendações do fabricante. Os níveis de expressão antes e após os tratamentos foram quantificados para os genes *PARP1* (Referência: Hs00242302_m1), *BCR-ABL p190 (e1a2)* (Referência: Hs03024844_ft) e para o gene de controle endógeno, *ACTB* (Referência: Hs01060665_g1), sendo a síntese de *primers* realizada pela empresa *ThermoFisher™ Scientific*. Os parâmetros para detecção e análise dos dados da PCR em tempo real foram como descritos previamente no tópico 4.3.2.

4.5 Pacientes

4.5.1 Aspectos Éticos e Coleta

Pacientes adultos diagnosticados com LLA atendidos no Hospital Geral de Fortaleza (HGF), centro de referência ao tratamento do câncer do estado do Ceará, foram submetidos a leituras e análise de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e participaram da pesquisa mediante aceite do exposto e assinatura do mesmo. O Projeto foi submetido à Plataforma Brasil e obteve aprovação do comitê de ética em Pesquisa (CEP), sob número de registro 119.649 (ANEXO A).

4.5.2 Amostras Biológicas

Foram analisados todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, em qualquer fase da doença e de diferentes subtipos de acordo com as classificações imunofenotípicas e de cariótipo, totalizando 36 pacientes diagnosticados com LLA. Foram feitas coletas de sangue periférico e as amostras de medula óssea foram coletadas no momento da realização do mielograma para o diagnóstico, descartando qualquer inconveniente ao paciente.

As amostras tiveram as expressões quantificadas por PCR em tempo real utilizando *primers* para os genes *PARP1* (Referência: Hs00242302_m1), *BCR-ABL p190 (e1a2)* (Referência: Hs03024844_ft) e do gene *ACTB* (Referência: Hs01060665_g1), que foi usado como controle endógeno, sendo a síntese de *primers* realizada pela empresa *ThermoFisher™ Scientific*. Os parâmetros para extração de RNA, detecção e análise dos dados da PCR em tempo real foram como descritos previamente no tópico 4.3.

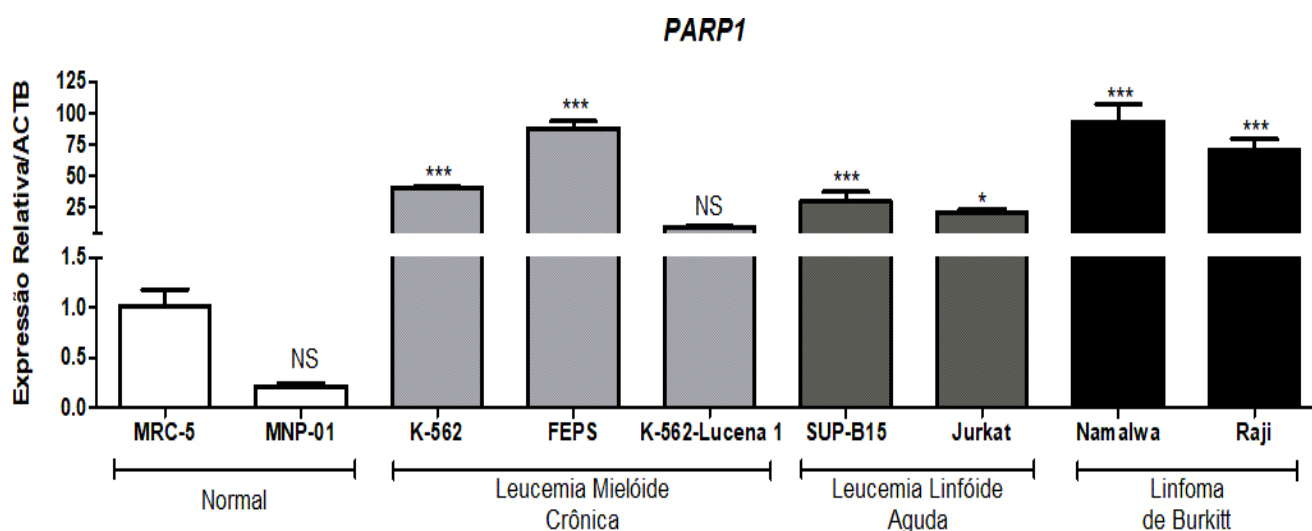
5. RESULTADOS

5.1 Caracterizações Moleculares

5.1.1 Expressão de *PARP1* em linhagens leucêmicas

Foi feita a análise comparativa da expressão de *PARP1* em todas as linhagens de neoplasias hematológicas de interesse em relação a linhagens de células saudáveis, MRC-5 e MNP-01 (**Figura 11**). Quando comparados os níveis de expressão de *PARP1* entre todas as linhagens analisadas, evidenciou-se que, a linhagem SUP-B15 apresentou níveis de expressão de 30 vezes maiores que os níveis de expressão da célula saudável MRC-5 ($p < 0.0001$). Namalwa, FEPS e Raji foram as linhagens de maior expressão relativamente as células saudáveis, com aumentos de 93, 88 e 71 vezes, respectivamente ($p < 0.0001$). Quando comparadas entre si, Namalwa não apresentou diferença significativa em níveis de expressão quando comparada a FEPS, mas apresentou expressão discretamente aumentada em relação a Raji ($p < 0.05$). Nesta análise, a célula gástrica MNP-01 e a linhagem K-562-Lucena 1 não apresentaram diferença estatística significativa na expressão de *PARP1* quando comparadas a MRC-5.

Figura 11. Comparação da expressão de *PARP1* entre um painel de células saudáveis e linhagens leucêmicas.

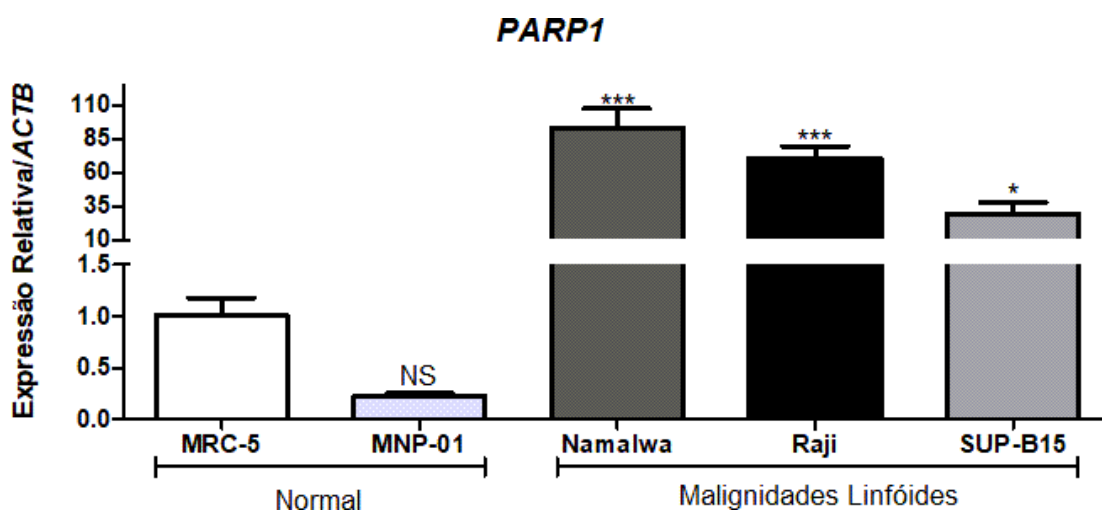


Legenda: Os dados são representados como média do desvio padrão de três experimentos independentes. A expressão de *PARP1* foi normalizada através do gene endógeno *ACTB*. Os níveis de expressão na linhagem MRC-5 foram comparados à linhagem MNP-01 e aos modelos *in vitro* de leucemia mielóide crônica (K-562, FEPS e K-562-Lucena 1), leucemia linfóide aguda (SUP-B15 e

Jurkat) e linfoma de Burkitt (Namalwa e Raji) utilizando o teste estatísticos ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. NS: Não significativa; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

Foram escolhidas as linhagens Namalwa e Raji para a continuidade dos experimentos, concomitantemente à linhagem modelo, SUP-B15, devido a serem todas representativas de modelos de malignidades linfóides com fenótipo de linfoblastos B e pelos altos níveis de expressão de *PARP1*. Quando comparadas entre si e em relação as células saudáveis, as três linhagens apresentaram expressão de *PARP1* significativamente aumentada em relação a MRC-5 (**Figura 12**) e, enquanto Raji e Namalwa não apresentaram diferença estatística significativa na expressão de *PARP1* quando comparadas entre si, ambas as linhagens demonstraram expressão de *PARP1* significativamente aumentada quando comparadas a SUP-B15 ($p < 0.0001$).

Figura 12. Comparação da expressão de *PARP1* entre modelos de malignidades linfóides e células saudáveis.



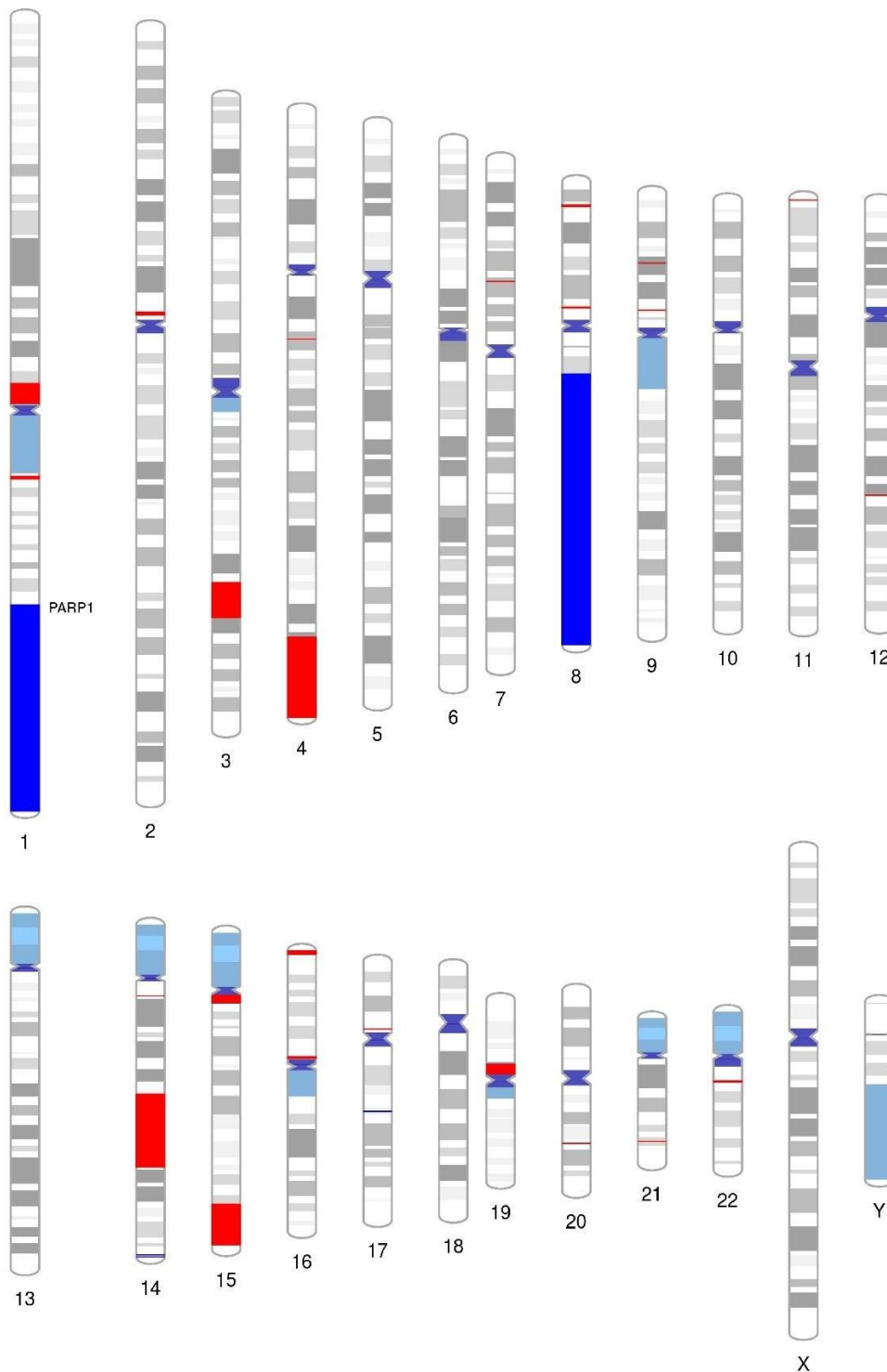
Legenda: Os dados são representados como média do desvio padrão de três experimentos independentes. A expressão de *PARP1* foi normalizada através do gene endógeno *ACTB*. Os níveis de expressão na linhagem MRC-5 foram comparados à linhagem MNP-01 e aos modelos *in vitro* de malignidades linfóides com fenótipo de linfoblastos B (SUP-B15, Namalwa e Raji) utilizando o teste estatísticos ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. NS: Não significativa; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

5.1.2 Alterações no número de cópias genômicas por *aCGH array*

Foi realizada caracterização molecular mais extensa da linhagem representativa do modelo deste estudo, SUP-B15, com objetivo de identificar alterações citogenéticas que possam influenciar a expressão de genes alvo de

interesse e prever outros biomarcadores importantes. A **Figura 13** descreve os ganhos e perdas cromossômicas detectadas, dando-se ênfase no ganho do número de cópias do braço longo do cromossomo 1, região onde o gene *PARP1* se encontra localizado.

Figura 13. Ganhos e perdas cromossômicas na linhagem SUP-B15.



Legenda: As CNAs foram calculadas usando o algoritmo *Aberration Detection Method 2* (ADM-2) no software *CytoGenomics* 5.0.2.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Regiões destacadas em azul-escuro representam ganhos cromossomais enquanto regiões destacadas em vermelho representam perdas. Regiões em azul claro representam heterocromatina condensada. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GX 14.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e o R v.3.6.2. O ideograma foi construído usando o software online PhenoGram (<https://ritchielab.org/software/phenogram-downloads>).

5.2 Avaliações fenotípicas em linhagens linfóides

5.2.1 Determinação de concentrações inibitórias mínimas

A **Tabela 7** descreve a CI50 das drogas Mesilato de Imatinibe, Cloridrato de Doxorrubicina e AZD2461 após 72 horas de incubação com células das linhagens SUP-B15, Raji e Namalwa. AZD2461 é um PARPi análogo ao Olaparibe, porém com modificações em grupos funcionais que diminuem sua afinidade por bombas de efluxo transmembranares da família *ABCB* (O'CONNOR et al., 2016). Mesilato de Imatinibe é um ITQ com ação sobre a proteína quimérica BCR-ABL1 e é o medicamento padrão-ouro para o tratamento de neoplasias Ph+ (DALLE et al., 2019). Cloridrato de Doxorrubicina é uma droga quimioterápica altamente citotóxica, sendo um inibidor de topoisomerasas (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020), e foi utilizado para obtenção de valores de referência de quimioterápicos convencionais em relação as terapias alvo-dirigidas.

Tabela 7. Concentrações inibitórias para 50% das células (CI50) de diferentes linhagens em 72 horas de incubação com diferentes drogas, medido em valores nanomolares (nM).

Droga \ Linhagem	SUP-B15	Raji	Namalwa
AZD2461	344.3 nM (240.1 – 493.7)	NA	20938 nM (16152 – 27143)
Imatinibe	329.2 nM (215.7 – 502.2)	2509 nM (1622 – 3882)	1296 nM (803.8 – 2089)
Doxorrubicina	20.32 nM (11.41 – 36.19)	85 nM (65.13 – 110.9)	75.93 nM (49.63 – 116.2)

NA: Não alcançado.

De maneira geral, Doxorrubicina, a droga citotóxica de referência, apresentou valores de CI50 consideravelmente mais baixos que as terapias alvo-

dirigidas em todas as linhagens analisadas, com valores da ordem de 10^1 nanomolar (nM).

Na linhagem SUP-B15, os valores da CI50 em 72 horas de AZD2461 e Imatinibe foram baixos e extremamente próximos, demonstrando efetividade similar de inibição. Por ser Ph+, a efetividade inibitória do uso de Imatinibe sobre a viabilidade de SUP-B15 é esperada, porém a concentração inibitória atingida com AZD2461 demonstra que o uso de PARPis pode ser tão efetivo quanto o uso de ITQs no tratamento de modelos de LLA Ph+.

Nas linhagens de linfomas Raji e Namalwa, a CI50 em 72 horas para AZD2461 e Imatinibe apresentaram grande dissiparidade. Em ambas linhagens, Imatinibe apresentou alguma atividade inibitória, muito provavelmente devido a sua ação inespecífica sobre outras vias de tirosino-quinases que são essenciais na manutenção da capacidade proliferativa e na sobrevivência de células neoplásicas (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Entretanto, o uso de AZD2461 não apresentou resultados de inibição significativa, sendo alcançada CI50 na ordem de 20 μ M para a linhagem Namalwa e nem mesmo sendo possível de se determinar a CI50 na linhagem Raji, pois as concentrações utilizadas não apresentaram efeito inibitório significativo capaz de ser detectado por ensaio com *Alamar Blue*.

Devido a não responsividade da Raji e da Namalwa as drogas de interesse, apenas a linhagem SUP-B15 teve seus valores de CI50 determinados em intervalos de tratamento de 24 e 48 horas. Os resultados obtidos são descritos na **Tabela 8** e os padrões de inibição se repetem em relação aos já observados em 72 horas de tratamento, com Doxorrubicina apresentando capacidade inibitória consideravelmente elevada em relação aos tratamentos alvo-dirigidos e com equivalência nas concentrações inibitórias de AZD2461 e Imatinibe.

Tabela 8. Concentrações inibitórias para 50% das células (CI50) na linhagem SUP-B15 em 24 e 48 horas de incubação com diferentes drogas, medido em valores nanomolares (nM).

Droga \ Período	24 horas	48 horas
AZD2461	3925 nM (2502 – 6157)	1421 nM (766.9 – 2632)
Imatinibe	3966 nM (2398 – 6558)	1230 nM (747.5 – 2024)

Doxorrubicina	141.6 nM (93.92 – 213.6)	57.33 nM (36.53 – 89.97)
---------------	-----------------------------	-----------------------------

Levando-se em consideração os três intervalos de tratamento, os valores inibitórios da viabilidade de SUP-B15 tratada com AZD2461 ou com Imatinibe não foram significativamente diferentes entre si quando comparados por teste t de Student, demonstrando a equivalência das drogas no tratamento deste modelo de LLA Ph+.

