

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITOS TOXICOGENÔMICOS TARDIOS DE TERAPIAS  
ANTINEOPLÁSICAS PARA LINFOMAS**

**João Paulo de Castro Marcondes  
Daisy Maria Fávero Salvadori  
Orientadora**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP para obtenção  
do título de Doutor em Patologia**

**BOTUCATU – SP  
2011**

## **Efeitos toxicogenômicos tardios de terapias antineoplásicas para linfomas**

### **RESUMO**

Os linfomas representam um grupo heterogêneo de tumores que acometem o tecido linfóide nodal e extranodal. O tratamento, baseado na utilização da poliquimioterapia associada ou não à radioterapia, tem proporcionado altas taxas de cura. Entretanto, é sabido que tais terapias podem induzir mutações genéticas que, mais tarde, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias secundárias. Assim sendo, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos tardios das terapias antineoplásicas para linfomas. Para isso, foram investigados os danos no DNA e a capacidade de reparo da molécula pelo teste do cometa, e a relação entre polimorfismos e expressão de dois genes de reparo do DNA - *XRCC1* (codons 280 e 399) e *hOGG1* (codon 326) – com os níveis de lesões genotóxicas. A casuística do estudo incluiu 3 grupos de indivíduos: 14 pacientes recém-diagnosticados com linfoma e antes de qualquer tratamento antineoplásico (grupo pré-terapia); 29 pacientes com história de linfoma e que haviam finalizado o tratamento há no mínimo 2 anos (histopatologicamente negativos para neoplasia; grupo pós-terapia); 29 indivíduos saudáveis pareados por sexo, idade e hábito tabagista (grupo controle). Os resultados mostraram que os pacientes com diagnóstico ou história de linfoma (pré e pós-terapia, respectivamente), apresentavam níveis aumentados de danos no DNA quando comparados aos indivíduos saudáveis. Esses dados evidenciam a relação entre a presença da doença e lesões no DNA, e que mesmo com diagnóstico negativo, os indivíduos com história de linfoma apresentam níveis aumentados de genotoxicidade até, em média, sete anos após o término da terapia. A menor capacidade de reparo do DNA observada nos pacientes do grupo pós-terapia, e o menor nível de expressão dos genes *XRCC1* e *hOGG1* nos pacientes pré e pós-terapia, poderiam ser explicações para tais achados. Além disso, foi observado que indivíduos com genótipos *XRCC*<sup>399arg/arg</sup>,

*XRCC1*<sup>280arg/his</sup> e *hOGG1*<sup>326ser/ser</sup> apresentavam maior capacidade de reparo do DNA. Portanto, com base nas informações apresentadas, pode-se concluir que os linfomas estão associados a maiores níveis de lesões e à menor capacidade de reparo do DNA, e que após as terapias antineoplásicas e já com resultado negativo para a neoplasia, os pacientes podem apresentar riscos aumentados para o desenvolvimento de doenças associadas a mutações genéticas. Contudo, estudos epidemiológicos mais longos, incluindo pacientes com neoplasias secundárias, devem ser ainda conduzidos, a fim de confirmar a relação entre os efeitos tardios das terapias antitumorais e o desenvolvimento de neoplasias secundárias.

Palavras chave: danos no DNA, expressão gênica, genotoxicidade, linfoma, polimorfismo gênico, reparo do DNA, terapias antineoplásicas.

## Toxicogenomic late effects of antineoplastic therapies for lymphomas

### ABSTRACT

Lymphomas are a heterogeneous group of malignancies that arise in nodal sites with or without extranodal involvement. The treatment, based on polychemotherapy associated or not with radiotherapy, has provided high cure rates. However, it is known that such therapies can induce genetic mutations that could be related to development of second malignancies. Therefore, the present study aimed to evaluate the late effects of antineoplastic therapies for lymphomas. DNA damage and repair capability as depicted by the comet assay, and the relationship between DNA repair genes polymorphisms (*XRCC1* codons 280 and 399, *hOGG1* codon 326) or gene expressions and the levels of DNA lesions were investigated. Three groups were included in this study: pre-therapy, with 14 patients newly diagnosed with lymphoma and before any antineoplastic; post-therapy, with 29 patients with history of lymphoma and who had finished treatment at least three years before blood collection (histopathologically negative for neoplasia); control, with 29 healthy subjects matched for age, sex and smoking habit. The results showed that patients from pre- and post-therapy groups presented higher amount of DNA damage than the healthy subjects. These data first indicated that individuals with lymphoma have high frequency of primary DNA lesion in lymphocytes, then, that even with negative histopathological diagnostic, patients with history of lymphoma presented increased DNA damage until the average of 7 years after the end of therapy. The reduced DNA repair capability and the low *XRCC1* and *hOGG1* expression observed in the post-therapy group could explain such findings. Furthermore, higher DNA repair capability was observed in those subjects with *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup>, *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> and *hOGG1*<sup>326ser/ser</sup> genotypes. In conclusion, our data demonstrated that lymphomas were associated with high level of damage and low DNA repair

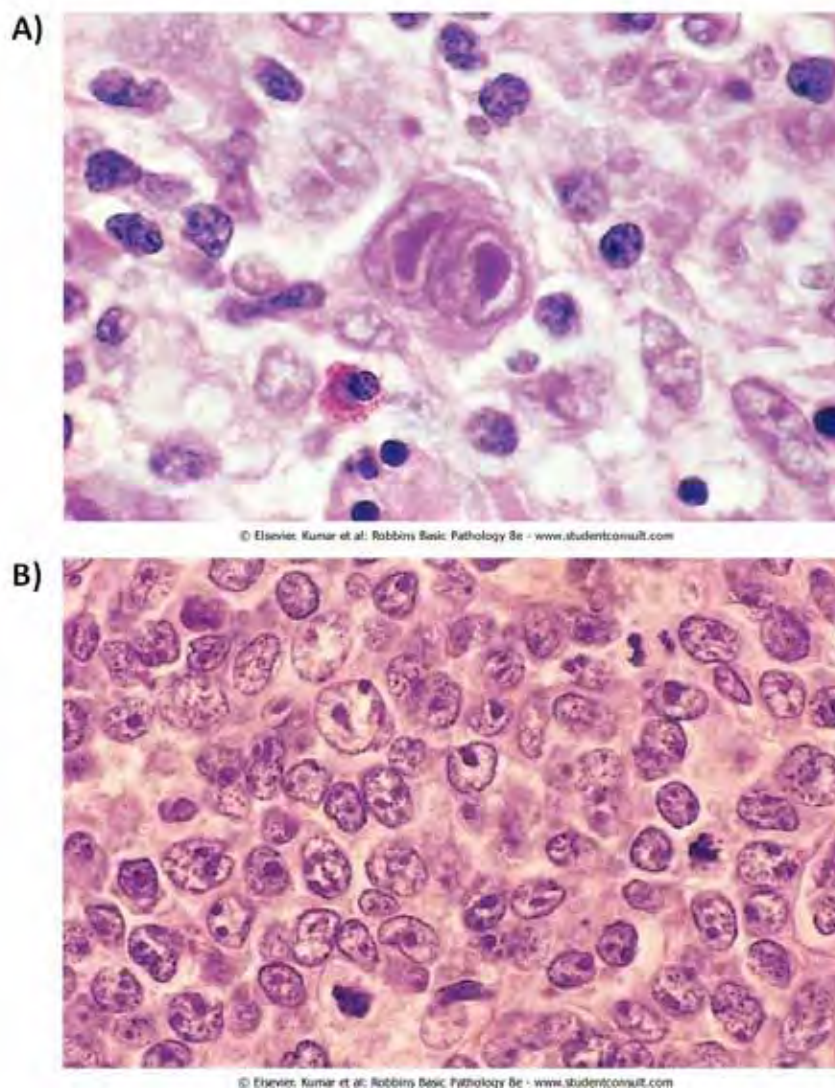
capability, and that even with negative diagnosis patients after therapy might have increased risk for developing genetic-related diseases. However, long-term epidemiological studies, including patients with second malignancies, should be conducted to corroborate the relationship between late effects of antineoplastic therapies and the development of second malignancies.