5.2.2 Avaliação de alteração do ciclo celular

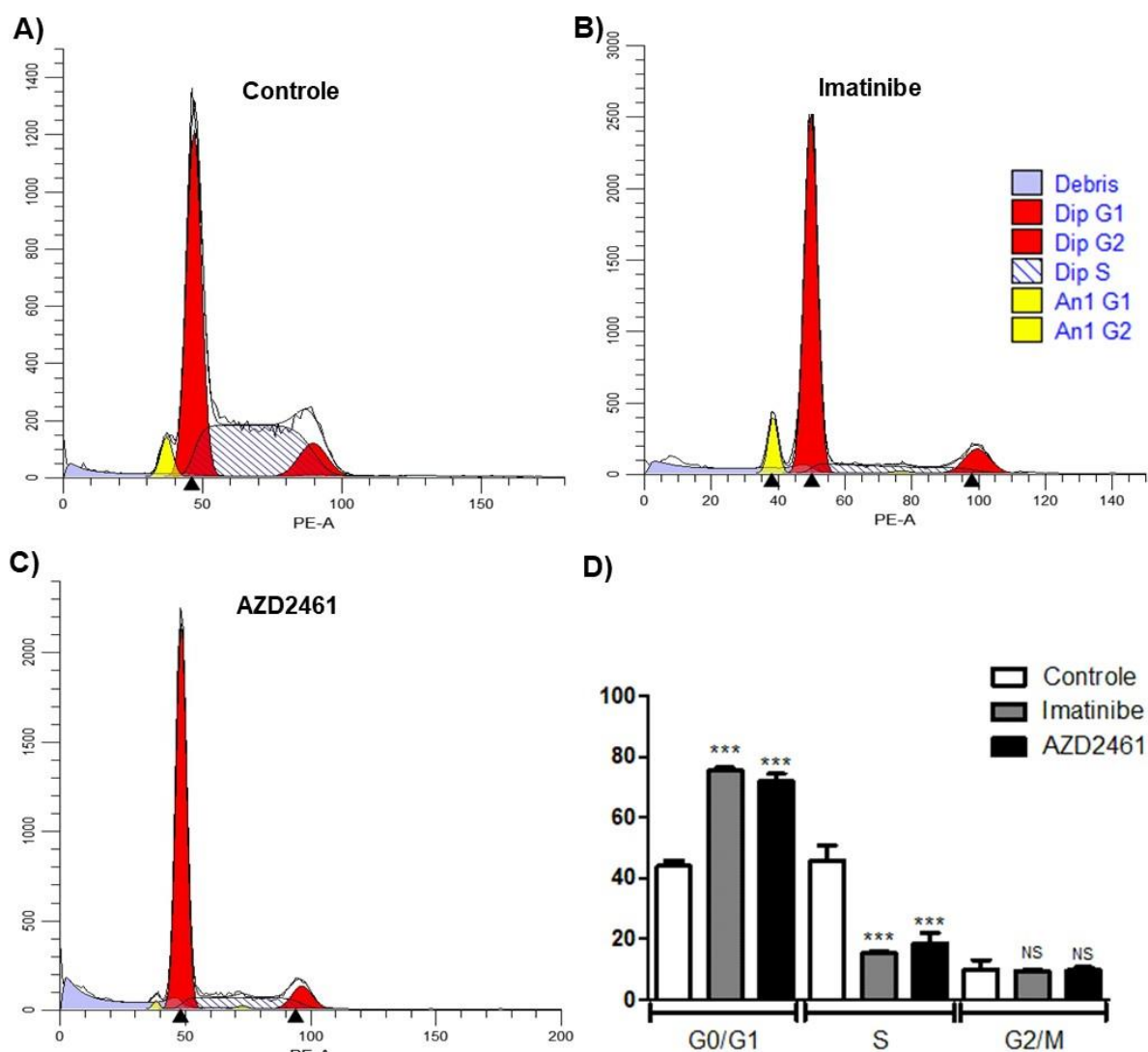
Características fenotípicas associadas ao tratamento com a droga AZD2461 foram mensuradas apenas para a linhagem SUP-B15, representativa de modelos de LLA Ph+, devido a não responsividade das outras duas linhagens analisadas ao tratamento proposto. As células foram tratadas em concentração sub-inibitórias de 24 horas – 1,5 μ M – de AZD2461 ou Imatinibe, sendo este o controle positivo de tratamento por ser um fármaco de referência, para evitar que houvesse morte celular significativa previamente a análise, enquanto ao controle negativo de tratamento foi adicionado apenas igual volume de DMSO.

No experimento controle para arrasto do ciclo celular, a maioria das células se encontra em fase G0/G1 – 47,37% –, com grande parte também em fase S – 43,98% – e uma minoria das células em fase G2/M – 8,66%. Esta baixa presença de células SUP-B15 em fase mitótica corresponde ao já reportado previamente na literatura e é representativo do longo período do ciclo celular da linhagem SUP-B15, de aproximadamente 46 horas (AL-AAMRI et al., 2019). Além disso, uma sub-população tumoral de células aparentemente hipodiploides também foi identificada na análise do ciclo controle, constituindo 4.21% dos eventos analisados, entretanto não sendo possível de se determinar as porcentagens de células dessa população em cada fase do ciclo devido as sobreposições de fluorescência com a população pseudodiploide de maior frequência.

Nos experimentos tratados com AZD2461 e Imatinibe, foi observado arrasto de ciclo significativo em fase G0/G1 em relação ao controle ($p < 0.0001$), com 72,6% e 75,12% das células em G0/G1, respectivamente aos tratamentos, não sendo estatisticamente significativa a diferença no arrasto em G0/G1 entre os dois tratados. Ambos tratamentos apresentaram diminuição significativa de células em fase S em

relação ao controle ($p < 0.0001$), com 19,3% de células em S para o tratado com AZD2461 e 14,9% de células em S para o tratado com Imatinibe, novamente não sendo estatisticamente significativa a diferença no arrasto em S entre os dois tratados. Na análise de fase G2/M, não houve diferença significativa entre os tratados e o controle, sendo a porcentagem de células de 8,36% e 9,98% para AZD2461 e Imatinibe, respectivamente (**Figura 14**).

Figura 14. Perfil de arrasto no ciclo celular da linhagem SUP-B15 após tratamento de 24 horas com AZD2461 ou Imatinibe.



Legenda: As células foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de 1,5 μM de AZD2461 ou Imatinibe durante 24 horas e os gráficos representam médias de três experimentos distintos. O perfil de arrasto do ciclo celular foi comparado entre os experimentos tratados e o controle utilizando o teste estatístico ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. Picos de emissão de fluorescência foram detectados após processamento das amostras com o agente intercalante de DNA, iodeto de propídeo (PI). **A)** Experimento controle tratado com volume correspondente de DMSO. **B)** Experimento tratado com imatinibe. **C)** Experimento tratado com AZD2461. **D)** Porcentagem de células em cada fase do

ciclo celular após tratamentos e comparação com o controle não tratado. Dip: População pseudodiplóide; An1: População hipodiploide; NS: Não significante; *** $p < 0.0001$.

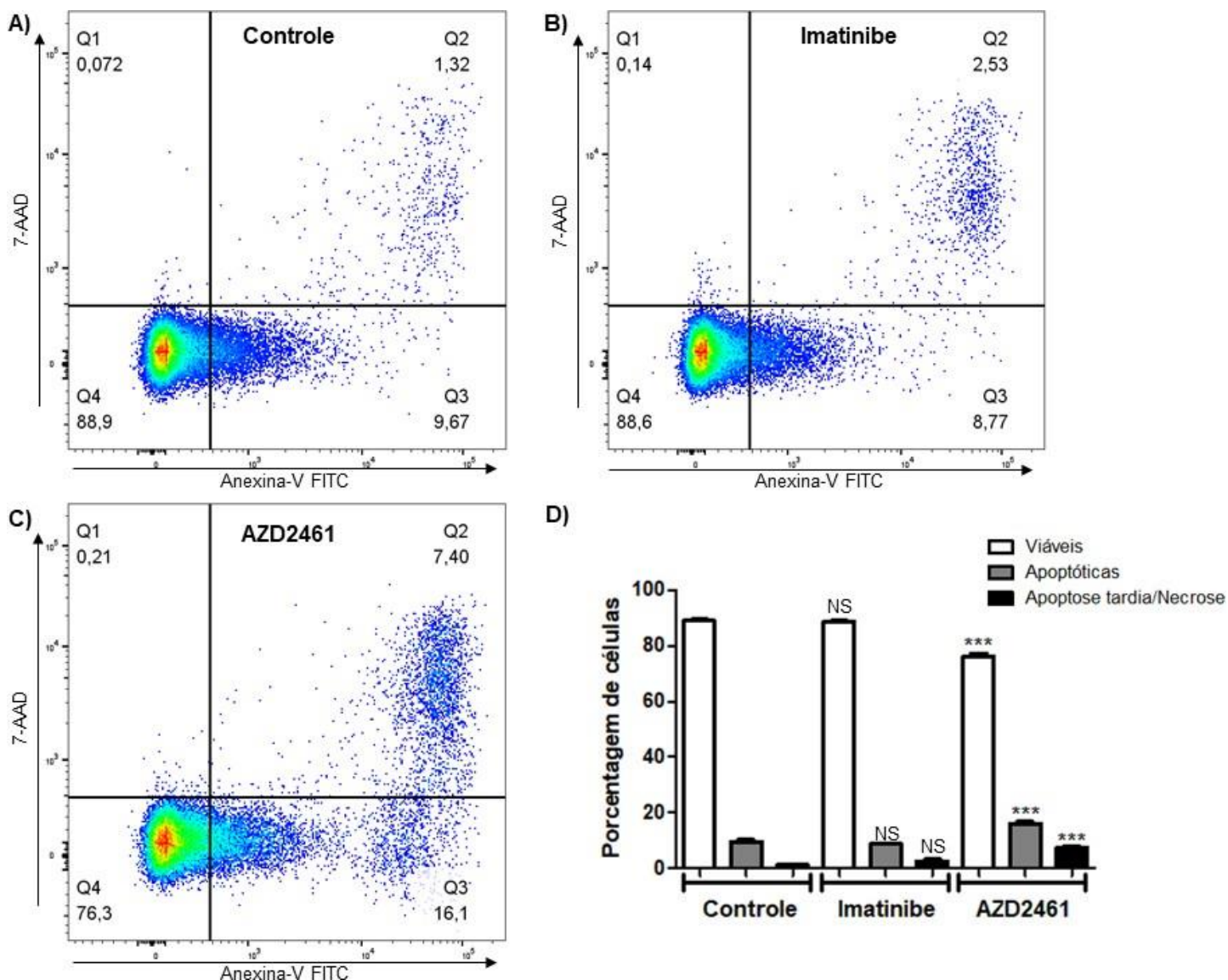
A mesma sub-população de células tumorais hipodiplóides vista na análise do experimento controle foi também observada com pico de emissão de fluorescência melhor definido no tratado com Imatinibe, representando 8,92% do total de eventos analisados, enquanto se demonstrou menos detectável após o tratamento com AZD2461, representando apenas 1,7% dos eventos analisados. Entretanto, quando submetidas a análise de variância, as diferenças na frequência de apresentação desta sub-população não se mostraram estatisticamente significantes.

5.2.3 Capacidade de indução de apoptose precoce

Quando mensurada a capacidade dos tratamentos de induzir apoptose precocemente, foi utilizado o marcador anexina-V conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) para identificar células com fosfatidilserina exposta na membrana plasmática e em início de processo apoptótico. Para contramarcagem de células com membrana plasmática permeabilizada e em apoptose tardia ou passando por processo necrótico, foi utilizado o agente intercalante de DNA 7-AAD. Células duplo negativas para ambos os marcadores representam populações viáveis.

O tratamento fazendo uso de imatinibe se mostrou ainda similar ao experimento controle dentro do período de tratamento estipulado de 24 horas e em concentrações sub-inibitórias, não possuindo diferença estatística significativa quanto as porcentagens de cada população identificada. Entretanto, o tratamento utilizando AZD2461 nas mesmas condições mostrou acentuado aumento de populações em apoptose precoce e apoptose tardia/necrose em relação ao controle e ao tratamento com imatinibe ($p < 0.0001$) (**Figura 15**).

Figura 15. Indução de apoptose precoce na linhagem SUP-B15 após tratamento com AZD2461 ou Imatinibe.



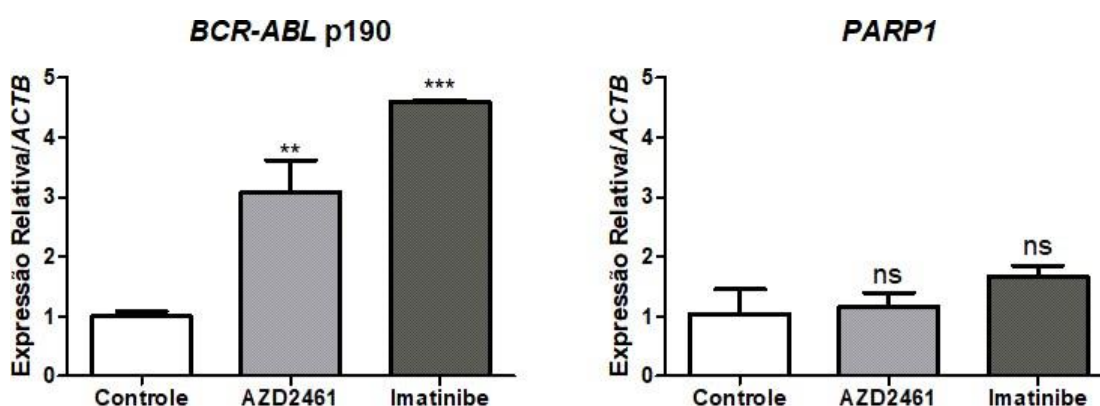
Legenda: As células foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de 1,5 μM de AZD2461 ou Imatinibe durante 24 horas e os gráficos representam médias de três experimentos distintos. As porcentagens de células apoptóticas foram comparadas entre os experimentos tratados e o controle utilizando o teste estatístico ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. **A)** Experimento controle tratado com volume correspondente de DMSO. **B)** Experimento tratado com imatinibe. **C)** Experimento tratado com AZD2461. **D)** Porcentagens populacionais dos três experimento e significância da variação entre eles. NS: Não significante; *** $p < 0.0001$.

5.2.4 Alterações no perfil de expressão e apresentação de PARP1

Buscando determinar se os tratamentos propostos influenciam a expressão de *PARP1* e os níveis intracelulares da proteína, realizou-se uma qPCR de amostras tratadas concomitante a marcação de PARP1 por anticorpo conjugado anti-PARP1 Alexa Fluor® 647, sendo feita a mensuração da fluorescência por citometria de fluxo.

Na análise por qPCR, os níveis de expressão do biomarcador *BCR-ABL* p190, característico da linhagem SUP-B15, também foram mensurados, e é observado aumento significativo de expressão após os dois tratamentos propostos ($p < 0.01$). Entretanto, o tratamento com AZD2461 ou Imatinibe não influenciaram a expressão de *PARP1* na linhagem, permanecendo similar ao controle negativo de tratamento (**Figura 16**).

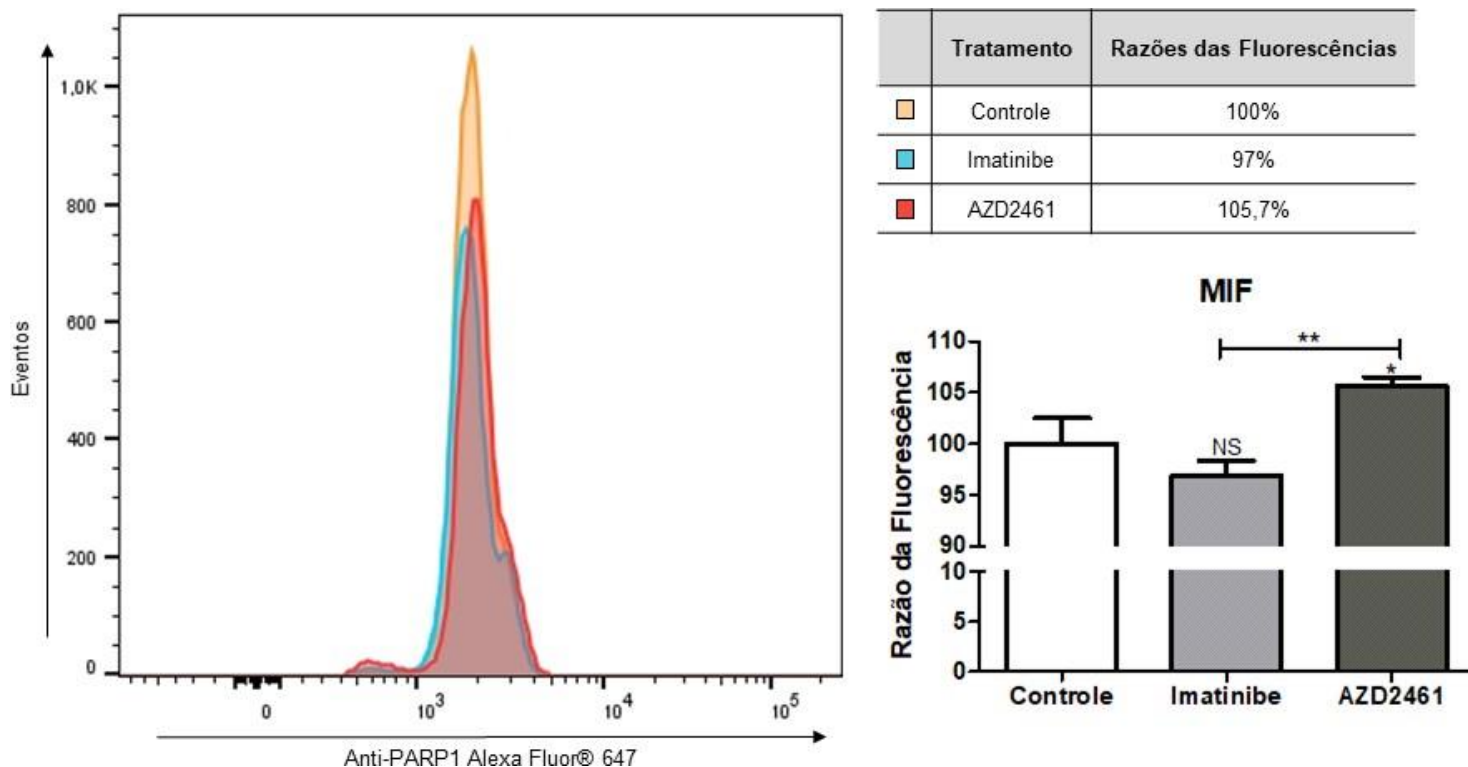
Figura 16. Níveis de expressão do biomarcador *BCR-ABL* p190 e da proteína *PARP1* na linhagem SUP-B15 após tratamento com AZD2461 ou Imatinibe.



Legenda: As células foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de 1,5 μ M de AZD2461 ou Imatinibe durante 24 horas e os gráficos representam médias de três experimentos distintos. As expressões de *BCR-ABL* p190 e *PARP1* foram normalizadas através do gene endógeno *ACTB*. Os níveis de expressão foram mensurados na linhagem SUP-B15 comparando-se o experimento de controle não-tratado com os experimentos após utilização dos tratamentos propostos. A análise estatística foi feita pela análise de variância ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. NS: Não significante; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

A análise da marcação de PARP1 por anticorpo conjugado leva em consideração a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) entre as amostras e revela presença significativa de maiores níveis da proteína em população de células tratadas com AZD2461 em relação ao experimento controle ($p < 0.05$). Enquanto o valor da MIF relativa ao experimento tratado com imatinibe não se mostra estatisticamente significativo em relação ao controle, é possível de se observar uma tendência a menores níveis de PARP1, evidente pelo aumento da significância quando realizada comparação relativa a fluorescência dos dois experimentos tratados ($p < 0.01$) (**Figura 17**).

Figura 17. Tratamento com AZD2461 revela maiores níveis de PARP1 em população pré-apoptótica.



Legenda: As células foram tratadas com concentrações sub-inibitórias de 1,5 μ M de AZD2461 ou Imatinibe durante 24 horas e os gráficos representam médias de três experimentos distintos. Os níveis de PARP1 foram mensurados através da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) do fluorocromo Alexa Fluor® 647 e comparados entre os experimentos tratados e o controle utilizando o teste estatístico ANOVA e comparações múltiplas de Bonferroni. As razões das MIFs são representadas como porcentagens relativas a 100% da fluorescência do controle. NS: Não significante; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5.3 Validação de biomarcadores em amostras de pacientes

A partir de amostras de 36 pacientes portadores de LLA reunidos para este estudo, a expressão de *BCR-ABL* p190 foi quantificada e atestada como positiva para 8 pacientes, cujas características clínicas se encontram reunidas na **tabela 7**. A informação descrita na tabela provém da consulta dos prontuários dos pacientes analisados.

Tabela 9. Características clínicas dos pacientes analisados portadores de LLA e positivos para *BCR-ABL* p190.