Key words: DNA damage, gene expression, genotoxicity, lymphoma, genetic polymorphism, DNA repair, antineoplastic therapies.

## 1- REVISÃO DA LITERATURA

### *1.1- Linfomas: classificação, incidência e tratamento*

As neoplasias linfóides representam um grupo neoplasias que acometem, primariamente, a medula óssea, com extravasamento das células neoplásicas para a corrente sanguínea (como é caso das leucemias), e o tecido linfóide nodal e extranodal, com conseqüente formação de massas tumorais denominadas linfomas. Esses dois grupos de neoplasias (leucemias e linfomas) podem apresentar manifestações clínicas sobrepostas, com a infiltração dos linfonodos em alguns casos de leucemia linfóide, e o extravasamento para a corrente sanguínea em alguns casos de linfoma. Os linfomas representam um grupo heterogêneo de tumores que são classificados em dois grandes grupos de acordo com as características morfológicas, imunofenotípicas, genéticas e clínicas: Linfomas de Hodgkin (LH) e Linfomas Não-Hodgkin (LNH) (Figura 1). Uma das principais características morfológicas do LH é a presença, nos linfonodos afetados, de células gigantes derivadas de linfócitos B e denominadas *Reed-Sternberg*. De um modo geral, o comportamento biológico desses dois grupos de tumores apresenta diferenças, ou seja, o LNH compromete frequentemente vários linfonodos e apresenta disseminação não contígua, com comprometimento extranodal comum; o LH, por sua vez, acomete o grupo axial de linfonodos isolados, disseminando-se por contigüidade e raramente acometendo sítios extranodais (Kumar *et al.*, 2008). As Tabelas 1 e 2 apresentam a classificação das neoplasias linfóides de acordo com o estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008 (Jaffe, 2009).



**Figura 1** - Fotomicrografia de cortes histológicos de Linfoma de Hodgkin (**A**) e linfoma difuso de grandes células B (**B**). Adaptado de Kumar *et al.* (2008)

---

**Tabela 1:** Classificação das neoplasias de células B maduras segundo a OMS
 

---

Leucemia linfocítica crônica de células B/linfoma linfocítico de células pequenas

Leucemia prolinfocítica de células B

Linfoma da zona marginal esplênica

Leucemia de células pilosas

Linfoma/leucemia esplênica, inclassificável:

- Linfoma esplênico difuso de pequenas células B da polpa vermelha

- Leucemia de células pilosas (variante)

Linfoma linfoplasmático:

- Macroglobulinemia de Waldenström

Doenças da cadeia pesada (Alfa, Gama e Mu)

Mieloma de plasmócitos

Plasmocitoma solitário ósseo

Plasmocitoma extraósseo

Linfoma de células B da zona marginal extranodal (MALT – *mucosa-associated lymphoid tissue*)

Linfoma de células B da zona marginal nodal (incluindo subtipo pediátrico)

Linfoma folicular (incluindo subtipo pediátrico)

Linfoma cutâneo primário centrofolicular

Linfoma de células do manto

Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) (sem outra especificação):

- rico em células T/histiócitos

- associados à infecção crônica

- Epstein-Barr+ ou de idosos

Granulomatose linfomatóide

Linfoma primário de grandes células B mediastinal (tímico)

Linfoma de grandes células B intravascular

Linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B (*leg type*)

Linfoma de grandes células B ALK+

Linfoma plasmablástico

Linfoma primário de efusão

Linfoma de grandes células B HHV8-positivo associado à doença de Castleman multicêntrica

Linfoma de Burkitt

Linfoma de células B, inclassificável, características intermediária entre LDGCB e linfoma de Burkitt

Linfoma de células B, inclassificável, características intermediária entre LDGCB e LH clássico

Linfoma de Hodgkin:

Predominância linfocítica nodular

LH clássico (esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos, depleção linfocítica)

---

Adaptado de Jaffe, 2009.