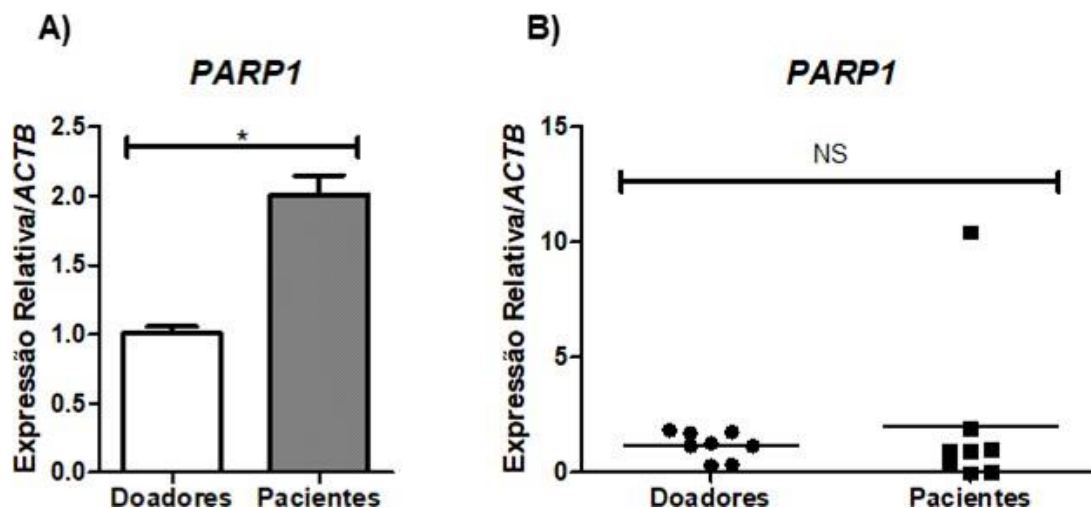
Paciente	Características	Contagem de leucócitos (WBC/mm ³)	Imunofenotipagem	Mielograma
I	Gênero masculino; 35 anos de idade	9.600	CD10, CD19, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, cyCD79a, CD123; Compatível com LLA de linfócitos B	87% de blastos

II	Gênero masculino; 54 anos de idade	25.200	CD19, CD10, CD79a, CD22, CD33, CD38, CD123, CD45, CD13, CD58; Compatível com LLA de linfócitos B	96% de blastos
III	Gênero feminino; 36 anos de idade	12.400	CD10, CD19, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD58, cyCD79a, CD81; Compatível com LLA de linfócitos B	100% de blastos
IV	Gênero masculino; 29 anos de idade	6.600	CD10, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD58, CD81, cyCD79a; Compatível com LLA de linfócitos B	89% de blastos
V	Gênero masculino; 69 anos de idade	3.300	CD10, CD19, CD20, CD22, CD38, CD58, cyCD79a, CD81; Compatível com LLA de linfócitos B	65% de blastos
VI	Gênero masculino; 90 anos de idade	224.500	CD19, CD20, CD22, CD38, CD45, cyCD79a, CD81; Compatível com LLA de linfócitos B	11% de blastos. Aspirado hiper celular a custas de séries eritroides e megacariocíticas
VII	Gênero feminino; 33 anos de idade	12.200	-	1,5% de blastos. Aspirado normocelular
VIII	Gênero masculino; 40 anos de idade	2.200	CD10, CD19, CD20, CD34, CD45, CD81, HLA-DR; Compatível com LLA de linfócitos B	4% de células linfóides anômalas. Aspirado hiper celular

A expressão de *PARP1* nos pacientes foi determinada pela comparação à expressão de *PARP1* de 8 doadores saudáveis. Devido ao baixo *n* amostral, as análises foram conduzidas em *pool*, mas também individualmente entre pacientes e doadores. Quando analisada em *pool*, a expressão de *PARP1* em amostras de pacientes portadores de LLA *BCR-ABL* p190+ se mostra significativamente aumentada em um fator de duas vezes em relação aos pacientes saudáveis ($p < 0,05$). Entretanto, a análise individual demonstra a presença de uma única amostra com valor elevado de expressão de *PARP1*, aproximadamente 10 vezes maior comparativamente aos controles, e a comparação com a expressão em doadores

saudáveis passa a ser estatisticamente não-significante (**Figura 18**). A amostra de expressão diferencial representa o paciente VI.

Figura 18. Comparação da expressão de *PARP1* entre pacientes portadores de LLA *BCR-ABL* p190+ e doadores saudáveis.



Legenda: Os dados são representados como média do desvio padrão de três experimentos independentes. A expressão de *PARP1* foi normalizada através do gene endógeno *ACTB*. **A)** Comparação da expressão de *PARP1* entre *pools* de amostras de pacientes LLA *BCR-ABL* p190+ e doadores saudáveis. **B)** Comparação da expressão de *PARP1* considerando-se individualmente amostras de pacientes LLA *BCR-ABL* p190+ e doadores saudáveis onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. A análise estatística entre os grupos foi conduzida pela realização de teste t de Student. NS: Não significativa; * $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Populações adultas portadoras de LLA ainda sofrem com prognósticos ruins e baixa sobrevida na prática clínica. Enquanto isso, apesar das altas taxas de cura obtidas em populações pediátricas, já não é mais possível uma melhoria contínua no prognóstico através de estratégias envolvendo o aumento das doses quimioterapêuticas atuais (ALDOSS; STEIN, 2018; ALLEMANI et al., 2018). Além disso, a presença da translocação 9;22 dando origem ao gene quimérico *BCR-ABL* p190, representa um pior prognóstico para ambas as populações de LLA (DEANGELO; JABBOUR; ADVANI, 2020).

Uma das maiores características da presença de *BCR-ABL* é a grande instabilidade genômica associada a leucemogênese, promovendo altas taxas de mutação tumoral devido a indução da atividade de vias não-conservativas do reparo do DNA (NIEBOROWSKA-SKORSKA et al., 2012). Assim, este trabalho busca evidências, através de ensaios *in vitro*, que suportem o redirecionamento de fármacos inibidores PARP, com foco na enzima PARP1 pelo seu papel na sinalização do reparo genético (PASCAL, 2018), para o tratamento de modelos de LLA *BCR-ABL* p190+ através da exploração de vias de letalidade sintética.

Nos modelos celulares leucêmicos analisados, *PARP1* se mostra predominantemente hiperexpressa em relação a linhagens celulares não-neoplásicas. Com exceção da linhagem K562-Lucena-1, todas as linhagens neoplásicas analisadas demonstraram hiperexpressão de *PARP1*, caracterizando-o como um biomarcador diferencialmente expresso entre modelos de LMC, LLA e linfomas de Burkitt em comparação a modelos de linhagens não-neoplásicas.

Altos níveis de expressão de *PARP1*, entretanto, não necessariamente se traduzem em sensibilidade a inibidores de PARP. Apesar da alta expressão de *PARP1* nas linhagens Raji e Namalwa, o uso de um PARPi não teve efeito sob o crescimento destas linhagens e a possível explicação está no entendimento de que linfomas de Burkitt, o modelo o qual ambas as linhagens são representativas, apesar de possuírem uma alteração citogenética bem definida, na translocação do gene *MYC*, são tumores heterogêneos e que possuem co-expressão de diversas vias oncogênicas capazes de sustentar a proliferação tumoral contínua, mesmo sob efeito de inibição farmacológica de uma destas vias (SCHMITZ et al., 2012).

Um mecanismo leucemogênico importante compartilhado pelas duas linhagens é a presença de mutações em *TP53*, apontadas pela busca através do biobanco *DepMap Portal* (<https://depmap.org/portal>) que revela a presença de mutações nos aminoácidos R213Q e R248Q do gene nas linhagens Raji e Namalwa, respectivamente. Em estudo por Zhang e colaboradores (ZHANG et al., 2014), R213Q é demonstrada como responsável por diminuir a ação de p53 na transcrição do inibidor de ciclinas dependente de quinase 1A (CDKN1A), importante fator na cascata de regulação do ciclo celular (ENGELAND, 2022), diminuindo o arrasto do ciclo celular existente em resposta a danos do DNA. De maneira similar, mutações envolvendo R248* de *TP53* afetam diretamente seu domínio de ligação ao DNA, diminuindo significativamente a afinidade da proteína por ácidos nucleicos e reduzindo a frequência de formação de tetrâmeros de p53 com o DNA (BALASUNDARAM; DOSS, 2022).

Assim, enquanto em modelos de câncer de mama a presença de *TP53* selvagem é fator preditor de resistência a PARPis (IRENO et al., 2014) e a presença de mutações no domínio de ligação ao DNA induz maiores níveis de PARilação e maior sensibilidade ao tratamento com o PARPi talazoparib (XIAO et al., 2020), o mesmo não pode ser extrapolado para modelos de linfomas a partir dos dados obtidos neste estudo.

Outra característica compartilhada entre as duas linhagens é a infecção por Epstein-Barr vírus (EBV), altamente associado com a leucemogênese de malignidades de linfócitos B, em particular linfomas de Burkitt, sendo um fator de risco de mau prognóstico na prática clínica (GUAN et al., 2017; SHANNON-LOWE; RICKINSON; BELL, 2017). Morgan e colaboradores (MORGAN et al., 2022) recentemente demonstraram a atividade de PARP1 na regulação da transcrição de genes virais do EBV, modulando perfis associados a infecção em fases latentes ou ativas, entretanto, apesar de previamente proposta pelo mesmo grupo de pesquisa como uma via de potencial terapêutico em neoplasias associadas a EBV (LUPEY-GREEN et al., 2018), o tratamento com inibidor de PARP não demonstrou atividade citotóxica relevante sobre nenhuma das duas linhagens.

Quando comparada as outras linhagens analisadas, SUP-B15 possui expressão relativa de *PARP1* não tão alta, porém foi altamente responsiva ao tratamento com PARPi, em níveis comparáveis ao tratamento padrão-ouro com o uso de Imatinibe. A translocação *BCR-ABL1*, característica da linhagem SUP-B15, é

descrita como capaz de, por si só, iniciar o processo leucemogênico (BAVARO et al., 2019), e tumores Ph⁺ costumam apresentar cariótipos simples, sendo hiperdependentes da hiperexpressão de BCR-ABL1, uma condição denominada “vício oncogênico” (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Nesta situação, e levando em consideração a instabilidade genômica altamente associada a presença de *BCR-ABL1* (NIEBOROWSKA-SKORSKA et al., 2012), a inibição de PARP por meio do uso de AZD2461, e consequente desregulação de vias de sinalização do RDD, se mostrou altamente disruptiva à manutenção da homeostase celular, favorecendo diminuição considerável de viabilidade neste modelo representativo de LLA Ph⁺.

Apesar de não possuir testes de tolerabilidade realizados em pacientes com resultados divulgados, o uso de AZD2461 *in vitro* não apresenta atividade citotóxica sobre o crescimento de linfócitos B, mesmo em concentrações tão altas quanto 40 µM (ARENA et al., 2022). Portanto, o perfil observado de baixa citotoxicidade sob células não-neoplásicas reforça o efeito específico de inibidores de PARP atrelados a vias de letalidade sintética (JIANG et al., 2019) e corrobora com a proposta de que as alterações fenotípicas associadas a leucemogênese da LLA de linfócitos B *BCR-ABL* p190⁺ que a tornam sensível ao uso de PARPis, e não a fisiologia inerente aos linfócitos B em si.

Análises de arrasto no ciclo celular da linhagem SUP-B15 após os tratamentos propostos demonstram um perfil muito similar entre o uso de AZD2461 e Imatinibe, com significativo arrasto em fase G₀/G₁ em ambos os tratamentos em detrimento de células em fase S. Em análise do ciclo controle, uma subpopulação hipodiplóide pôde ser claramente detectada e esta mesma subpopulação continua presente após o tratamento utilizando Imatinibe, tendo até mesmo um aumento percentual em frequência, enquanto, após o tratamento utilizando AZD2461, esta subpopulação é quase indetectável, representando apenas 1,7% dos eventos analisados.

A presença de subpopulações dentro de modelos de linhagens celulares é bem descrita na literatura devido as altas frequências de mutação em células neoplásicas (NGUYEN et al., 2016). Apesar de não ter sido possível a caracterização molecular das duas subpopulações identificadas neste estudo, a população hipodiploide se mostra altamente sensível ao tratamento utilizando PARPi e pouco afetada pelo uso de Imatinibe. É possível se teorizar a perda de função de BCR-ABL como mecanismo de resistência da linhagem, o que demonstraria a vantagem no uso

de AZD2461 como alternativa a resistência adquirida, entretanto, investigações mais extensas precisam ser conduzidas.

Ao avaliar o uso de anexina como marcador apoptótico, o tratamento com AZD2461 induz morte celular precoce de maneira significativa em relação ao tratamento com Imatinibe. As respectivas farmacodinâmicas devem ser entendidas para interpretação dos dados pois, apesar de os valores citotóxicos de ambas as drogas serem bastante próximos, AZD2461 inibe a ação de enzimas diretamente atuantes na homeostase celular (CHAUDHURI; NUSSENZWEIG, 2017), possuindo atividade disruptiva imediata, enquanto o uso de Imatinibe afeta BCR-ABL, que possui importante atividade como fator de transcrição e modificador pós-traducional (SUN et al., 2018), e gerará dano citotóxico pelas suas aplicações *downstream*, de maneira tardia.

Além disso, a presença de maior frequência de marcadores de morte nos experimentos tratados com AZD2461 é possível reflexo da sua atividade sobre as subpopulações tumorais detectadas. Comparando-se os experimentos de ciclo celular e apoptose precoce, é possível de se interpretar que as células marcadas precocemente em análise de anexina-V são representativas da mesma população hipodiplóide que diminui drasticamente em frequência na análise de ciclo celular, significando que AZD2461 induz morte celular precoce, comparativamente ao Imatinibe, não sobre a linhagem SUP-B15 de maneira geral, mas sim sobre suas subpopulações. A partir dos resultados obtidos, a caracterização das subpopulações formadoras da linhagem através de análises transcriptômicas de células únicas ou de marcação diferencial de antígenos de membrana é de extrema importância para estratificação de grupos de risco dentro do modelo leucêmico e predição de responsividade ao tratamento com inibidores de PARP.

Ademais, a mensuração de alterações na expressão dos genes-alvo de interesse, *BCR-ABL* e *PARP1*, revela, mais uma vez, correlação direta entre a ação de AZD2461 e Imatinibe. Os dois tratamentos propostos promovem aumento na expressão de *BCR-ABL* p190 de maneira significativa em relação a controles não-tratados, existindo inclusive diferença estatística significativa nos níveis de expressão entre os dois tratamentos, favorecendo a hiperexpressão após uso de Imatinibe ($p > 0,05$). Entretanto, os níveis de expressão de *PARP1* permanecem inalterados após exposição a ambos os tratamentos.

A hiperexpressão de *BCR-ABL* após o tratamento com Imatinibe é bem reportado na literatura e representa um mecanismo compensatório de tentativa de evasão de morte celular e obtenção de resistência, tendo sido previamente demonstrado em modelos de LMC (KC et al., 2019), e sendo inclusive um fator de predição de resposta a ação de inibidores de tirosina-quinase entre populações tumorais (KARIMIANI et al., 2014). Portanto, o aumento aqui demonstrado na expressão de *BCR-ABL* p190 após os tratamentos propostos corrobora com o já descrito previamente na literatura e expande o conceito de indução de maiores níveis de expressão como via compensatória de sobrevivência também para modelos de LLA Ph+.

A capacidade de AZD2461 em modular a expressão de *BCR-ABL* de maneira correspondente ao tratamento com Imatinibe reforça a ação citotóxica do composto e a estratégia similar dos clones neoplásicos para contornar a indução da apoptose. Nenhum dos dois tratamentos, entretanto, apresentou atividade modulatória sobre a expressão de *PARP1*, que permaneceu não significativa em comparação ao controle não tratado.

A análise dos níveis intracelulares de *PARP1* após os tratamentos revela que populações pré-apoptóticas tratadas com AZD2461 apresentam maior quantidade da proteína em questão em relação a experimentos de controle não tratado e a experimentos tratados com Imatinibe, que, entre si, não apresentaram diferença estatística. Correlacionando com os dados previamente apresentados de morte celular precoce e não-variância na expressão de *PARP1*, o aumento na MIF de populações tratadas com AZD2461 possivelmente representa a maior resistência ao tratamento em células que inerentemente possuem maiores níveis de expressão de *PARP1*, enquanto células com níveis mais baixos tendem a indução da apoptose precoce e são representadas pelo aumento do arrasto no gráfico do tratamento com AZD2461 (**Figura 17**).

A hiperexpressão de *PARP1* é reportada na literatura como mediadora da resistência ao tratamento com inibidores de PARP, mais especificamente olaparibe, em modelos de câncer de mama (GILABERT et al., 2014) e, pelos nossos achados, segue a mesma tendência em modelos hematológicos. A modulação da expressão de *PARP1* por tratamentos, entretanto, é pouco descrita, gerando uma lacuna para comparação de dados, mas nos permitindo afirmar que a inibição da expressão de *PARP1* não é o mecanismo que medeia a morte a partir do uso de inibidores de PARP

ou de BCR-ABL. Para uma melhor correlação do efeito dos fármacos sobre a atividade catalítica de PARP1, análises adicionais são necessárias mensurando-se os níveis intracelulares de polímeros de PAR ou a proteômica de proteínas PARiladas após os tratamentos.

Por fim, buscou-se validar a hiperexpressão de *PARP1* em pacientes portadores de LLA *BCR-ABL* p190+, entretanto, o baixo *n* amostral obtido dificulta a obtenção de comparações estatisticamente significantes. A partir de 36 amostras de pacientes adultos portadores de LLA, a presença da translocação 9:22 originária de *BCR-ABL* foi detectada em 8 destes pacientes, em concordância com a frequência de 25% de apresentação em pacientes adultos observada na literatura (DEANGELO; JABBOUR; ADVANI, 2020).

Quando analisados a partir de *pool* amostral, os níveis de *PARP1* são significativamente hiperexpressos em pacientes portadores de LLA Ph+ em comparação a doadores saudáveis, em níveis aproximadamente duas vezes mais altos. A análise individual, entretanto, revela a presença de uma amostra *outlier* em comparação as demais que anula a significância estatística previamente obtida, assim como, quando retirada, torna o restante da análise em *pool* não significativa (dado não apresentado). Contudo, o baixo *n* amostral obtido não nos permite afirmar que essa amostra seja verdadeiramente uma *outlier* em comparação ao total da população, representando um viés a ser contornado em análises posteriores.

A literatura descreve extensamente a associação entre maiores níveis de expressão de *PARP1* e piores prognósticos em pacientes portadores de malignidades de tumores sólidos, traduzindo-se em piores taxas de sobrevida geral e, até mesmo, maiores incidências de metástase (BERTUCCI et al., 2019; DONIZY et al., 2020; ZUO et al., 2022). Nos voltando para esta amostra de expressão diferencial, representativa do paciente VI na **tabela 9**, a hiperexpressão de *PARP1* nos casos aqui descritos se mostra associada a um perfil leucêmico mais agressivo e diferenciado, com altíssimo número de leucócitos no sangue periférico e menor presença de blastos na medula, comparativamente aos outros pacientes apresentados.

A partir da correlação com os dados de citotoxicidade *in vitro*, a hiperexpressão de *PARP1* potencialmente representa um fator de risco de mau prognóstico em casos de neoplasias hematológicas, sendo indicativa de células menos responsivas ao tratamento utilizando inibidores de PARP e de fenótipos mais agressivos em pacientes portadores de LLA *BCR-ABL* p190+.

7. CONCLUSÃO

Este estudo classifica *PARP1* como um marcador diferencialmente expresso entre modelos de LLA, LMC e linfomas de Burkitt, com hiperexpressão predominante comparativamente a linhagens de células não-neoplásicas. O uso de AZD2461 mostra efetiva atividade citotóxica no tratamento de modelos de LLA *BCR-ABL p190+*, ao mesmo tempo que não se mostra capaz de induzir a morte em modelos celulares de linfoma de Burkitt, com a hiperexpressão de *PARP1* potencialmente sendo uma preditora de resistência ao tratamento. O uso de AZD2461 induz arrasto no ciclo celular da linhagem SUP-B15 de maneira similar ao tratamento com Imatinibe, o padrão-ouro no tratamento de tumores *BCR-ABL* positivos, além de induzir elevada apresentação de marcadores de morte precoce e modular a expressão de *BCR-ABL* de maneira análoga. Em amostras de pacientes, o baixo *n* amostral obtido configura um obstáculo no estabelecimento de comparações estatísticas relevantes, contudo, a hiperexpressão de *PARP1* está potencialmente associada a fenótipos de doença mais agressiva e elevada presença de leucócitos no sangue periférico.

Assim, o uso de AZD2461 apresenta potencial benéfico no tratamento de pacientes portadores de LLA *BCR-ABL p190+*, entretanto, estudos mais extensos considerando a aplicabilidade do sinergismo no uso de PARPis e inibidores de *BCR-ABL* precisam ser conduzidos, além de investigações utilizando modelos *in vivo* para confirmar o efeito e as implicações citotóxicas deste esquema terapêutico. Análises comparativas entre coortes de pacientes maiores também são demandadas com intuito de efetivamente validar os achados e hipóteses aqui expostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMAWJOOD, B. et al. Genetic Biomarkers in Chronic Myeloid Leukemia: What Have We Learned So Far? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, 1 nov. 2021.

AKI, T.; UEMURA, K. Cell Death and Survival Pathways Involving ATM Protein Kinase. **Genes**, v. 12, n. 10, 1 out. 2021.

AL-AAMRI, H. M. et al. Time dependent response of daunorubicin on cytotoxicity, cell cycle and DNA repair in acute lymphoblastic leukaemia. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 27 fev. 2019.

ALDOSS, I.; STEIN, A. Advances in adult acute lymphoblastic leukemia therapy. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 5, p. 1033–1050, 4 maio 2018.

ALEMASOVA, E. E.; LAVRIK, O. I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 8, p. 3811, 7 maio 2019.

ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of trends in cancer survival: analysis of individual records for 37,513,025 patients diagnosed with one of 18 cancers during 2000–2014 from 322 population-based registries in 71 countries (CONCORD-3). **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10125, p. 1023, 3 mar. 2018.

ARENA, A. et al. DNA damage triggers an interplay between wtp53 and c-Myc affecting lymphoma cell proliferation and Kaposi sarcoma herpesvirus replication. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1869, n. 1, 1 jan. 2022.

ARMITAGE, J. O. et al. Non-Hodgkin lymphoma. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 298–310, 15 jul. 2017.

BAGLO, Y. et al. Evolutionary dynamics of cancer multidrug resistance in response to olaparib and photodynamic therapy. **Translational Oncology**, v. 14, n. 11, p. 101198, 1 nov. 2021.

BALASUBRAMANIAM, S. et al. FDA approval summary: Rucaparib for the treatment of patients with deleterious BRCA mutation–associated advanced ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 23, p. 7165–7170, 1 dez. 2017.

BALASUNDARAM, A.; DOSS, C. G. P. Unraveling the Structural Changes in the DNA-Binding Region of Tumor Protein p53 (TP53) upon Hotspot Mutation p53 Arg248 by Comparative Computational Approach. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 24, 1 dez. 2022.

BARKAUSKAITE, E.; JANKEVICIUS, G.; AHEL, I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. **Molecular Cell**, v. 58, n. 6, p. 935–946, 18 jun. 2015.

BAVARO, L. et al. Mechanisms of Disease Progression and Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: An Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, 2 dez. 2019.

BENNETT, J. E. et al. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. **The Lancet**, v. 392, n. 10152, p. 1072–1088, 22 set. 2018.

BERTUCCI, F. et al. PARP1 expression in soft tissue sarcomas is a poor-prognosis factor and a new potential therapeutic target. **Molecular oncology**, v. 13, n. 7, p. 1577–1588, 1 jul. 2019.

BHOJWANI, D.; YANG, J. J.; PUI, C.-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 47, 1 fev. 2015.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 3233**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

BULK, J. VAN DEN; VERDEGAAL, E. M.; MIRANDA, N. F. DE. Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. **Open Biology**, v. 8, n. 6, 2018.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

BYRUM, A. K.; VINDIGNI, A.; MOSAMMAPARAST, N. Defining and Modulating “BRCAness”. **Trends in cell biology**, v. 29, n. 9, p. 740–751, 1 set. 2019.

CHAUDHURI, A. R.; NUSSENZWEIG, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610, 1 out. 2017.

COCCARO, N. et al. Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, 2 jun. 2019.

COHEN-ARMON, M. et al. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. **Molecular cell**, v. 25, n. 2, p. 297–308, 26 jan. 2007.

D’ANDREA, A. D. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. **DNA Repair**, v. 71, p. 172–176, 1 nov. 2018.

DA SILVA, F. F.; LATORRE, M. DO R. DE O. Sobrevida das leucemias linfoides agudas em crianças no Município de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, 23 mar. 2020.

DALLE, I. A. et al. Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2019.

DASOVICH, M. et al. Identifying poly(ADP-ribose)-binding proteins with photoaffinity-based proteomics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 143, n. 8, p. 3037, 3 mar. 2021.

DEANGELO, D. J.; JABBOUR, E.; ADVANI, A. Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. **American Society of Clinical Oncology educational**

book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, v. 40, n. 40, p. 330–342, maio 2020.

DEFILIPP, Z. et al. Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Updated 2019 Evidence-Based Review from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 2113–2123, 1 nov. 2019.

DEMIN, A. A. et al. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair. **Molecular Cell**, v. 81, n. 14, p. 3018, 7 jul. 2021.

DONIZY, P. et al. Up-Regulation of PARP1 Expression Significantly Correlated with Poor Survival in Mucosal Melanomas. **Cells**, v. 9, n. 5, 5 maio 2020.

EL-KHAMISY, S. F. et al. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 19, p. 5526–5533, 1 out. 2003.

EL FAKIH, R. et al. Current paradigms in the management of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia in adults. **American journal of hematology**, v. 93, n. 2, p. 286–295, 1 fev. 2018.

ELEAZER, R.; FONDUFE-MITTENDORF, Y. N. The multifaceted role of PARP1 in RNA biogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, v. 12, n. 2, 1 mar. 2021.

ENGELAND, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. **Cell death and differentiation**, v. 29, n. 5, p. 946–960, 1 maio 2022.

FARAONI, I. et al. **Targeting ADP-ribosylation by PARP inhibitors in acute myeloid leukaemia and related disorders. Biochemical Pharmacology**, 1 set. 2019.

FERRARIS, D. V. Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4561–4584, 24 jun. 2010.

FISCHBACH, A. et al. The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by PARP1. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 2, p. 804, 1 jan. 2018.

FISHER, A. E. O. et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 15, p. 5597–5605, 1 ago. 2007.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 12, p. 1749, 1 dez. 2019.

FRITZ, C. et al. PARP goes the weasel! Emerging role of PARP inhibitors in acute leukemias. **Blood Reviews**, v. 45, p. 100696, 1 jan. 2021.

FUJITA, T. C. et al. Acute lymphoid leukemia etiopathogenesis. **Molecular biology reports**, v. 48, n. 1, p. 817–822, 1 jan. 2021.

GAUDICHON, J. et al. Mechanisms of extramedullary relapse in acute lymphoblastic leukemia: Reconciling biological concepts and clinical issues. **Blood reviews**, v. 36, p. 40–56, 1 jul. 2019.

GIANSANTI, C. et al. MDM2 binds and ubiquitinates PARP1 to enhance DNA replication fork progression. **Cell Reports**, v. 39, n. 9, p. 110879, 31 maio 2022.

GIBSON, B. A.; KRAUS, W. L. **New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs**. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nat Rev Mol Cell Biol, , jul. 2012.

GILBERT, M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. **PloS one**, v. 9, n. 8, 21 ago. 2014.

GUAN, H. et al. Correlations between Epstein-Barr virus and acute leukemia. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 8, p. 1453–1460, 1 ago. 2017.

HAJDU, S. I.; VADMAL, M. A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6. **Cancer**, v. 119, n. 23, p. 4058–4082, 2013.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HOY, S. M. Talazoparib: First Global Approval. **Drugs**, v. 78, n. 18, p. 1939–1946, 1 dez. 2018.

HU, W. et al. UBE2S promotes the progression and Olaparib resistance of ovarian cancer through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Journal of Ovarian Research**, v. 14, n. 1, p. 121, 1 dez. 2021.

HUNGER, S. P.; MULLIGHAN, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 16, p. 4939–5015, 19 nov. 2015.

INABA, H.; MULLIGHAN, C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 11, p. 2524, 11 nov. 2020.

IRENO, I. C. et al. Modulation of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor response and DNA recombination in breast cancer cells by drugs affecting endogenous wild-type p53. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 10, p. 2273–2282, 1 out. 2014.

ISON, G. et al. FDA approval summary: Niraparib for the maintenance treatment of patients with recurrent ovarian cancer in response to platinum-based chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 17, p. 4066–4071, 1 set. 2018.

JABBOUR, E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517–2528, 1 ago. 2015.

JABBOUR, E. et al. Chemoimmunotherapy with inotuzumab ozogamicin combined with mini-hyper-CVD, with or without blinatumomab, is highly effective in patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first salvage. **Cancer**, v. 124, n. 20, p. 4044–4055, 15 out. 2018.

JASRA, S.; ANAMPA, J. Anthracycline Use for Early Stage Breast Cancer in the

Modern Era: a Review. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 19, n. 6, p. 30, 11 jun. 2018.

JEHA, S. et al. Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 35, p. 3377, 12 dez. 2019.

JIANG, X. et al. Current status and future prospects of PARP inhibitor clinical trials in ovarian cancer. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 4371–4390, maio 2019.

JIAO, Q. et al. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 36, 19 dez. 2018.

JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, v. 43, p. 87–100, 2016.

KANAI, M. et al. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation). **Nature cell biology**, v. 9, n. 10, p. 1175–1183, out. 2007.

KANSAGRA, A.; DAHIYA, S.; LITZOW, M. **Continuing challenges and current issues in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia and Lymphoma** Taylor and Francis Ltd, , 4 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2017.1335397>>. Acesso em: 29 abr. 2020

KANTARJIAN, H. M. et al. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 547–561, 2000.

KAPPES, F. et al. DEK Is a Poly(ADP-Ribose) Acceptor in Apoptosis and Mediates Resistance to Genotoxic Stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 10, p. 3245, 15 maio 2008.

KARIMIANI, E. G. et al. Single-cell analysis of K562 cells: an imatinib-resistant subpopulation is adherent and has upregulated expression of BCR-ABL mRNA and protein. **Experimental hematology**, v. 42, n. 3, p. 183- 191.e5, 2014.

KASSNER, I. et al. SET7/9-dependent methylation of ARTD1 at K508 stimulates poly-ADP-ribose formation after oxidative stress. **Open biology**, v. 3, n. 10, 2 out. 2013.

KC, R. et al. BCR-Abl Silencing by siRNA: A Potent Approach to Sensitize Chronic Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy. **Stem cells and development**, v. 28, n. 11, p. 734–744, 1 jun. 2019.

KENNEDY, L. B.; SALAMA, A. K. S. A review of cancer immunotherapy toxicity. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 2, p. 86–104, 1 mar. 2020.

KIM, G. et al. FDA approval summary: Olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 19, p. 4257–4261, 1 out. 2015.

KOO, N.; SHARMA, A. K.; NARAYAN, S. Therapeutics Targeting p53-MDM2

Interaction to Induce Cancer Cell Death. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, 1 maio 2022.

KRAUS, W. L.; HOTTIGER, M. O. PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1109–1123, 1 dez. 2013.

KRIETSCH, J. et al. Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 6, p. 1066–1087, 1 dez. 2013.

KUMAR, A.; VASHIST, M.; RATHEE, R. Maternal factors and risk of childhood leukemia. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 2, p. 781–784, 2014.

KUN, E. et al. Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3, and ATP. **Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 210–216, 13 jan. 2004.

KUTUZOV, M. M. et al. Impact of PARP1, PARP2 & PARP3 on the Base Excision Repair of Nucleosomal DNA. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1241, p. 47–57, 2020.

LAFARGUE, C. J. et al. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors. **The Lancet. Oncology**, v. 20, n. 1, p. e15, 1 jan. 2019.

LANGELIER, M.-F. et al. Crystal Structures of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10690–10701, 25 mar. 2011.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 188–196, 5 set. 2018.

LEUNG, A. K. L. **Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture**. **Journal of Cell Biology** Rockefeller University Press, , 2014.

LIU, L. et al. The key players of parthanatos: opportunities for targeting multiple levels in the therapy of parthanatos-based pathogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences** **2022 79:1**, v. 79, n. 1, p. 1–15, 9 jan. 2022.

LOCATELLI, F. et al. Effect of Blinatumomab vs Chemotherapy on Event-Free Survival Among Children With High-risk First-Relapse B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 325, n. 9, p. 843, 3 mar. 2021.

LOMBARD, A. P. et al. Overexpressed ABCB1 Induces Olaparib-Taxane Cross-Resistance in Advanced Prostate Cancer. **Translational Oncology**, v. 12, n. 7, p. 871, 1 jul. 2019.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. BRCAness revisited. **Nature reviews. Cancer**, v. 16, n. 2, p. 110–120, 1 fev. 2016.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. **PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic**. **Science**American Association for the Advancement of Science, , 17 mar. 2017.

LUCA, D. C. Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 41, n. 3, p. 405–416, 1 set. 2021.

LUPEY-GREEN, L. N. et al. PARP1 Stabilizes CTCF Binding and Chromatin Structure To Maintain Epstein-Barr Virus Latency Type. **Journal of virology**, v. 92, n. 18, 15 set. 2018.

MA, Y. et al. Treatment Selection for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors. **Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 81–93, 1 out. 2019.

MACHADO, C. B. et al. PARP Inhibitors as Therapeutic Options for Tyrosine Kinase-dependent Leukemia: A Review. **Anticancer Research**, v. 40, n. 6, p. 3055–3063, 2 jun. 2020.

MACHADO, C. B. et al. Kinase Inhibition in Relapsed/Refractory Leukemia and Lymphoma Settings: Recent Prospects into Clinical Investigations. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1604, 2 out. 2021.

MADARIAGA, A. et al. Manage wisely: poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor (PARPi) treatment and adverse events. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 30, n. 7, p. 903, 1 jul. 2020.

MAN, L. M.; MORRIS, A. L.; KENG, M. New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. **Current hematologic malignancy reports**, v. 12, n. 3, p. 197–206, 1 jun. 2017.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 25 set. 2015.

MARTINO, M. et al. A Review of Clinical Outcomes of CAR T-Cell Therapies for B-Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–18, 2 fev. 2021.

MATEO, J. et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 9, p. 1437, 1 set. 2019.

MCCANN, K. E.; HURVITZ, S. A. **Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. Drugs in Context**Bioexcel Publishing LTD, , 8 ago. 2018.

MERLI, P. et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current hematologic malignancy reports**, v. 14, n. 2, p. 94–105, 15 abr. 2019.

MISHRA, S. et al. Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells. **Cancer research**, v. 66, n. 10, p. 5387–5393, 15 maio 2006.

MORGAN, S. M. et al. The three-dimensional structure of Epstein-Barr virus genome varies by latency type and is regulated by PARP1 enzymatic activity. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 187, 17 jan. 2022.

MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2012, p. 389–396, 2012.

MURAI, J. et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5588–5599, 1 nov. 2012.

MURAI, J. et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 433–443, fev. 2014.

NCCN GUIDELINES FOR PATIENTS. **Acute Lymphoblastic Leukemia**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1

NGUYEN, A. et al. Highly variable cancer subpopulations that exhibit enhanced transcriptome variability and metastatic fitness. **Nature Communications** 2016 **7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 maio 2016.

NIEBOROWSKA-SKORSKA, M. et al. Rac2-MRC-cllI-generated ROS cause genomic instability in chronic myeloid leukemia stem cells and primitive progenitors. **Blood**, v. 119, n. 18, p. 4253, 5 maio 2012.

NOGUEIRA, B. M. D. et al. PAPEL DO GENE BCR-ABL NO PROCESSO LEUCEMOGÊNICO. In: **Medicina e Biomedicina 2**. [s.l.] Atena Editora, 2019. v. 2p. 153–167.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAR, p. 245, 22 mar. 2018.

O'CONNOR, L. O. et al. The PARP Inhibitor AZD2461 Provides Insights into the Role of PARP3 Inhibition for Both Synthetic Lethality and Tolerability with Chemotherapy in Preclinical Models. **Cancer research**, v. 76, n. 20, p. 6084–6094, 15 out. 2016.

OTHMAN, T. et al. Clinical experience with frontline Hyper-CVAD-based regimens, including Hyper-CVAD plus ponatinib, in patients with acute lymphoblastic leukemia treated at a comprehensive cancer center. **Leukemia Research**, v. 119, p. 106885, 1 ago. 2022.

PAGLIARINI, R.; SHAO, W.; SELLERS, W. R. Oncogene addiction: pathways of therapeutic response, resistance, and road maps toward a cure. **EMBO Reports**, v. 16, n. 3, p. 280, mar. 2015.

PALLA, V. V. et al. gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1–11, 1 mar. 2017.

PASCAL, J. M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. **DNA repair**, v. 71, p. 177, 1 nov. 2018.

PEHLIVAN, K. C.; DUNCAN, B. B.; LEE, D. W. CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. **Current hematologic malignancy reports**, v. 13, n. 5, p. 396–406, 1 out. 2018.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 272, 1 out. 2018.

PILLAY, N. et al. DNA replication stress and emerging prospects for PARG inhibitors in ovarian cancer therapy. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 163, p. 160–170, 1 ago. 2021.

PORTUGAL, R. et al. Daunorubicin 90 mg/m² in Acute Myeloid Leukemia Induction: Increased Toxicity in Young Patients. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 527–531, 1 ago. 2017.

PUI, C.-H. et al. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Prophylactic Cranial Irradiation. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 26, p. 2730, 6 jun. 2009.

RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 60, n. 11, p. 2606–2621, 19 set. 2019.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, set. 2012.

REIS, R. D. S. et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 33, n. 2, p. 83–93, 17 fev. 2016.

RIES, L. A. G. . et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995. **National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub. No. 99-4649. Bethesda, MD, 1999.**

ROLLI, V. et al. Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. **Biochemistry**, v. 36, n. 40, p. 12147–12154, 7 out. 1997.

RUF, A. et al. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. **Journal of molecular biology**, v. 278, n. 1, p. 57–65, 24 abr. 1998.

SAINI, L.; BRANDWEIN, J. New Treatment Strategies for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 12, n. 2, p. 136–142, 1 abr. 2017.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 maio 2008.

SCHMITZ, R. et al. Burkitt Lymphoma Pathogenesis and Therapeutic Targets from Structural and Functional Genomics. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 116, 10 out. 2012.

SHAGO, M. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1541, p. 257–278, 2017.

SHAH, B. D. et al. KTE-X19 anti-CD19 CAR T-cell therapy in adult relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia: ZUMA-3 phase 1 results. **Blood**, v. 138, n. 1, p. 11–22, 8 jul. 2021.

SHANNON-LOWE, C.; RICKINSON, A. B.; BELL, A. I. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1732, 10 out. 2017.

SKELDING, K. A.; LINCZ, L. F. PARP Inhibitors and Haematological Malignancies—Friend or Foe? **Cancers 2021, Vol. 13, Page 5328**, v. 13, n. 21, p. 5328, 23 out. 2021.

SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, v. 34, n. 5–6, p. 360, 3 mar. 2020.

SLUPIANEK, A. et al. BCR/ABL stimulates WRN to promote survival and genomic instability. **Cancer research**, v. 71, n. 3, p. 842, 2 fev. 2011.

SPIEGEL, J. O.; VAN HOUTEN, B.; DURRANT, J. D. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition. **DNA Repair**, v. 103, p. 103125, 1 jul. 2021.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 15 dez. 2015.