---

**Tabela 2** - Classificação das neoplasias de células T e *natural killer* (NK) maduras OMS
 

---

Leucemia prolinfocítica T  
 Leucemia linfocítica de grandes células T granulares  
 Desordem linfoproliferativa crônica de células NK  
 Leucemia agressiva de células NK  
 Doença linfoproliferativa sistêmica *Epstein-Barr*<sup>+</sup> de células T da infância  
 Linfoma hidroa vaciniforme  
 Linfoma/leucemia de células T do adulto  
 Linfoma extranodal de células NK/T (tipo nasal)  
 Linfoma de células T associado a enteropatia  
 Linfoma de células T hepatoesplênico  
 Linfoma de células T subcutâneo do tipo panuculite  
 Micose fungóide  
 Síndrome de Sézary  
 Desordem linfoproliferativa cutânea primária de células T CD30<sup>+</sup>  
 - Papulose linfomatóide  
 - Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas  
 Linfoma cutâneo primário de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas epidermotrópico agressivo  
 Linfoma cutâneo primário de células T gama/delta  
 Linfoma cutâneo primário de pequenas/médias células T CD4<sup>+</sup>  
 Linfoma de células T periféricas (sem outra especificação)  
 Linfoma angioimunoblástico de células T  
 Linfoma de grandes células anaplásicas, ALK<sup>+</sup>  
 Linfoma de grandes células anaplásicas, ALK<sup>-</sup>

---

Adaptado de Jaffe, 2009.

O LH é considerado um grupo de neoplasias incomum com prevalência de 1:50.000 habitantes (Mols *et al.*, 2006). Para o LNH, na década de 70, no Canadá, a prevalência era de 7,3 e 5,2 por 100.000 habitantes para homens e mulheres, respectivamente; já no período 1995-1996 a prevalência do LNH aumentou para 14:100.000 para os indivíduos do sexo masculino e 10:100.000 para os do sexo feminino (Liu *et al.*, 2003) No Brasil, a estimativa para 2009 foi de aproximadamente 4900 novos casos de LNH em indivíduos do sexo masculino e de 4200 nos do sexo feminino; para os LH a estimativa foi de 1600 para o sexo masculino e 1270 para o

feminino (Inca, 2010). Para os LNH de maior incidência, como é o caso do linfoma difuso de grandes células B, a média de idade ao diagnóstico é de 54 anos, com 25% dos pacientes acima dos 64 anos (Fisher *et al.*, 2004). Mais recentemente, Shenoy *et al.* (2010) avaliando cerca de 32.000 casos de linfoma difuso de grandes células B, em população caucasiana, observaram que a média de idade ao diagnóstico era de 65 anos. Entretanto, os autores descreveram que essa doença pode acometer ampla faixa etária, com mais ou menos 5% dos indivíduos em idade entre 18 e 30 anos, 7% entre 31 e 40 anos e 15% com idade variando de 41 a 50 anos. Um ano após a publicação desses dados, Shenoy *et al.* (2011) mostraram, também em população caucasiana de cerca de 23.000 indivíduos diagnosticados com LH, que a média de idade ao diagnóstico era de 42 anos. Dos casos de LH clássico, em torno de 12% apresentavam idade entre 11 e 20 anos, 21% entre 21 e 30 anos, 18% entre 31 e 40 anos e 14% entre 41 e 50 anos.