SUN, Y. et al. Mechanism underlying tumorigenesis induced by Bcr-Abl oncogene and A-MuLV virus. **Chinese journal of biotechnology**, v. 34, n. 12, p. 1943–1952, 25 dez. 2018.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 1 maio 2021.

TACIAK, B. et al. Wnt signaling pathway in development and cancer. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 69, n. 2, p. 185–196, 1 abr. 2018.

TAYLOR, K. N.; ESKANDER, R. N. PARP inhibitors in epithelial ovarian cancer. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 145–158, 5 dez. 2017.

TELONI, F.; ALTMAYER, M. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 3, p. 993, 2 fev. 2016.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. e577, 30 jun. 2017.

TIAN, X. et al. Adverse Event Profiles of PARP Inhibitors: Analysis of Spontaneous Reports Submitted to FAERS. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 25 mar. 2022.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 49–53, 1998.

VARGAS, T.; APETOH, L. Danger signals: Chemotherapy enhancers? **Immunological reviews**, v. 280, n. 1, p. 175–193, 1 nov. 2017.

VEERMAN, A. J. et al. Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the prospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997-2004). **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 10, p. 957–966, out. 2009.

VROOMAN, L. M.; SILVERMAN, L. B. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances. **Current hematologic malignancy reports**, v. 11, n. 5, p. 385–394, 1 out. 2016.

VYAS, S.; CHANG, P. New PARP targets for cancer therapy. **Nature reviews**.

Cancer, v. 14, n. 7, p. 502, 2014.

WANG, L. et al. **PARP1 in carcinomas and PARP1 inhibitors as antineoplastic drugs. International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 out. 2017.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)**, v. 2, n. 2, p. 141, 2019.

WASSING, I. E.; ESASHI, F. RAD51: Beyond the break. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 113, p. 38, 1 maio 2021.

WATKINS, J. A. et al. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 16, n. 3, p. 211, 3 jun. 2014.

WEST, Z. E. et al. Quantifying the difference in risk of adverse events by induction treatment regimen in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 62, n. 4, p. 899, 2021.

WOLFE, D. et al. Visualizing genomic information across chromosomes with PhenoGram. **BioData Mining**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 16 out. 2013.

XIAO, G. et al. Gain-of-Function Mutant p53 R273H Interacts with Replicating DNA and PARP1 in Breast Cancer. **Cancer research**, v. 80, n. 3, p. 394, 2 fev. 2020.

YAMAMOTO, T. M. et al. Activation of Wnt signaling promotes olaparib resistant ovarian cancer. **Molecular carcinogenesis**, v. 58, n. 10, p. 1770, 1 out. 2019.

ZANDARASHVILI, L. et al. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. **Science**, v. 368, n. 6486, p. eaax6367, 2020.

ZHANG, Y. et al. The impact of R213 mutation on p53-mediated p21 activity. **Biochimie**, v. 99, n. 1, p. 215–218, abr. 2014.

ZHAO, H. et al. PARP1- and CTCF-Mediated Interactions between Active and Repressed Chromatin at the Lamina Promote Oscillating Transcription. **Molecular cell**, v. 59, n. 6, p. 984–997, 17 set. 2015.

ZHAO, W. et al. The BRCA Tumor Suppressor Network in Chromosome Damage Repair by Homologous Recombination. **Annual review of biochemistry**, v. 88, p. 221–245, 20 jun. 2019.

ZHOU, Y. et al. Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105299, 1 jan. 2021.

ZUO, W. W. et al. High Expression of PARP1 in Tumor and Stroma Cells Predicts Different Prognosis and Platinum Resistance in Patients With Advanced Epithelial Ovarian Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 12, 7 jul. 2022.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO TRANSLACIONAL DA ENZIMA POLI-ADP-RIBOSE POLIMERASE-1 (PARP1) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA BCR-ABL p190+

Pesquisador: Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 52596421.6.0000.5054

Instituição Proponente: Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.207.521

Apresentação do Projeto:

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é um distúrbio clonal de células hematopoiéticas que pode apresentar diversos tipos de alterações genéticas. Um grande desafio da oncohematologia, é o manejo clínico de pacientes com LLA que, mesmo quando tratados, apresentam taxas de sobrevida em torno de 40%. A questão central é que um dos principais fatores envolvidos na baixa sobrevida está relacionado a uma genética desfavorável, como o subtipo BCR-ABL p190+ frequente na nossa população de estudo, e que não respondem aos tratamentos clássicos com inibidores de tirosinaquinase disponíveis no mercado. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostram que a enzima Poli-ADP-Ribose Polimerase (PARP) se apresenta hiperexpressa em neoplasias hematológicas, e neste contexto a terapia pode abranger o uso de inibidores de PARP, que já mostram a eficácia terapêutica em diversos tipos tumorais. Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial de inibição de PARP como terapia para o tratamento LLA BCR-ABL p190+. Assim, acredita-se que o estudo da via de inibição da enzima PARP pode ser um potencial alvo terapia para LLA BCR-ABL p190+ sendo capaz de limitar a viabilidade das células leucêmicas desta malignidade, assim como diminuir a expressão do marcador tumoral BCR-ABL p190+ em amostras de pacientes. Para testagem da hipótese, serão utilizadas linhagens representativas de LLA, sendo estas avaliadas após o tratamento com o fármaco inibidor Olaparib. Adicionalmente serão geradas células com o silenciamento genético da PARP através da técnica de edição gênica

Continuação do Parecer: 5.207.521

CRISPR/Cas9, derivadas das linhagens, para confirmação do envolvimento desta via na hipótese. Por fim, para validação experimental, células de medula óssea de pacientes serão utilizadas para o desenvolvimento de cultivo celular primário, no intuito de identificar a presença da expressão do alvo molecular PARP e para testagem de inibição farmacológica deste alvo proposto principalmente em pacientes BCR-ABL p190+.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial de inibição da enzima Poli-ADP-Ribose Polimerase (PARP1) em modelos experimentais e clínicos de leucemia linfoblástica aguda como potencial terapia para pacientes de subtipo BCR-ABL p190+.

Objetivo Secundário:

Caracterizar a expressão gênica da enzima PARP1 em modelos in vitro de leucemia linfoblástica aguda; Avaliar o efeito fenotípico e farmacológico de inibidores seletivos da PARP1 em linhagens de leucemia linfoblástica aguda Jurkat (LLA-T) e SUP-B15 (BCR-ABL p190+);

Desenvolver linhagens modelo derivadas do silenciamento genético da via PARP através da técnica de edição gênica CRISPR para avaliação do envolvimento desta via exclusivamente na leucemogênese;

Analisar e validar a expressão gênica da enzima PARP1 em amostras de pacientes com LLA de subtipo BCR-ABL p190+;

Desenvolver cultivo primário derivado de amostras de medula óssea de pacientes LLA de subtipo BCR-ABL p190+ para validação experimental in vitro da inibição farmacológica da via PARP1.

Propor a enzima PARP1 como um potencial alvo terapêutico para pacientes com LLA de subtipo BCR-ABL p190+.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos relacionados à coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer dor leve e formação de mancha roxa no local por pequena saída de

sangue mancha arroxeadada (equimose) ao redor do local da punção, a qual desaparece em poucos dias.

Excepcionalmente, pode ocorrer

sangramento local e, raramente, infecção local. É importante salientar que uma nova coleta deste

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 5.207.521

materiais pode ser necessária, em poucos casos,
se a amostra for insuficiente ou inadequada para análise

Benefícios:

A participação no estudo é voluntária, não existindo nenhuma remuneração para os participantes. Seu seguimento ambulatorial e seu tratamento será conduzido da mesma forma independente da participação nessa pesquisa. Os benefícios oferecidos por esta pesquisa incluem a determinação do perfil das Leucemias Agudas em adultos (câncer no sangue) no Ceará. Esses resultados contribuirão para o desenvolvimento de métodos diagnósticos (métodos capazes de identificar sua doença), terapias farmacológicas (tratamento com novos medicamentos) e para o entendimento dos pacientes acometidos com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (câncer no sangue). Suas dúvidas quanto à sua doença e a pesquisa serão respondidas a qualquer momento pela equipe responsável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa adequada, todos os riscos foram apresentados e são baixos para os participantes da pesquisa e seus resultados contribuirão para o desenvolvimento de métodos diagnósticos, terapias farmacológicas e para o entendimento dos pacientes acometidos com Leucemia Linfóide Aguda (LLA).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos avaliados e adequados. TCLE ADEQUADO.

Recomendações:

SEM RECOMENDAÇÕES ADICIONAIS A PESQUISA, METODOLOGIA ADEQUADA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDÊNCIAS, PROJETO ADEQUADO QUANTO A DESCRIÇÃO DE RISCOS E BENEFÍCIOS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	15/10/2021		Aceito

ANEXO B – ARTIGOS GERADOS

Review

PARP Inhibitors as Therapeutic Options for Tyrosine Kinase-dependent Leukemia: A Review

CAIO BEZERRA MACHADO, EMERSON LUCENA DA SILVA, MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO,
MARIA ELISABETE AMARAL DE MORAES and CAROLINE AQUINO MOREIRA-NUNES

*Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM),
Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil*

Abstract. *The idea of utilizing poly-ADP-ribose polymerase inhibitors (PARPi) as therapeutics for cancer has grown in popularity since its original approval for clinical usage in treatment of BRCA DNA repair-associated-mutated ovarian cancer. In this study, we evaluated experimental data regarding in vitro studies utilizing PARPi as a treatment for tyrosine kinase (TK)-dependent leukemia. Studies from 2015 to 2019 were compiled and the ones with most relevant TK pathways and PARP inhibition were analyzed. PARPi showed activity against many leukemia cell lines and samples from patients with primary leukemia, especially when combined with other signaling pathway inhibitor drugs, improving upon the hypothesis that the utilization of PARPi has potential as a new therapeutic approach in treatment of primary leukemia and TK-dependent leukemia.*

The term ‘leukemia’ is used to represent a cohort of hematopoietic malignancies in which a deregulation of the production of mature leukocytes and their precursors is present. Leukemia is one of the most common types of cancer involving pediatric patients in the world, and its distribution may be associated with a wide array of factors such as socioeconomic status and ethnicity (1, 2).

Even though in recent years the treatment of different leukemia subtypes has steadily advanced, there are still many obstacles to overcome. As an example, the occurrence of therapy-related neoplasms is highly associated with exposure to conventional chemotherapy for primary leukemia. Moreover, the development of multidrug resistance in cancer

cells may occur even after few chemotherapy cycles and is considered to be one of the main challenges in leukemia treatment (3-5).

Conventional oncology therapies with cytotoxic agents still has its limitations and has shown itself to be ineffective when treating many malignancies by causing patients side-effects. Knowing that, it is of the utmost importance in oncology to strive always for innovation in the search for new pathways and targeted molecular therapies to improve prognosis and quality of life for patients with neoplasms (6, 7).

The development of targeted molecular therapies has completely changed the dynamics in the treatment of most neoplasms, being less toxic and more effective alternatives than conventional chemotherapy (8).

Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) Activity and Clinical Usage

The inhibition of PARP is becoming more popular as a target in the treatment of BRCA1/2 DNA repair-associated (BRCA1/2)-deficient tumors that present defects in the homologous recombination (HR) repair pathway (9).

The PARP family is composed of 17 enzymes with different functions in the cellular matrix, however, PARP1 is primarily the one responsible for DNA damage repair (DDR) activity attributed to these enzymes and, therefore, is the main target in molecular therapies utilizing PARP inhibitors (PARPi) in the treatment of cancer. The mechanism of action of PARP1 is related to its capacity to execute post-translation modifications of proteins through the addition of PARP chains, inducing structural and functional changes in a process called PARylation (10, 11).

PARP1 possesses three zinc-finger domains, two of which are responsible for recognizing and binding the enzyme to DNA (Figure 1A). When genetic damage is identified, PARP1 auto-PARylates and signals for the recruitment of other enzymes which initializes the DDR mechanism. Before

Correspondence to: Caroline Aquino Moreira-Nunes, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo st, n 1000, Rodolfo Teófilo, CEP: 60416-000 Fortaleza, CE, Brazil. Tel: +55 8533668033, e-mail: carolfam@gmail.com

Key Words: Leukemia, PARP inhibitors, tyrosine kinase, review.

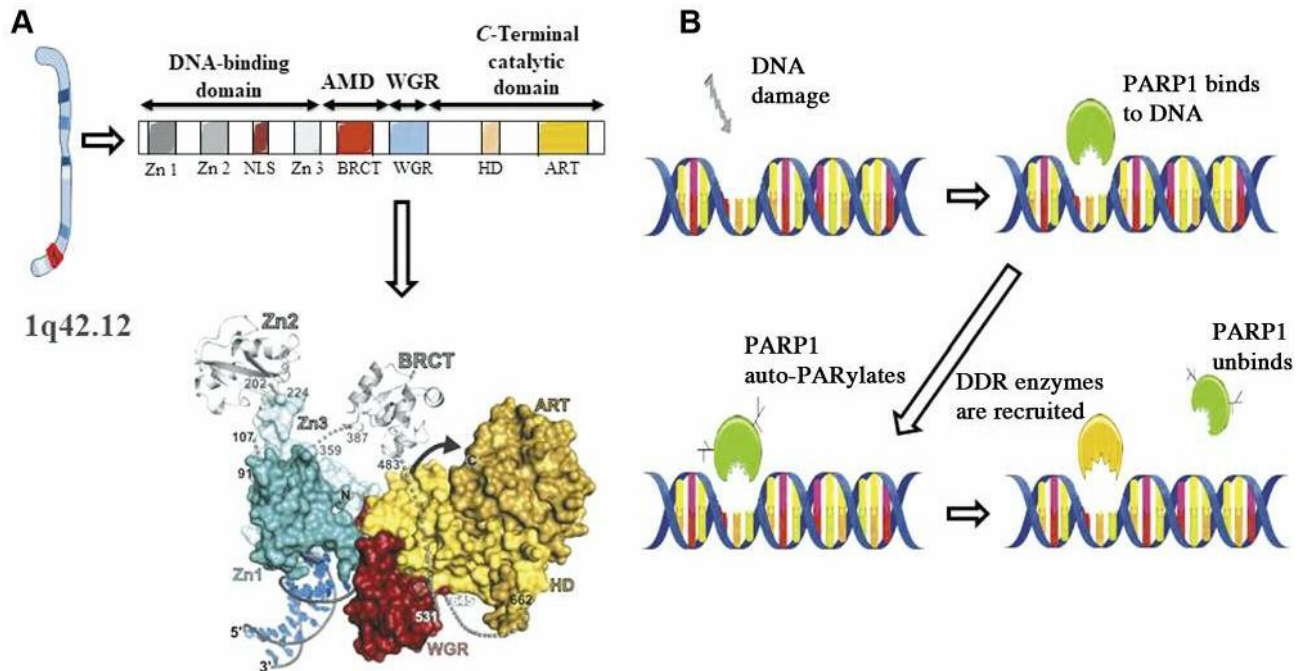


Figure 1. Poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) structure and DNA-repair mechanism. A: Representation of PARP1 structure and functioning domains. Zn1: Zinc-finger 1; Zn2: Zinc-finger 2; NLS: nuclear localization signal; Zn3: Zinc-finger 3; AMD: auto-modification domain; BRCT: breast-cancer-susceptibility protein carboxy terminus; HD: helical subdomain; ART: ADP-ribosyl transferase subdomain. B. Multifactorial DNA damage generates single-strand breaks which are then recognized by PARP1. After binding, PARP1 auto-PARylates, signaling for the recruitment of proteins involved in the repairing mechanism. PARP1 unbinds from DNA due to charge repulsion and DNA damage-repair (DDR) enzymes initiate the repair.

DDR initiation, PARP1 unbinds from the DNA due to accumulation of negative charges from the PARP chains and the PARylation process is reverted, returning PARP1 to its original conformation (Figure 1B) (12-14).

PARPi in treatment of neoplasms represents the first ever clinical application of the synthetic lethality concept, which describes cell death when a series of intrinsic and extrinsic cell factors are activated through pharmacological manipulation (15). PARP1 is responsible for signaling the repair of single-strand breaks in DNA, therefore, its inhibition induces escalation of these injuries and conversion into double-strand breaks. Tumors which are deficient in HR mechanism, such as BRCA1/2-deficient tumors, are unable to effectively repair double-strand breaks and are induced to undergo apoptosis when treated with PARPi as a consequence (16, 17).

Another means through which PARPi exerts cytotoxicity is by forming insoluble PARP–DNA complexes, in a process known as PARP trapping. When PARP binds to DNA and is unable to be released, the DDR mechanisms are unable to bind and act on that sequence, impairing DNA repair and inducing genetic damage. Some PARPi agents are more efficient than others in binding PARP to DNA, and some even induce PARP release; this difference in their activity has no direct correlation with their capability of inhibiting PARylation itself (18-20).

The current usage of PARPi in clinical practice is still restricted to treatment of solid tumors and most indications for their use revolve around treatment of BRCA-mutated tumors (21). However, a series of recent experimental and clinical studies demonstrated that PARPi may also be useful when treating a great variety of leukemia subtypes and related diseases that may present other mutation categories, without damage to the DDR mechanism. Even though experimental evidence attests the efficacy of these drugs, their antitumor mechanism has not been fully elucidated in many of the leukemia subtypes in which they are active (22).

Tyrosine Kinases and Carcinogenesis

TKs are a large protein family that is involved in a variety of cellular signaling pathways and other survival and replication mechanism in a way that grants them a major role in the carcinogenesis of many tumor type (Figure 2). Approximately 100 TKs have been characterized in the human genome and are divided into receptor TKs, these being proteins with transmembrane domains, and non-receptor TKs, characterized as being cytoplasmic or nuclear proteins (23-25).

The first TK inhibitor (TKI) to be approved as a therapeutic in neoplasms was designated for the treatment of chronic

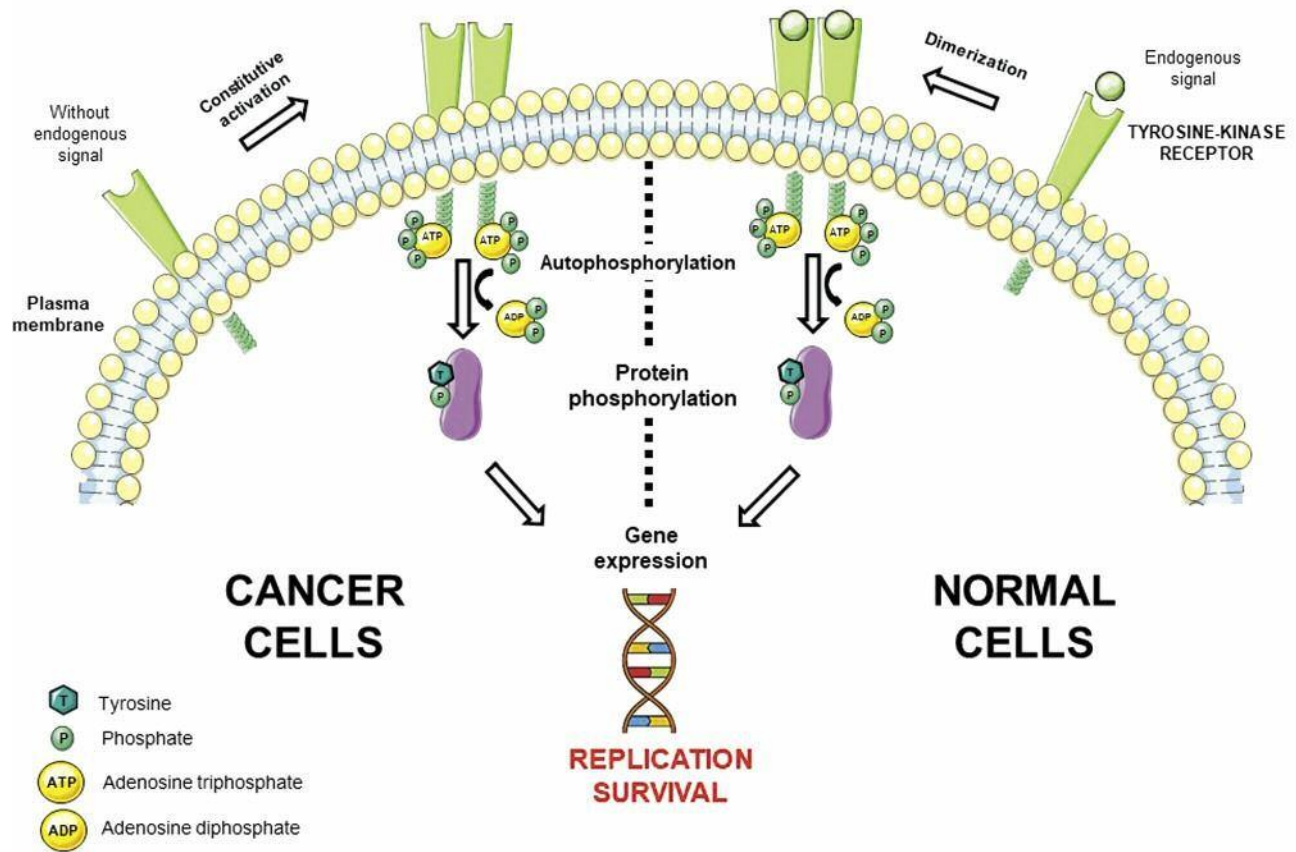


Figure 2. Tyrosine-kinase signaling pathway. Tyrosine-kinase mutations may induce constitutive activation or overexpression in cancer cells, leading to signaling pathways deregulation and malignant cells replication and survival.

myeloid leukemia (CML) due to the high frequency of expression of the chimeric TK breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia (*BCR-ABL*) in this subtype. Currently, the roles of many TKs in carcinogenesis have been well characterized for other leukemia subtypes and are used as targets of inhibition for the treatment of neoplasms. The development of TKIs astoundingly changed the prognosis of patients suffering from TK-dependent leukemia by drastically increasing the rates of cure and overall survival (25-27).

However, malignant cells are easily mutated and the selective pressure exerted by treatment with TKIs usually results in emergence of resistant tumors, especially in relapsed leukemias. The mechanism involving resistance may vary depending on the drugs used and the leukemia subtype being treated with strategies to overcome resistance mostly consisting of increases in TKI dosage or utilization of second generation TKIs. Both strategies represent more risks to the patients, due to the increased drug toxicity, and will not necessarily provide a longer overall survival (28-31).

New Therapeutic Strategies

The development of alternative therapeutic approaches is extremely necessary in the goal of tackling the inevitable cases of resistance originated from the selective pressure of conventional and targeted therapies (32).

Even though some mechanisms remain to be elucidated, the utilization of PARPi has been shown to be a promising therapeutic strategy in the treatment of many leukemia subtypes (22). It is also important to note that some PARPi may have off-target effects beyond inhibition of PARylation and PARP trapping and may interfere directly with kinase activity pathways (33). In this review, we aimed to evaluate experimental data in the literature regarding *in vitro* studies utilizing PARPi as a treatment for TK-dependent leukemia.

Table I comprises a number of relevant studies from 2015 to 2019 reporting *in vitro* PARPi activity against leukemia cell lines and in samples of patients with different leukemia subtypes.

Table I. *In vitro* studies of poly-ADP-ribose polymerase inhibitors (PARPi) in leukemia cells and samples from patients described in the literature.

Leukemia	Genetic mutation	PARPi	Synergy	Mechanism	Cell lines	Reference
AML	<i>RUNX1-ETO</i> ; <i>cKIT</i> ; <i>CBFB-MYH11</i>	Olaparib	Avapritinib	Synthetic lethality by HR down-regulation	Kasumi-1; patient samples from primary AML	Nieborowska-Skorska <i>et al.</i> , 2019 (34)
MDS/CMML and AML	<i>ASXL1</i> ; <i>FLT3-ITD</i> ; <i>JAK2</i> ; <i>RUNX1</i>	Talazoparib	APE1 inhibitor III; decitabine	-	Bone marrow samples	Kohl <i>et al.</i> , 2019 (35)
DLBCL and T-ALL	<i>LMO2</i>	Olaparib	Doxorubicin	Synthetic lethality by DSB-induction in HR-deficient cells	VAL; OCI-LY8; OCI-LY19; DOHH2; MOLT16; MOLT4	Parvin <i>et al.</i> , 2019 (36)
CML	<i>BCR-ABL</i>	Talazoparib	Chloroquine	Inhibition of Talazoparib-induced autophagy	Peripheral blood from pediatric patients with CML	Liu <i>et al.</i> , 2019 (37)
CML	<i>BCR-ABL</i>	Perezone	-	Apoptosis through PARP1 inhibition and redox alterations	K562	Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> , 2019 (38)
MPN	<i>JAK2^{V617F}</i> ; <i>CALR</i>	Veliparib	Busulfan	Double-strand DNA breaks	SET2; HEL; HL-60; K562; patient blood samples	Patel <i>et al.</i> , 2019 (39)
AML	<i>RUNX1-ETO</i>	Olaparib	BMS; daunorubicin	PARylation, HR and NHEJ deregulation	KG1a; Kasumi-1	Li <i>et al.</i> , 2019 (40)
AML	<i>NPM1</i> ; <i>FLT3-ITD</i> ; <i>CEBPA</i> ; <i>DNMT3A</i> ; <i>IDH1</i> ; <i>IDH2</i>	Talazoparib	NL101	Impairment of cell cycle and apoptosis induction	Samples from patients with AML; MV4-11; MOLM-13; HL-60; Kasumi-1	Li <i>et al.</i> , 2018 (41)
CML	<i>BCR-ABL1</i>	Olaparib; talazoparib	5F02; imatinib	Accumulation of DSB	Samples from patients with CML	Nieborowska-Skorska <i>et al.</i> , 2019 (42)
CML	<i>BCR-ABL1</i>	Talazoparib	Imatinib	Accumulation of DSB	Samples from patients with CML	Podrzywalow-Bartnicka <i>et al.</i> , 2019 (43)
AML	<i>FLT3-ITD</i>	Olaparib; talazoparib	Quizartinib; gilteritinib; crenolanib	Accumulation of DSB and cell death induction	Patient samples from primary AML; MV-4-11; HL-60; REH; BaF3	Maifrede <i>et al.</i> , 2018 (44)
AML	<i>NPM1mutA</i> ; <i>FLT3-ITD</i>	Olaparib	-	Up-regulation of death receptors	Samples from patients with AML	Faraoni <i>et al.</i> , 2018 (45)
AML	<i>IDH1/2^{MUT}</i>	Olaparib; talazoparib	Daunorubicin	Down-regulation of AML level	Samples from patients with AML	Molenaar <i>et al.</i> , 2018 (46)
AML	<i>MLL-AF9</i>	Olaparib	5-Azacytidine; decitabine; doxorubicin	Increased DNA damage, cell-cycle arrest and increase in apoptosis	MML-AF9 murine leukemia cells; MOLM13	Zhao and So, 2017 (47)
AML and ALL	<i>MLL</i> ; <i>FLT3</i> ; <i>NPM1</i> ; <i>DNMT3A</i> ; <i>TP53</i> ; <i>ETV6-RUNX1</i>	Olaparib	AZD1775	Impairment of HR, increase in DNA damage and apoptosis	Jurkat; Molm13; MV4-11; REH; OCI-AML3; 32D	Garcia <i>et al.</i> , 2017 (48)
CML, AML and ALL	<i>TCF3-HLF</i>	Olaparib; veliparib	-	Impairment of HR and accumulation of DSB	MOLT3; Jurkat; NALM6; REH; RS4-11; Raji; Daudi; BV137; K562; MEG-01; KG-01; NB4; HL-60; ML-1; THP-1; U-937; Kasumi-1; CMK; HAL-01; YCUB-2; AR230	Piao <i>et al.</i> , 2017 (49)

Table I. *Continued*

Table I. *Continued*

Leukemia	Genetic mutation	PARPi	Synergy	Mechanism	Cell lines	Reference
AML	<i>FLT3-ITD</i>	Veliparib; talazoparib	Decitabine; 5-azacytidine	Increase in PARP trapping and DSB accumulation	Patient samples from primary AML; MV411; MOLM13; MOLM-14; KASUMI	Muvarak <i>et al.</i> , 2016 (50)
CML and ALL	<i>BCR-ABL TP53</i>	P10	SAHA	Accumulation of DSB, cell-cycle arrest and induced apoptosis	K562; MOLT4; Nalm6; REH	Hegde <i>et al.</i> , 2016 (51)
MPN	<i>JAK2^{V617F}; BRCA1; CHEK2; RAD50</i>	Veliparib; olaparib	-	Synthetic lethality by HR pathway dysfunction	Samples from patients with diverse MPN	Pratz <i>et al.</i> , 2017 (52)
AML	<i>RUNX1-ETO; PML-RARα; MLL-AF9</i>	Olaparib; veliparib	LiCl	Synthetic lethality by HR pathway dysfunction	Human primary AML cells; NB4-LR2; THP1; Kasumi-1; GP2; NIH3T3	Esposito <i>et al.</i> , 2015 (53)
ATLL	<i>p53</i>	PJ-34	-	Cell-cycle arrest, accumulation of DSB and reactivation of p53 pathways	Patient-derived ATLL cells; MT-4; MT-2; C8166; C91PL; MT-1; ATL-T; ED-40515(-); ALT-25; ATL-43T; KOB; ATL-55T	Bai <i>et al.</i> , 2015 (54)
AML and ALL	<i>NPM1; TP53</i>	Rucaparib	5FU	Increase in DNA damage and induction of apoptosis	OCI-AML2; RPMI-8402	Falzacappa <i>et al.</i> , 2015 (55)
AML	<i>FLT3; NPM1</i>	Olaparib	-	Increase in DNA damage	Patient samples from primary AML; HL-60; U937; NB4; HL-60R; OCI-AML2; OCI-AML3	Faraoni <i>et al.</i> , 2015 (56)

ALL: Acute lymphocytic leukemia; AML: acutemyeloid leukemia; ATALL: adult T-cell leukemia/lymphoma; CML: chronic myeloid leukemia; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma; DSB: double-strand break; HR: homologous recombination; MDS: myelodysplastic syndrome; MPN: myeloproliferative neoplasm; NHEJ: non-homologous end joining; PARP1: poly-ADP-ribose polymerase; TALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia.

PARPi Studies

Most studies that were found in the literature, reported the effects of combined therapy utilizing one of the inhibitors already used in clinical practice for treatment of solid tumors, alongside inhibitors of other cellular pathways and some TKIs (34-37, 39-44, 46-48, 50, 51, 53, 55). The most commonly described leukemia subtype was acute myeloid leukemia (AML) harboring mutations such as Runt-related transcription factor1-eight twenty-one (*RUNX1-ETO*) and fms-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) (34, 35, 40, 41, 44, 45, 48, 50, 53, 56).

While *RUNX1-ETO* AML cells displayed increased sensitivity to treatment with olaparib, when accompanied by *cKIT* mutation, these cell lines tended to lose this sensitivity

(34, 53). *RUNX1* is a well-known transcription factor involved in normal hematopoiesis and its mutation into *RUNX1-ETO* causes deficiency in BRCA1/2 status and deregulation of normal DDR pathways, conferring sensitivity to PARPi. However, *cKIT* mutations have experimentally been shown to restore tumor HR capacity, conferring increased resistance to treatment with PARPi that would benefit from synthetic lethality. This resistance was shown to be overcome when using a combination treatment with *cKIT*_{MUT} inhibitors (34, 53, 57, 58).

In regards to *FLT3-ITD* mutation, experimental data have shown low sensitivity to PARPi treatment as a monotherapy, while it was efficient when combined with *FLT3-ITD* inhibitors (44). This lack of sensitivity may be attributed to the capacity of *FLT3-ITD* mutation in restoring cellular HR activity through increased expression

of DNA-binding protein 51 (RAD51) (59-61). Garcia *et al.* also demonstrated that inhibition of other kinase pathways, such as WEE1-like protein kinase (WEE1), impaired HR in *FLT3-ITD*-mutated AML cells and synergized with PARPi treatment (48).

Studies analyzing cohorts of samples from patients with AML have demonstrated that high PARP1 expression in AML cells is related both to increased *FLT3-ITD* mutation rate (41), as well as reduced sensitivity to PARPi (56), indicating that the overexpression of PARP1 might be a potential predictive marker to the resistance to PARPi treatment in AML mediated by *FLT3-ITD* mutation, however further investigation is required on this topic. AML cell lines expressing no *FLT3-ITD* or relevant levels of PARP1 are still capable of resisting PARPi treatment through other mechanisms, such as the aforementioned overexpression of RAD51 (56).

Another TK found to have an important role in hematological malignancies is Janus kinase 2 (*JAK2*) harboring the point mutation V617F, which is often expressed in myeloproliferative neoplasms. Contrasting data found in the literature make it still unclear if *JAK2*^{V617F} cells are indeed sensitive or not to treatment with PARPi, more specifically to veliparib (39, 52). In a similar mechanism to that of *FLT3-ITD*, *JAK2*^{V617F} mutation is known to increase RAD51 expression and up-regulate HR activity, which would, in theory, reduce *JAK2*^{V617F} cell sensitivity to PARPi treatment (60).

One of the most common leukemia subtypes associated with TK dependence is CML as a result of its high BCR-ABL1 expression. Even though TKI development has greatly improved prognosis of patients with CML, cases of primary and secondary resistance are still reported in clinical practice and represent a major obstacle in treatment (62, 63). BCR-ABL mutations are known to deregulate cellular signaling pathways, down-regulating BRCA1 protein expression and consequentially inhibiting HR activity (64, 65).

In accordance with the concept of synthetic lethality, the utilization of different PARPi was able to inhibit growth of CML BCR-ABL cells *in vitro* mainly through increase in genomic instability and consequent apoptosis. This inhibitory activity was shown to be even more relevant when combined with different synergistic drugs (37, 38, 42). Liu *et al.* demonstrated that the utilization of chloroquine potentiated the activity of talazoparib in samples from patients with CML by inhibiting talazoparib-induced autophagy which may play a cytoprotective role in tumor cells (37). Moreover, Nieborowska-Skorska *et al.* demonstrated that a combination of NAD-like PARPi, such as olaparib and talazoparib, and non-NAD-like PARPi, as well as combination with the commonly used TKI imatinib, may potentiate NAD-like PARPi inhibitory activity against cell in samples from patients with CML (42).

In the above mentioned studies, as well as those described in Table I, the cytotoxicity of PARPi has been shown for different leukemia subtypes *in vitro*, especially when combined with other drugs capable of deregulating cellular signaling pathways and DDR mechanisms, reinforcing its capability for selectively killing malignant cells through synthetic lethality (66), and improving upon the hypothesis that their use has the potential to improve prognosis of many patients afflicted by TK-dependent leukemia.

Conclusion

The highly significant experimental data support the utilization of PARPi as a potential new therapeutic approach in the treatment of primary leukemia and TK-dependent leukemia through a series of different mechanisms, such as synthetic lethality, PARP trapping and synergy with other signaling pathway inhibitors. The confirmation of this evidence in clinical trials is needed in order to further improve upon this hypothesis.

Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

Authors' Contributions

Machado CB and Moreira-Nunes CA designed the study; Machado CB, Silva EL and Moreira-Nunes CA prepared the figures; Machado CB, Silva EL, Moraes-Filho MO, Moraes MEA and Moreira-Nunes CA wrote the article; Machado CB and Moreira-Nunes CA revised the final version. All Authors read and approved the final article.

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian funding agencies National Council of Technological and Scientific Development (CNPq; to ELS, MOMF, MEAM, CAMN).

References

- 1 Juliusson G and Hough R: Leukemia. *Prog Tumor Res* 43: 87-100, 2016. PMID: 27595359. DOI: 10.1159/000447076
- 2 Reis RDS, Santos MDO, De Camargo B, Oliveira JFP, Thuler LCS and Pombo-De-Oliveira MS: Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol* 33: 83-93, 2016. PMID: 26925506. DOI: 10.3109/08880018.2015.1130763
- 3 Kantarjian HM, Keating MJ and Freireich EJ: Toward the potential cure of leukemias in the next decade. *Cancer* 124: 4301-4313, 2018. PMID: 30291792. DOI: 10.1002/cncr.31669
- 4 McNerney ME, Godley LA and Le Beau MM: Therapy-related myeloid neoplasms: When genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer* 17: 513-527, 2017. PMID: 28835720. DOI: 10.1038/nrc.2017.60
- 5 Du Y and Chen B: Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia. *Drug Des Devel Ther* 11: 1255-1261, 2017. PMID: 28458519. DOI: 10.2147/DDDT.S134529