O tratamento dos linfomas tem como base o uso de múltiplas drogas, associadas, ou não, à radioterapia. Para os LH a utilização dos antineoplásicos adriamicina, bleomicina, vincristina e decarbazina (ABVD) é considerada como padrão ouro no tratamento e está relacionada à menor toxicidade a longo prazo, com taxas de cura que ultrapassam 85% para os estádios precoces da doença. (Meyer *et al.*, 2004; Klimm *et al* 2005). Já em 1985, Klimo & Connors acompanhando um grupo de 54 pacientes recém diagnosticados com LH de estadiamento avançado, observaram que 88% deles apresentaram resposta completa após 8 meses de tratamento com MOOP (mostarda nitrogenada, vincristina, procarbazina e predinisona)/ABV (adriamicina, bleomicina e vimblastina), não apresentando retorno da doença após o tratamento por período médio de 20 meses. No caso dos LNHs, especialmente o linfoma difuso de grandes células B, a associação dos antineoplásicos ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (CHOP) tem apresentado elevadas taxas de resposta e cura, sendo menos comuns as reações tóxicas fatais.

Adicionalmente, a associação dessas drogas com o rituximab (anticorpo monoclonal anti-CD20) parece incrementar as taxas de resposta e cura para os LNHS derivados de células B (Flowers *et al.*, 2010). Recentemente, Fisher *et al.* (2004) revisaram diversos protocolos de tratamento para o linfoma difuso de grandes células B agressivo e observaram que 69% dos pacientes acima de 60 anos e com doença localizada não apresentavam sinais da neoplasia em um período de 5 anos após o tratamento com 4 ciclos de CHOP. Esses autores mostraram, também, que após 2 anos de tratamento com 4 infusões de rituximab e 3 ciclos de CHOP apenas 10% dos pacientes tiveram o retorno da doença. Embora o tratamento com CHOP apresente respostas favoráveis para os LNHS de células B, o mesmo não foi observado para os de células T, uma vez que essas neoplasias representam doenças distintas. Assim sendo, os inibidores das desacetilases histônicas parecem ser os agentes mais promissores para o tratamento dos LNHS de células T (Horwitz, 2010; Dunleavy *et al.*, 2010).

Tanto para os LHs quanto para os LNHS a radioterapia é utilizada no caso da neoplasia localizada ou, em casos avançados, quando houver massa com volume superior a 10 cm. O campo de irradiação limita-se ao local acometido, como forma de reduzir o efeito tóxico do tratamento. Além disso, devido à radiosensibilidade dos linfomas indolentes, o tratamento localizado, utilizando-se baixas doses de radiação, tem apresentado taxas de resposta completa em torno de 55% (Ganen *et al.*, 2010). Embora a combinação do protocolo ABVD com a radioterapia confira maior controle da doença, os pacientes são mais susceptíveis aos efeitos deletérios tardios do tratamento, como o desenvolvimento de neoplasias secundárias (decorrentes do tratamento) e cardiotoxicidade (Meyer *et al.*, 2004).

Os progressos obtidos em relação ao tratamento do câncer são inquestionáveis, no entanto, os pacientes expostos à radiação ionizante e a drogas antineoplásicas podem apresentar