- 6 Kansagra A, Dahiya S and Litzow M: Continuing challenges and current issues in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 59: 526-541, 2018. PMID: 28604239. DOI: 10.1080/10428194.2017.1335397
- 7 Taylor KN and Eskander RN: PARP inhibitors in epithelial ovarian cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 13: 145-158, 2017. PMID: 29205122. DOI: 10.2174/1574892813666171204094822
- 8 Lee YT, Tan YJ and Oon CE: Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol* 834: 188-196, 2018. PMID: 30031797. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034
- 9 Francica P and Rottenberg S: Mechanisms of PARP inhibitor resistance in cancer and insights into the DNA damage response. *Genome Med* 10, 2018. PMID: 30593284. DOI: 10.1186/s13073-018-0612-8
- 10 McCann KE and Hurvitz SA: Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context* 7: 212540, 2018. PMID: 30116283. DOI: 10.7573/dic.212540
- 11 Gibson BA and Kraus WL: New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 411-424, 2012. PMID: 22713970. DOI: 10.1038/nrm3376
- 12 Leung AKL: Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture. *J Cell Biol* 205: 613-619, 2014. PMID: 24914234. DOI: 10.1083/jcb.201402114
- 13 Langelier MF, Planck JL, Roy S and Pascal JM: Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) zinc fingers bound to DNA: Structural and functional insights into DNA-dependent PARP1 activity. *J Biol Chem* 286: 10690-10701, 2011. PMID: 21233213. DOI: 10.1074/jbc.M110.202507
- 14 Wang L, Liang C, Li F, Guan D, Wu X, Fu X, Lu A and Zhang G: PARP1 in carcinomas and PARP1 inhibitors as antineoplastic drugs. *Int J Mol Sci* 18, 2017. PMID: 28991194. DOI: 10.3390/ijms18102111
- 15 Lord CJ and Ashworth A: PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 355: 1152-1158, 2017. PMID: 28302823. DOI: 10.1126/science.aam7344
- 16 D'Andrea AD: Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair* 71: 172-176, 2018. PMID: 30177437. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.021
- 17 Jiang X, Li W, Li X, Bai H and Zhang Z: Current status and future prospects of PARP inhibitor clinical trials in ovarian cancer. *Cancer Manag Res* 11: 4371-4390, 2019. PMID: 31191001. DOI: 10.2147/CMAR.S200524
- 18 Murai J, Huang SYN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S and Pommier Y: Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res* 72: 5588-5599, 2012. PMID: 23118055. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753
- 19 Murai J, Huang SYN, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, Morris J, Teicher B, Doroshow JH and Pommier Y: Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol Cancer Ther* 13: 433-443, 2014. PMID: 24356813. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0803
- 20 Zandarashvili L, Langelier M-F, Velagapudi UK, Hancock MA, Steffen JD, Billur R, Hannan ZM, Wicks AJ, Krastev DB, Pettitt SJ, Lord CJ, Talele TT, Pascal JM and Black BE: Structural basis for allosteric PARP1 retention on DNA breaks. *Science* 368: eaax6367, 2020. PMID: 32241924. DOI: 10.1126/science.aax6367
- 21 Min A and Im SA: PARP inhibitors as therapeutics: Beyond modulation of parylation. *Cancers* 12(2): 394, 2020. PMID: 32046300. DOI: 10.3390/cancers12020394
- 22 Faraoni I, Giansanti M, Voso MT, Lo-Coco F and Graziani G: Targeting ADP-ribosylation by PARP inhibitors in acute myeloid leukaemia and related disorders. *Biochem Pharmacol* 167: 133-148, 2019. PMID: 31028744. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.04.019
- 23 Kim M, Baek M and Kim DJ: Protein Tyrosine signaling and its potential therapeutic implications in carcinogenesis. *Curr Pharm Des* 23: 4226-4246, 2017. PMID: 28625132. DOI: 10.2174/1381612823666170616082125
- 24 Gross S, Rahal R, Stransky N, Lengauer C and Hoeflich KP: Targeting cancer with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 125: 1780-1789, 2015. PMID: 25932675. DOI: 10.1172/JCI76094
- 25 Fernandez S, Desplat V, Villacreces A, Guitart A V., Milpied N, Pigneux A, Vigon I, Pasquet JM and Dumas PY: Targeting tyrosine kinases in acute myeloid leukemia: Why, who and how? *Int J Mol Sci* 20(14): 3429, 2019. PMID: 31336846. DOI: 10.3390/ijms20143429
- 26 Zhou T, Medeiros LJ and Hu S: Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Curr Hematol Malig Rep* 13: 435-445, 2018. PMID: 30370478. DOI: 10.1007/s11899-018-0474-6
- 27 Fleuren EDG, Zhang L, Wu J and Daly RJ: The kinome "at large" in cancer. *Nat Rev Cancer* 16: 83-98, 2016. PMID: 26822576. DOI: 10.1038/nrc.2015.18
- 28 Rosti G, Castagnetti F, Gugliotta G and Baccarani M: Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukaemia: Which, when, for whom? *Nat Rev Clin Oncol* 14: 141-154, 2017. PMID: 27752053. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.139
- 29 Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q and Wang Y shan: Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer* 17: 36, 2018. PMID: 29455664. DOI: 10.1186/s12943-018-0801-5
- 30 Yan F, Al-Kali A, Zhang Z, Liu J, Pang J, Zhao N, He C, Litzow MR and Liu S: A dynamic N 6-methyladenosine methylome regulates intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cell Res* 28: 1062-1076, 2018. PMID: 30297871. DOI: 10.1038/s41422-018-0097-4
- 31 Liu L, Shi B, Wang X and Xiang H: Strategies to overcome resistance mutations of Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *Future Med Chem* 10: 343-356, 2018. PMID: 29347836. DOI: 10.4155/fmc-2017-0145
- 32 Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M and Kantarjian H: Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood* 125: 3236-3245, 2015. PMID: 25795921. DOI: 10.1182/blood-2014-10-605808
- 33 Antolin AA, Ameratunga M, Banerji U, Clarke PA, Workman P and Al-Lazikani B: The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors. *Sci Rep* 10: 2585, 2020. PMID: 32066817. DOI: 10.1038/s41598-020-59074-4
- 34 Nieborowska-Skorska M, Paietta EM, Levine RL, Fernandez HF, Tallman MS, Litzow MR and Skorski T: Inhibition of the mutated cKIT kinase in AML1-ETO-positive leukemia cells restores sensitivity to PARP inhibitor. *Blood Adv* 3: 4050-4054, 2019. PMID: 31816060. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000756
- 35 Kohl V, Flach J, Naumann N, Brendel S, Kleiner H, Weiss C, Seifarth W, Nowak D, Hofmann WK, Fabarius A and Popp HD: Antileukemic efficacy *in vitro* of talazoparib and APE1 inhibitor III combined with decitabine in myeloid malignancies. *Cancers* 11(10): 1493, 2019. PMID: 31623402. DOI: 10.3390/cancers11101493
- 36 Parvin S, Ramirez-Labrada A, Aumann S, Lu XQ, Weich N, Santiago G, Cortizas EM, Sharabi E, Zhang Y, Sanchez-Garcia I, Gentles AJ, Roberts E, Bilbao-Cortes D, Vega F, Chapman JR,

- Verdun RE and Lossos IS: LMO2 confers synthetic lethality to PARP inhibition in DLBCL. *Cancer Cell* 36: 237-249.e6, 2019. PMID: 31447348. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.07.007
- 37 Liu Y, Song H, Song H, Feng X, Zhou C and Huo Z: Targeting autophagy potentiates the anti-tumor effect of PARP inhibitor in pediatric chronic myeloid leukemia. *AMB Express* 9: 108, 2019. PMID: 31309361. DOI: 10.1186/s13568-019-0836-z
- 38 Hernández-Rodríguez M, Mendoza Sánchez PI, Macías Perez ME, Rosales Cruz E, Mera Jiménez E, Nicolás Vázquez MI and Miranda Ruvalcaba R: *In vitro* and computational studies showed that perezine inhibits PARP1 and induces changes in the redox state of K562 cells. *Arch Biochem Biophys* 671: 225-234, 2019. PMID: 31063714. DOI: 10.1016/j.abb.2019.05.002
- 39 Patel PR, Senyuk V, Rodriguez NS, Oh AL, Bonetti E, Mahmud D, Barosi G, Mahmud N and Rondelli D: Synergistic cytotoxic effect of busulfan and the PARP inhibitor veliparib in myeloproliferative neoplasms. *Biol Blood Marrow Transplant* 25: 855-860, 2019. PMID: 30615982. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.12.841
- 40 Li D, Luo Y, Chen X, Zhang LY, Wang T, Zhuang Y, Fan Y, Xu J, Chen Y and Wu L: NF- κ B and poly (ADP-ribose) polymerase 1 form a positive feedback loop that regulates DNA repair in acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Res* 17: 761-772, 2019. PMID: 30559256. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0523
- 41 Li X, Li C, Jin J, Wang J, Huang J, Ma Z, Huang X, He X, Zhou Y, Xu Y, Yu M, Huang S, Yan X, Li F, Pan J, Wang Y, Yu Y and Jin J: High PARP1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects. *EBioMedicine* 38: 47-56, 2018. PMID: 30472087. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.11.025
- 42 Nieborowska-Skorska M, Maifrede S, Ye M, Toma M, Hewlett E, Gordon J, Le BV, Sliwinski T, Zhao H, Piwocka K, Valent P, Tulin AV, Childers W and Skorski T: Non-NAD-like PARP1 inhibitor enhanced synthetic lethal effect of NAD-like PARP inhibitors against BRCA1-deficient leukemia. *Leuk Lymphoma* 60: 1098-1101, 2019. PMID: 30277116. DOI: 10.1080/10428194.2018.1520988
- 43 Podszycalowa-Bartnicka P, Maifrede S, Le BV, Nieborowska-Skorska M, Piwocka K and Skorski T: PARP1 inhibitor eliminated imatinib-refractory chronic myeloid leukemia cells in bone marrow microenvironment conditions. *Leuk Lymphoma* 60: 262-264, 2019. PMID: 29932782. DOI: 10.1080/10428194.2018.1471602
- 44 Maifrede S, Nieborowska-Skorska M, Sullivan-Reed K, Dasgupta Y, Podszycalowa-Bartnicka P, Le BV, Solecka M, Lian Z, Belyaeva EA, Nersesyan A, Machnicki MM, Toma M, Chatain N, Rydzanicz M, Zhao H, Jelinek J, Piwocka K, Sliwinski T, Stoklosa T, Ploski R, Fischer T, Sykes SM, Koschmieder S, Bullinger L, Valent P, Wasik MA, Huang J and Skorski T: Tyrosine kinase inhibitor-induced defects in DNA repair sensitize FLT3(ITD)-positive leukemia cells to PARP1 inhibitors. *Blood* 132: 67-77, 2018. PMID: 29784639. DOI: 10.1182/blood-2018-02-834895
- 45 Faraoni I, Aloisio F, De Gabrieli A, Consalvo MI, Lavorgna S, Voso MT, Lo-Coco F and Graziani G: The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib induces up-regulation of death receptors in primary acute myeloid leukemia blasts by NF- κ B activation. *Cancer Lett* 423: 127-138, 2018. PMID: 29526802. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.03.008
- 46 Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Nagata Y, Khurshed M, Przychodzen B, Makishima H, Xu M, Bleeker FE, Wilmink JW, Carraway HE, Mukherjee S, Sekeres MA, van Noorden CJF and Maciejewski JP: Idh1/2 mutations sensitize acute myeloid leukemia to parp inhibition and this is reversed by IDH1/2-mutant inhibitors. *Clin Cancer Res* 24: 1705-1715, 2018. PMID: 29339439. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2796
- 47 Zhao L and So CWE: PARP1 potentiates with current conventional therapy in MLL leukemia. *Cell Cycle* 16: 1861-1869, 2017. PMID: 28886273. DOI: 10.1080/15384101.2017.1288325
- 48 Garcia TB, Snedeker JC, Baturin D, Gardner L, Fosmire SP, Zhou C, Jordan CT, Venkataraman S, Vibhakar R and Porter CC: A small-molecule inhibitor of WEE1, AZD1775, synergizes with olaparib by impairing homologous recombination and enhancing DNA damage and apoptosis in acute leukemia. *Mol Cancer Ther* 16: 2058-2068, 2017. PMID: 28655785. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0660
- 49 Piao J, Takai S, Kamiya T, Inukai T, Sugita K, Ohyashiki K, Delia D, Masutani M, Mizutani S and Takagi M: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors selectively induce cytotoxicity in TCF3-HLF-positive leukemic cells. *Cancer Lett* 386: 131-140, 2017. PMID: 27894958. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.021
- 50 Muvarak NE, Chowdhury K, Xia L, Robert C, Choi EY, Cai Y, Bellani M, Zou Y, Singh ZN, Duong VH, Rutherford T, Nagaria P, Bentzen SM, Seidman MM, Baer MR, Lapidus RG, Baylin SB and Rassool FV: Enhancing the cytotoxic effects of PARP inhibitors with DNA demethylating agents - a potential therapy for cancer. *Cancer Cell* 30: 637-650, 2016. PMID: 27728808. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.09.002
- 51 Hegde M, Mantelingu K, Pandey M, Pavankumar CS, Rangappa KS and Raghavan SC: Combinatorial study of a novel poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor and an HDAC inhibitor, SAHA, in leukemic cell lines. *Target Oncol* 11: 655-665, 2016. PMID: 27188390. DOI: 10.1007/s11523-016-0441-x
- 52 Pratz KW, Koh B, Patel AG, Flatten KS, Poh W and James G: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor hypersensitivity in aggressive myeloproliferative neoplasms. *Clin Cancer Res* 22(15): 3894-3902, 2017. PMID: 26979391. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2351
- 53 Esposito MT, Zhao L, Fung TK, Rane JK, Wilson A, Martin N, Gil J, Leung AY, Ashworth A and Eric So CW: Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nat Med* 21: 1481-1490, 2015. PMID: 26594843. DOI: 10.1038/nm.3993
- 54 Bai XT, Moles R, Chaib-Mezrag H and Nicot C: Small PARP inhibitor PJ-34 induces cell cycle arrest and apoptosis of adult T-cell leukemia cells. *J Hematol Oncol* 8: 1-12, 2015. PMID: 26497583. DOI: 10.1186/s13045-015-0217-2
- 55 Falzacappa MVV, Ronchini C, Faretta M, Iacobucci I, Di Rora AGL, Martinelli G, Meyer LH, Debatin KM, Orecchioni S, Bertolini F and Pelicci PG: The combination of the PARP inhibitor rucaparib and 5FU is an effective strategy for treating acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 14: 889-898, 2015. PMID: 25667168. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0276
- 56 Faraoni I, Compagnone M, Lavorgna S, Angelini DF, Cencioni MT, Piras E, Panetta P, Ottone T, Dolci S, Venditti A, Graziani G and Lo-Coco F: BRCA1, PARP1 and γ H2AX in acute myeloid leukemia: Role as biomarkers of response to the PARP inhibitor olaparib. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1852: 462-472, 2015. PMID: 25483710. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.12.001

- 57 Lam K and Zhang DE: RUNX1 and RUNX1-ETO: Roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci* 17: 1120-1139, 2012. PMID: 22201794. DOI: 10.2741/3977
- 58 Wichmann C, Quagliano-Lo Coco I, Yildiz, Chen-Wichmann L, Weber H, Syzonenko T, Döring C, Brendel C, Ponnusamy K, Kinner A, Brandts C, Henschler R and Grez M: Activating cKIT mutations confer oncogenic cooperativity and rescue RUNX1/ETO-induced DNA damage and apoptosis in human primary CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Leukemia* 29: 279-289, 2015. PMID: 24897507. DOI: 10.1038/leu.2014.179
- 59 Klein HL: The consequences of RAD51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair* 7: 686-693, 2008. PMID: 18243065. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.12.008
- 60 Gaymes TJ, Mohamedali A, Eiliazadeh AL, Darling D and Mufti GJ: FLT3 and JAK2 mutations in acute myeloid leukemia promote interchromosomal homologous recombination and the potential for copy neutral loss of heterozygosity. *Cancer Res* 77: 1697-1708, 2017. PMID: 28108507. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1678
- 61 Bhat KP and Cortez D: RPA and RAD51: Fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nat Struct Mol Biol* 25: 446-453, 2018. PMID: 29807999. DOI: 10.1038/s41594-018-0075-z
- 62 Talati C and Pinilla-Ibarz J: Resistance in chronic myeloid leukemia: Definitions and novel therapeutic agents. *Curr Opin Hematol* 25: 154-161, 2018. PMID: 29266016. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000403
- 63 Loscocco F, Visani G, Galimberti S, Curti A and Isidori A: BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol* 9: 939, 2019. PMID: 31612105. DOI: 10.3389/fonc.2019.00939
- 64 Farmer H, McCabe H, Lord CJ, Tutt AHJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NMB, Jackson SP, Smith GCM and Ashworth A: Targeting the DNA repair defect in *BRCA*-mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921, 2005. PMID: 15829967. DOI: 10.1038/nature03445
- 65 Podszycwalow-Bartnicka P, Wolczyk M, Kusio-Kobialka M, Wolanin K, Skowronek K, Nieborowska-Skorska M, Dasgupta Y, Skorski T and Piwocka K: Downregulation of BRCA1 protein in BCR-ABL1 leukemia cells depends on stress-triggered tiar-mediated suppression of translation. *Cell Cycle* 13: 3727-3741, 2014. PMID: 25483082. DOI: 10.4161/15384101.2014.965013
- 66 Lord CJ, Tutt ANJ and Ashworth A: Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med* 66: 455-470, 2015. PMID: 25341009. DOI: 10.1146/annurev-med-050913-022545

Received April 18, 2020

Revised May 12, 2020

Accepted May 15, 2020

PARP1 Is Overexpressed in Hematological Malignant Cell Lines: A Framework for Experimental Oncology

CAIO BEZERRA MACHADO*, EMERSON LUCENA DA SILVA*, BEATRIZ MARIA DIAS NOGUEIRA,
MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO, RAQUEL CARVALHO MONTENEGRO,
MARIA ELISABETE AMARAL DE MORAES and CAROLINE AQUINO MOREIRA-NUNES

*Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Department of
Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

Abstract. *Background/Aim:* Experimental oncology consists in the use of cell cultures for the study of oncological models and is a commonly utilized concept in research laboratories, representing a credible framework for drug testing, cytotoxicity and cellular mutagenesis and carcinogenesis. Investigations into poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) inhibition have become ever more relevant due to its approval as a therapeutic option in tumors with BRCA1/2 DNA repair-associated mutation and the seemingly high PARP expression levels in some tumor subtypes. In this study, we aimed to determine PARP1 gene expression of different hematological cancer-derived cell lineages and compare them to that of normal cell lines. *Materials and Methods:* PARP1 gene expression in Seven different neoplastic lineages, representing three different hematological disorders (chronic myeloid leukemia, Burkitt lymphoma and acute lymphoblastic leukemia) was quantified by quantitative real time polymerase chain reaction. *Results:* All hematological malignant lineages in this study overexpressed PARP1 when compared to the normal cell line MRC-5, with Burkitt's lymphoma cells having the highest expression values (fold change: 93). *Conclusion:* The observation of overexpression of PARP1 in hematological malignant lineage is crucial for future studies exploring possible cellular oncogenic pathways and supports

investigations into the effectiveness of PARP1 inhibitors against hematological disorders.

Experimental oncology consists in the use of cell cultures for the study and investigation of neoplasms in biological models. Commonly utilized in research laboratories, cell models represent an excellent basis for analyses of genetic and epigenetic molecular alterations and anticancer drug testing (1, 2).

Research studies utilizing cell lineages are demonstrated to be appropriate frameworks for the development of new drugs and provide credible models for the analyses of cytotoxicity, mutagenesis and carcinogenesis, also allowing for consistent and reproducible results (3). The primary advantage when working with cell lines is the availability of a potentially unlimited source of biological material, as cells are able to divide and grow indefinitely *in vitro*. Moreover, the possibility of storing cells in liquid nitrogen allows for continuation of research over prolonged periods (4).

Investigations into poly-ADP-ribose polymerases (PARP) cellular pathways have become ever more relevant since the first approval of PARP inhibitors (PARPi) for the treatment of breast cancer 1/2 (BRCA1/2) DNA repair-associated-deficient tumors, with PARP1 being the main target of inhibition (5, 6). PARP1 plays a major role in the DNA-damage response and is overexpressed in various tumor subtypes, being mainly associated with an unfavorable prognosis (7-9).

PARPi are targeted antineoplastic drugs and the treatment outcome is dependent on PARP1 expression in the targeted cells (5, 10). In this study, we aimed to determine the PARP1 expression level of different cell lineages representing neoplastic hematological disorders and to compare them to the expression levels of normal cell lines, creating a basis for future studies of PARPi utilizing experimental oncology models.

*These Authors contributed equally to this work

Correspondence to: Caroline Aquino Moreira-Nunes, Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo st, n 1000, Rodolfo Teófilo, CEP: 60416-000 Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 8533668033, e-mail: carolfam@gmail.com

Key Words: Cultured cells, PARP polymerase, hematological malignancies.

Table I. Cell lines evaluated in this study.

Cell line	Tissue of origin	Classification	Reference
K-562	Bone marrow chronic myeloid leukemia	Blast cells	11
K562-Lucena 1	Derived from K-562	Vincristine-resistant	12
FEPS	Derived from K-562	Daunorubicin-resistant	13
SUP-B15	Bone marrow	B Lymphoblast	14
Jurkat	Peripheral blood	T Lymphocyte	15
Namalwa	Peripheral blood	B Lymphocyte	16
Raji	Bone marrow	B Lymphocyte	17
MRC-5	Human fetal lung fibroblasts	Normal cell	18
MNP-01	Non-neoplastic gastric epithelium	Normal cell	19

Materials and Methods

Cell culture. For analyses of *PARP1* gene expression, we utilized a panel of leukemia and normal cell lines for comparison, as shown in Table I. Cells lines derived from patients with chronic myeloid leukemia K-562, vincristine-resistant derivative K562-Lucena 1, and daunorubicin-resistant derivative FEPS were generously donated by Professor Vivian M. Rumjanek from the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. SUP-B15 and Jurkat cell lines derived from lymphoblastic leukemia, as well as Namalwa and Raji cell lines from Burkitt's lymphoma, were kindly provided by Professor Lucas Eduardo Botelho de Souza from Regional Blood Center of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

All leukemia cell lines were cultivated in RPMI; for resistant cell lines K562-Lucena 1 and FEPS, media were also supplemented with 60 nM vincristine sulfate and 46 nM daunorubicin, respectively. Normal cell lines derived from the gastric epithelium (MNP-01) and lung fibroblast (MRC-5) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium. All media were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco®, Carlsbad, CA, USA), 1% (v/v) penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/ml) (Gibco®A), and cells were conditioned in a 5% CO₂ air-humidified atmosphere at 37°C.