taxas aumentadas de mutações gênicas e cromossômicas que, mais tarde, podem ser responsáveis pela iniciação de novos processos carcinogênicos (Felix *et al.*, 1998; Ahuja *et al.*, 2000). Considerando, portanto, os possíveis efeitos adversos dos agentes antitumorais, diversos estudos epidemiológicos buscaram correlacionar o aumento da incidência de neoplasias secundárias (NS) aos protocolos antineoplásicos que utilizam a radiação e a poliquimioterapia, ou a combinação de ambos. Bilban-Jakopin (2001) avaliando os protocolos MOOP/ABV e MOOP/ABV associado à radioterapia para o tratamento do LH, observaram que 6 meses após o término dos tratamentos, eram ainda detectadas nos linfócitos aumentos de aberrações cromossômicas, micronúcleos e trocas entre cromátides irmãs (TCI). Além disso, foi observado que os indivíduos submetidos, também, à radioterapia apresentavam número de cromossômicos dicêntricos, fragmentos acêntricos e quebras cromossômicas significativamente maiores que os indivíduos submetidos apenas à quimioterapia. Com base nesses dados, os autores postularam a possível relação entre o aumento de danos cromossômicos e o desenvolvimento de neoplasias secundárias. Dois anos mais tarde, Ryabchenko *et al.* (2003) evidenciaram o aumento de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes com história de LH, que haviam finalizado o tratamento antineoplásico há, em média, 16 anos. Além disso, observaram que linfócitos desses pacientes, expostos *in vitro* à bleomicina, apresentavam frequências aumentadas de TCI quando comparados às células de indivíduos saudáveis (controles). Esses autores detectaram, ainda, que os pacientes com maior sensibilidade à bleomicina, eram aqueles que apresentaram neoplasias secundárias (mama, tireóide, laringe e condrosarcoma). Diante dessas informações, os autores sugeriram que o aumento de danos cromossômicos nesses indivíduos poderia ser decorrente de um quadro de instabilidade genômica nos precursores hematopoiéticos expostos à terapia antineoplásica.

Alguns fatores como a idade ao diagnóstico e a predisposição genética, juntamente com o tipo do tratamento, podem, também, estar relacionados ao desenvolvimento de NS (van Leeuwen *et al.*, 1994; Relling *et al.*, 1999; Neglia *et al.*, 2001). O aumento da sobrevida devido a progressos no tratamento de tumores diagnosticados durante a infância aumenta a probabilidade de desenvolvimento de NS, ao passo que pacientes diagnosticados em idades mais avançadas podem ir a óbito antes do desenvolvimento de um novo tumor (Neglia *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2006). Segundo Neglia *et al.* (2001), pacientes diagnosticadas com LH entre 10 e 16 anos e submetidas a radioterapia, apresentam risco aumentado de desenvolvimento de tumores de mama, devido, principalmente, ao desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade e adolescência. Em estudo envolvendo 1939 pacientes diagnosticados com LH, van Leeuwen *et al.* (1994) observaram, após 15 anos de acompanhamento, risco relativo de 11,4 e 41,9 para o desenvolvimento de tumores mamários, respectivamente, para mulheres diagnosticadas antes dos 30 e antes dos 20 anos de idade, associando tais tumores a efeitos da radioterapia. Além disso, esses autores evidenciaram risco relativo aumentado para o desenvolvimento de leucemia aguda não linfocítica no período de 5 a 9 anos após o tratamento, sugerindo a relação dessa nova neoplasia à quimioterapia, independentemente da radioterapia.

Dentre as NS mais frequentes destacam-se as leucemias agudas não linfocíticas, e tumores sólidos como os cerebrais, de tireóide, bexiga, mama, pulmão, colorretal e de cabeça e pescoço. ( Neglia *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2003; Mertens *et al.*, 2004; Moser *et al.*, 2006; Maule *et al.*, 2007). Maule *et al.* (2007) avaliaram 16.540 crianças com diagnóstico de leucemias, LHs ou LNHS durante o período de 1943 e 2000, com média de seguimento de 6,5 anos. Os pesquisadores observaram que as NS de maior incidência para os pacientes com leucemias foram os tumores cerebrais, de tiróide e os LNHS; para os diagnosticados com LHs, as mais comuns