Total mRNA isolation and cDNA synthesis. Cells were plated in 12-well plates at 5×10⁴ cells/well for normal cells (MRC-5 and MNP-01) and about 7×10⁴ cells/well for leukemia cells. Cell lines were maintained until 80% confluency (~48 hours for normal cells and 44 to 48 hours for leukemia cells). After the cultivation time, cells were collected and RNA was extracted with TRIzol Reagent® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After extraction, RNA concentration and quality were determined using NanoDrop (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) and 20 ng was used for cDNA confection using High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). cDNA was then stored at -20°C until further expression analysis.

Analysis of *PARP1* expression by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qPCR). Quantitative real-time PCR was performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Relative expression levels of *PARP1* (NM_001618.3) were normalized and determined using β -actin gene (*ACTB*; NM_001101.5) as an endogenous control. Primer efficiency was

determined for all genes described. The detection method was the TaqMan® Gene expression assays system (Applied Biosystems) and qPCR was performed using QuantStudio® 5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The experiments were performed in triplicate and the standard requirements for performing the technique were followed (20). For calculating the relative expression levels, the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method was used (21), considering the sample from the normal cell line MRC-5 as the calibrator of the assays.

Statistical analysis. Assays were performed in triplicate and results are shown as the mean±standard deviation, the relative expression of *PARP1* in cell lines was compared to the expression in the MRC-5 sample by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post-test. Significant differences were considered with an interval of confidence of 95% ($p<0.05$). GraphPad Prism 5.01 software (Merck®, Darmstadt, Hesse, Germany) was used for data analysis and graph design.

Results

Firstly, when we compared the expression of *PARP1* in cell lines derived from chronic myeloid leukemia (CML) with the normal cell line MRC-5 (Figure 1), all those analyzed presented gene expression enhanced by more than 10-fold (K-562 and FEPS: $p<0.0001$; and K562-Lucena 1: $p<0.05$). When compared among themselves, FEPS showed higher expression than K-562 and K562-Lucena 1, at around 50- and 90-fold, respectively ($p<0.0001$).

Next, we analyzed *PARP1* expression in cell lines derived from acute leukemia. Both SUP-B15 ($p<0.0001$) and Jurkat ($p<0.001$) presented a significant increase in *PARP1* expression when compared to normal cells (approximately 30- and 20-fold, respectively). However, when these cell lines were compared with each other, there was no difference in gene expression (Figure 2).

We also evaluated *PARP1* gene expression in cell lines derived from Burkitt's lymphoma (BKL); Namalwa, and Raji cell lines presented a 90-fold increase and 70-fold in *PARP1* expression, respectively ($p<0.0001$) when compared to normal cell MRC-5 (Figure 3), did not differ statistically in *PARP1* gene expression when compared with each other.

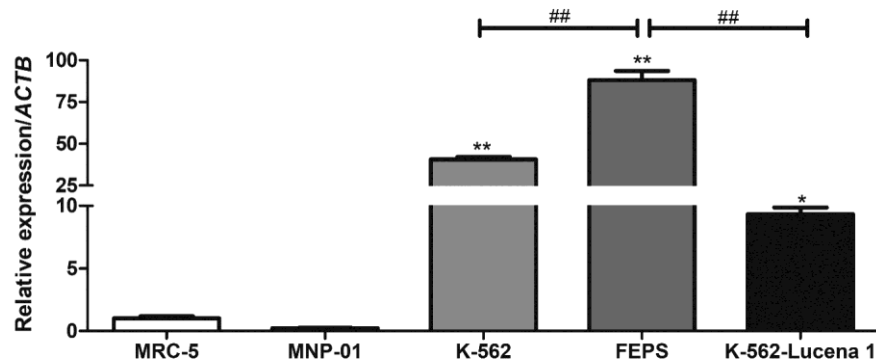


Figure 1. Expression of poly-ADP-ribose polymerase 1 (*PARP1*) in chronic myeloid leukemia cell lines. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. *PARP1* gene expression was normalized by endogenous gene actin beta (*ACTB*). Expression in normal gastric cells MNP-01, and chronic myeloid leukemia cell line K-562, its vincristine-resistant derivative K562-Lucena 1, and daunorubicin-resistant derivative FEPS was compared to that of lung fibroblasts MRC-5, using analysis of variance and multiple Bonferroni comparisons. Significantly different at: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.0001$ from MRC-5 cells; ## $p < 0.0001$.

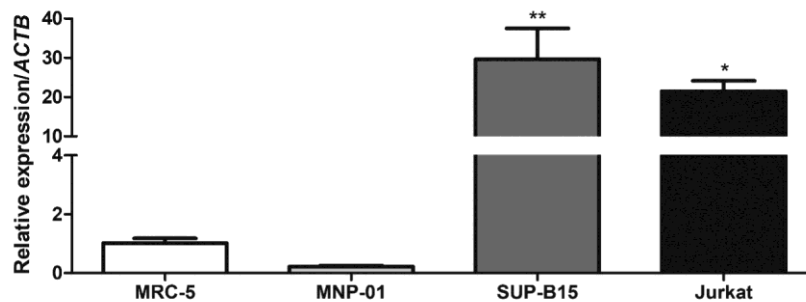


Figure 2. Expression of poly-ADP-ribose polymerase 1 (*PARP1*) in acute leukemia cell lines. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. *PARP1* gene expression was normalized by endogenous gene actin beta (*ACTB*). Expression in normal gastric cells MNP-01 and cell lines of acute lymphoblastic leukemia (SUP-B15), and acute T-cell leukemia (Jurkat) was compared to that of lung fibroblasts MRC-5 using analysis of variance and multiple Bonferroni comparisons. Significantly different from MRC-5 cells at * $p < 0.001$ and ** $p < 0.0001$.

Discussion

The utilization of cancer cell lines in research laboratories is of common practice due to their easy manipulation, when compared to *in vivo* models, and more ethically accepted usage (1). Even though the cellular genetic expression may diverge between similar lineages cultivated in different laboratories, it is essential to determine a lineage's molecular profile for the correct conduction of anticancer drug tests and when searching for possible mechanisms of resistance (1, 22, 23).

Characterization of *PARP1* expression in cancer cell lines is becoming ever more relevant due to the increased use of PARPi in clinical practice for the treatment of different solid tumors and their promising activity in *in vitro* studies and clinical trials as a therapeutic option for leukemia and other hematological malignancies (24, 25).

When analyzing the profile of CML lineages, it is not surprising that significant differences in *PARP1* expression levels were detected, even though all lineages were derived from K-562, since previous literature reports already determined the main resistance mechanism of K562-Lucena 1 and FEPS to be through overexpression of ATP binding cassette subfamily B member 1 (*ABCB1*) transporter protein. More than 1,000 genes are differentially expressed between these cell lines (26), and we demonstrate *PARP1* to be one of these genes.

PARP1 was, however, overexpressed in all CML lineages analyzed when compared to the normal MRC-5 cell line. This observation corroborates previous data indicating PARPi effectiveness in the treatment of CML cell lines and patient samples harboring breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia translocation (*BCR-ABL*), especially when combined in synergistic treatments (27-30).

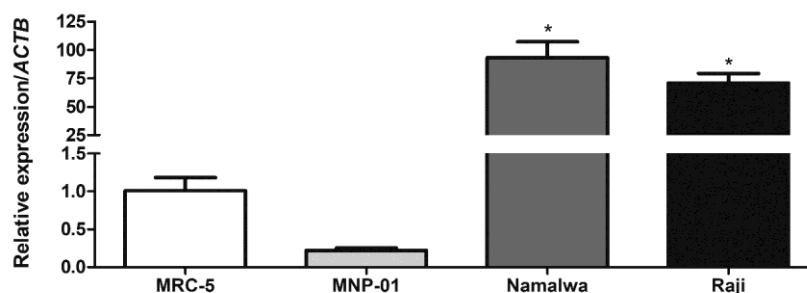


Figure 3. Expression of poly-ADP-ribose polymerase 1 (*PARP1*) in Burkitt's lymphoma cell lines. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. *PARP1* gene expression was normalized by endogenous gene actin beta (*ACTB*). Expression in normal gastric cells MNP-01 and Namalwa and Raji cell lines derived from Burkitt's lymphoma was compared to that of lung fibroblasts MRC-5 using analysis of variance and multiple Bonferroni comparisons. *Significantly different from MRC-5 cells at $p < 0.0001$.

The expression profile in both acute leukemia lineages analyzed also demonstrates *PARP1* overexpression in comparison to normal cells. While PARPi usage may not always be effective as a single agent against acute leukemia cells (31), its usage in synergistic treatments, alongside DNA damage-inducing drugs, demonstrated anticancer potential for different acute leukemia subtypes (32, 33), pointing to *PARP1* overexpression as a possible supportive pathway to malignancy.

Lastly, the two BKL cell lines presented some of the higher expression levels of *PARP1* in those analyzed. Immunoglobulin heavy locus/*MYC* proto-oncogene translocation is the most common mutation in BKL cells and, while it is related to overexpression of *MYC* transcription factor, it also seems to be responsible for down-regulation of *BRCA2* tumor-suppressor protein and accumulation of DNA double-strand breaks in these cells (34), which might explain *PARP1* overexpression as being a compensatory mechanism for perturbed DNA damage-repair pathways.

It is also relevant to note that, in accordance with the concept of synthetic lethality, the expression profile of BKL cells leads to them being sensitive to PARPi treatment as a total disruption of DNA damage-repair mechanisms induces apoptosis even in malignant cell phenotypes (34-36).

Conclusion

Overall, all malignant lineages in this study were found to overexpress *PARP1*. This observation is crucial for future studies exploring possible cellular oncogenic pathways and highlights the need for investigations into PARPi effectiveness against hematological disorders.

Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

Authors' Contributions

Machado CB, da Silva EL and Moreira-Nunes CA performed the study design; Machado CB and da Silva EL performed the cell culture analysis; Machado CB, da Silva EL and Nogueira BMD performed the molecular and statistical analysis; Machado CB, da Silva EL and Nogueira BMD, Moraes-Filho MO, Moraes MEA, Montenegro RC and Moreira-Nunes CA wrote the article. All Authors read and approved the final article.

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian funding agencies National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq; to ELS, RCM, MEAM, MOMF and CAMN).

References

- 1 Ferreira D, Adegá F and Chaves R: The importance of cancer cell lines as *in vitro* models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. *Oncogenomics and Cancer Proteomics – Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*, 2016. DOI: 10.5772/53110
- 2 Ben-David U, Beroukhi R and Golub TR: Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities. *Nat Rev Cancer* 19(2): 97-109, 2019. PMID: 30578414. DOI: 10.1038/s41568-018-0095-3
- 3 Antoni D, Burckel H, Josset E and Noel G: Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci* 16(3): 5517-5527, 2015. PMID: 25768338. DOI: 10.3390/ijms16035517
- 4 Drexler HG and Quentmeier H: The LL-100 cell lines panel: tool for molecular leukemia-lymphoma research. *Int J Mol Sci* 21(16): 5800, 2020. PMID: 32823535. DOI: 10.3390/ijms21165800
- 5 Francica P and Rottenberg S: Mechanisms of PARP inhibitor resistance in cancer and insights into the DNA damage response. *Genome Med* 10(1): 101, 2018. PMID: 30593284. DOI: 10.1186/s13073-018-0612-8
- 6 McCann KE and Hurvitz SA: Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context* 7: 212540, 2018. PMID: 30116283. DOI: 10.7573/dic.212540

- 7 Li X, Li C, Jin J, Wang J, Huang J, Ma Z, Huang X, He X, Zhou Y, Xu Y, Yu M, Huang S, Yan X, Li F, Pan J, Wang Y, Yu Y and Jin J: High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects. *EBioMedicine* 38: 47-56, 2018. PMID: 30472087. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.11.025
- 8 Schiewer MJ, Mandigo AC, Gordon N, Huang F, Gaur S, de Leeuw R, Zhao SG, Evans J, Han S, Parsons T, Birbe R, McCue P, McNair C, Chand SN, Cendon-Florez Y, Gallagher P, McCann JJ, Poudel Neupane N, Shafi AA, Dylgieri E, Brand LJ, Visakorpi T, Raj GV, Lallas CD, Trabelsi EJ, Gomella LG, Dicker AP, Kelly WK, Leiby BE, Knudsen B, Feng FY and Knudsen KE: PARP-1 regulates DNA repair factor availability. *EMBO Mol Med* 10(12): e8816, 2018. PMID: 30467127. DOI: 10.15252/emmm.201708816
- 9 Sachdev E, Tabatabai R, Roy V, Rimel BJ and Mita MM: PARP inhibition in cancer: an update on clinical development. *Target Oncol* 14(6): 657-679, 2019. PMID: 31625002. DOI: 10.1007/s11523-019-00680-2
- 10 Kruk A, Ociepa T, Urasiński T, Grabarek J and Urasińska 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* 66(3): 239-245, 2015. PMID: 26619102. DOI: 10.5114/pjp.2015.54957
- 11 Lozzio CB and Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334, 1975. PMID: 28157673. DOI: 10.1182/blood-2016-08-736025
- 12 Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC and Capella MA: Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An Acad Bras Cienc* 73(1): 57-69, 2001. PMID: 11246270. DOI: 10.1590/s0001-37652001000100007
- 13 Rumjanek VM, Vidal RS and Maia RC: Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? *Biosci Rep* 33(6): e00081, 2013. PMID: 24070327. DOI: 10.1042/BSR20130067
- 14 Fainstein E, Marcelle C, Rosner A, Canaani E, Gale RP, Dreazen O, Smith SD and Croce CM: A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. *Nature* 330(6146): 386-388, 1987. PMID: 2825022. DOI: 10.1038/330386a0
- 15 Gillis S and Watson J: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152(6): 1709-1719, 1980. PMID: 6778951. DOI: 10.1084/jem.152.6.1709
- 16 Nyormoi O, Klein G, Adams A and Dombos L: Sensitivity to EBV superinfection and IUDR inducibility of hybrid cells formed between a sensitive and a relatively resistant Burkitt lymphoma cell line. *Int J Cancer* 12(2): 396-408, 1973. PMID: 4365093. DOI: 10.1002/ijc.2910120211
- 17 Epstein MA and Barr YM: Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 34: 231-240, 1965. PMID: 14293790. DOI: 10.1093/jnci/34.2.231
- 18 Jacobs JP, Jones CM and Baille JP: Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227(5254): 168-170, 1970. PMID: 4316953. DOI: 10.1038/227168a0
- 19 Leal MF, Ribeiro HF, Rey JA, Pinto GR, Smith MC, Moreira-Nunes CA, Assumpção PP, Lamarão LM, Calcagno DQ, Montenegro RC and Burbano RR: YWHAE silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAE role in the tumor development and metastasis process. *Oncotarget* 7(51): 85393-85410, 2016. PMID: 27863420. DOI: 10.18632/oncotarget.13381
- 20 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622, 2009. PMID: 19246619. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
- 21 Schmittgen TD and Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108, 2008. PMID: 18546601. DOI: 10.1038/nprot.2008.73
- 22 Cruz M, Enes M, Pereira M, Dourado M and Sarmiento Ribeiro AB: [Experimental models in oncology: contribution of cell culture on understanding the biology of cancer]. *Rev Port Pneumol* 15(4): 669-682, 2009. PMID: 19547898. DOI: 10.1016/s0873-2159(15)30163-x
- 23 Hynds RE, Vladimirov E and Janes SM: The secret lives of cancer cell lines. *Dis Model Mech* 11(11): dmm037366, 2018. PMID: 30459183. DOI: 10.1242/dmm.037366
- 24 Min A and Im SA: PARP inhibitors as therapeutics: beyond modulation of PARylation. *Cancers (Basel)* 12(2): 394, 2020. PMID: 32046300. DOI: 10.3390/cancers12020394
- 25 Faraoni I, Giansanti M, Voso MT, Lo-Coco F and Graziani G: Targeting ADP-ribosylation by PARP inhibitors in acute myeloid leukaemia and related disorders. *Biochem Pharmacol* 167: 133-148, 2019. PMID: 31028744. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.04.019
- 26 Moreira MA, Bagni C, de Pinho MB, Mac-Cormick TM, dos Santos Mota M, Pinto-Silva FE, Daflon-Yunes N and Rumjanek VM: Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. *Leuk Res* 38(8): 983-987, 2014. PMID: 24996974. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.06.001
- 27 Liu Y, Song H, Song H, Feng X, Zhou C and Huo Z: Targeting autophagy potentiates the anti-tumor effect of PARP inhibitor in pediatric chronic myeloid leukemia. *AMB Express* 9(1): 108, 2019. PMID: 31309361. DOI: 10.1186/s13568-019-0836-z
- 28 Hernández-Rodríguez M, Mendoza Sánchez PI, Macias Perez ME, Rosales Cruz E, Mera Jiménez E, Nicolás Vázquez MI and Miranda Ruvalcaba R: In vitro and computational studies showed that perezone inhibits PARP-1 and induces changes in the redox state of K562 cells. *Arch Biochem Biophys* 671: 225-234, 2019. PMID: 31063714. DOI: 10.1016/j.abb.2019.05.002
- 29 Nieborowska-Skorska M, Maifrede S, Ye M, Toma M, Hewlett E, Gordon J, Le BV, Sliwinski T, Zhao H, Piwocka K, Valent P, Tulin AV, Childers W and Skorski T: Non-NAD-like PARP1 inhibitor enhanced synthetic lethal effect of NAD-like PARP inhibitors against BRCA1-deficient leukemia. *Leuk Lymphoma* 60(4): 1098-1101, 2019. PMID: 30277116. DOI: 10.1080/10428194.2018.1520988
- 30 Machado CB, DA Silva EL, DE Moraes Filho MO, DE Moraes MEA and Moreira-Nunes CA: PARP inhibitors as therapeutic options for tyrosine kinase-dependent leukemia: a review. *Anticancer Res* 40(6): 3055-3063, 2020. PMID: 32487599. DOI: 10.21873/anticancer.14286

- 31 Hegde M, Mantelingu K, Swarup H, Pavankumar C, Qamar I, Raghavan S and Rangappa K: Novel PARP inhibitors sensitize human leukemic cells in an endogenous PARP activity dependent manner. *RSC Advances* 6(8): 6308-6319, 2017. DOI: 10.1039/C5RA19150E
- 32 Falzacappa MV, Ronchini C, Faretta M, Iacobucci I, Di Rorà AG, Martinelli G, Meyer LH, Debatin KM, Orecchioni S, Bertolini F and Pelicci PG: The combination of the PARP inhibitor rucaparib and 5FU is an effective strategy for treating acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 14(4): 889-898, 2015. PMID: 25667168. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0276
- 33 Garcia TB, Snedeker JC, Baturin D, Gardner L, Fosmire SP, Zhou C, Jordan CT, Venkataraman S, Vibhakar R and Porter CC: A small-molecule inhibitor of WEE1, AZD1775, synergizes with olaparib by impairing homologous recombination and enhancing DNA damage and apoptosis in acute leukemia. *Mol Cancer Ther* 16(10): 2058-2068, 2017. PMID: 28655785. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0660
- 34 Maifrede S, Martin K, Podszywalow-Bartnicka P, Sullivan-Reed K, Langer SK, Nejati R, Dasgupta Y, Hulse M, Gritsyuk D, Nieborowska-Skorska M, Lupey-Green LN, Zhao H, Piwocka K, Wasik MA, Tempera I and Skorski T: IGH/MYC translocation associates with BRCA2 deficiency and synthetic lethality to PARP1 inhibitors. *Mol Cancer Res* 15(8): 967-972, 2017. PMID: 28634224. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0468
- 35 Lord CJ and Ashworth A: PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 355(6330): 1152-1158, 2017. PMID: 28302823. DOI: 10.1126/science.aam7344
- 36 Carrassa L, Colombo I, Damia G and Bertoni F: Targeting the DNA damage response for patients with lymphoma: Preclinical and clinical evidences. *Cancer Treat Rev* 90: 102090, 2020. PMID: 32892059. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102090

Received March 17, 2021

Revised April 8, 2021

Accepted April 13, 2021