foram os tumores mamários e os de pele não-melanoma; para os pacientes com LNHS, foi observada maior incidência de tumores cerebrais e de tireóide. Em 2003, Klein *et al.* relataram que a administração de altas doses de ciclofosfamida, cisplatina e a associação de mercaptopurinas com dexametasona aumentava, significativamente, o risco de desenvolvimento de NS, sendo a média do tempo de indução a partir do diagnóstico da neoplasia primária de 3,3 anos para as leucemias e 6,5 anos para os tumores sólidos. Além das NS, outras complicações relacionadas ao tratamento, como supressão medular, infecções, efeitos cardiopulmonares, distúrbios de crescimento, disfunção gonadal, hipotireoidismo, foram também descritas (Kelly & Perentesis, 2002; Chow *et al.*, 2006; Hoening *et al.*, 2007). Complicações gestacionais como abortos espontâneos, má posição fetal e baixo peso do recém-nascido, foram observadas em mulheres submetidas a terapias antineoplásicas durante a infância (Hudson, 2010). Por outro lado, Mardnat-Harjuoja *et al.* (2010) descreveram que a incidência de neoplasia em descendentes de pacientes diagnosticados na infância, ou no início da idade adulta, é similar ao da população em geral, não havendo, portanto, efeito das terapias antineoplásicas na incidência de câncer na descendência.

### ***1.2- Mecanismos de ação das terapias antineoplásicas***

As terapias antineoplásicas possuem diferentes mecanismos de ação, podendo atuar diretamente sobre a molécula de DNA ou sobre outras macromoléculas como proteínas e lipídeos, causando citotoxicidade ou promovendo apoptose. As antraciclina (doxorubicina, daunorubicina, entre outras) são transportadas até o núcleo da célula por meio da ligação a complexos protéicos (proteossomas) responsáveis pela degradação não lisossômica de diversas proteínas importantes para o metabolismo celular. Tal ligação promove a inibição reversível do

complexo protéico, e, desta forma, ocorre ativação do processo apoptótico devido à diminuição da degradação de proteínas envolvidas nesta via. Uma vez dentro do núcleo, as antraciclinas induzem a estabilização da topoisomerase no momento em que cliva o DNA, promovendo aumento substancial de danos no DNA por impedir a junção das extremidades clivadas, levando à apoptose por meio da ativação do gene *TP53*. Além disso, as antraciclinas promovem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), por meio do ciclo de oxi-redução da molécula e pela liberação de ferro dos reservatórios intracelulares, induzindo lesões oxidativas no DNA. A formação de ERO mediada pelo ferro permite, por exemplo, que a doxorrubicina interaja com fontes de carbono provenientes de lipídeos, levando à formação de formaldeído. Este, por sua vez, conjuga-se a outras moléculas de doxorrubicina, com conseqüente formação de ligações cruzadas (*crosslinks*) na molécula de DNA, as quais promovem efeito citotóxico (Minotti *et al*, 2004). A indução de danos no DNA por compostos antineoplásicos pode ativar a via NFκB (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) que suprime a apoptose dependente da mitocôndria por meio da indução transcricional de genes como o *BCL-2*, consistindo-se, assim, em um dos mecanismos de resistência tumoral à terapia (Lee *et al.*, 2010). Entretanto, a capacidade de ligação do NFκB ao DNA é dependente da integridade dos microtúbulos do citoesqueleto. Desta forma, a administração de compostos com capacidade de desestabilizar os microtúbulos, como é o caso da vimblastina e vincristina, sensibiliza as células neoplásicas à ação das antraciclinas e outros antineoplásicos (Lee *et al*, 2010).

A bleomicina, outro agente antitumoral, é um glicopeptídeo que se torna ativo após a reação com o ferro e o oxigênio ou o peróxido de hidrogênio, promovendo quebras de fita simples e dupla na molécula de DNA (Akiyama *et al.*, 2008; Liu *et al*, 2010). A prednisona, por sua vez, é um glucocorticóide antitumoral que atravessa a membrana plasmática por meio de

difusão simples, ligando-se aos receptores de glucocorticóides (RG) citoplasmáticos que se apresentam na forma de heterodímeros com proteínas da classe das chaperonas. Após a ligação, a prednisona dissocia-se do complexo de chaperonas, migra para o núcleo na forma de homodímeros e monômeros e liga-se a sítios específicos do DNA inibindo a ativação transcricional mediada pelo NFκB, a produção de citocinas e a parada do ciclo celular e apoptose (Inaba & Pui, 2010). A ciclofosfamida, agente antineoplásico frequentemente utilizado para o tratamento de linfomas, se torna ativa após metabolização hepática por enzimas do citocromo P450, formando o composto alquilante fosfaramida mostarda, que inibe a DNA polimerase e promove alquilação, quebras de fita simples e formação de *crosslinks* no DNA (Brock, 1989). Além disso, a ciclofosfamida promove o aumento da expressão protéica de p53 e diminui a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (Singh *et al.*, 2009). Outro agente antitumoral que se torna ativo apenas após a metabolização por enzimas do citocromo P450 é a dacarbazina. Esta dá origem ao composto metildiazônio, que promove a metilação de bases do DNA com formação da O<sup>6</sup>-metilguanina. Após um ciclo de divisão celular a O<sup>6</sup>-metilguanina pareia-se erroneamente com timina e, na tentativa de reparo dessa lesão, ocorrem falhas (*gaps*) na fita recém sintetizada que podem ser convertidas em quebras de fita dupla no DNA, culminando com a ativação de vias de apoptose (Bignami *et al.*, 2000; Marchesi *et al.*, 2007).

Conforme citado anteriormente, a radioterapia complementa a quimioterapia, exercendo seu efeito nocivo a células e tecidos por meio da formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Tais moléculas induzem lesões oxidativas no DNA, levando a formação de quebras de fita simples e dupla, e promovem lipoperoxidação das membranas celulares (plasmática e de organelas) que resultam em alterações funcionais e estruturais, as quais, por sua vez, podem promover a indução de genes relacionados às vias de apoptose (Girdhani *et al.*, 2005). Em estudo



realizado com pacientes diagnosticados com linfoma folicular foi demonstrado que a radioterapia em baixas doses promove, nas células neoplásicas, aumento da expressão de genes relacionados às vias da apoptose como, por exemplo, os genes *PUMA*, *BAX*, *NOXA*, *TRAIL-R2* e *FAS* (Knoops *et al.*, 2010).

Além da quimio e radioterapias, atualmente anticorpos monoclonais vêm também sendo utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer. Além de menos tóxicos, os anticorpos podem atuar sobre proteínas específicas das células neoplásicas, como, por exemplo, os inibidores de CD20 (rituximab) e CD47. Estes atuam promovendo a morte da célula tumoral por meio da indução direta do processo de apoptose, citotoxicidade mediada pelas células *natural killer*, pela ação do sistema complemento, além de promoverem a fagocitose da célula tumoral mediada por macrófagos (Chao *et al.*, 2010; Keating, 2010; Flowers *et al.*, 2010).

### ***1.3- Sistemas de reparo do DNA***

Os sistemas de reparo do DNA são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, reduzindo erros que podem ocorrer no processo de duplicação e recombinação anômala, e danos induzidos por agentes endógenos e exógenos. Tais alterações, se não reparadas com precisão, podem interferir nos processos de transcrição gênica, levar à expressão de proteínas anômalas e modular, diferencialmente, funções celulares importantes, como a divisão e a regulação do ciclo celular (Benhamou & Sarasin, 2000, Joseph *et al.*, 2005).

A extensão e os tipos de lesões no DNA são bastante variados, o que torna necessária a existência de diversas vias de reparo da molécula. Dentre essas, destacam-se o reparo por excisão

de bases (BER; *base excision repair*), que corrige bases modificadas e quebras de fita simples; o reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*), que corrige aductos extensos; o reparo de erros de pareamento de bases e de *loops* de inserção/deleção (MMR; *mismatch repair*); o reparo de quebras de fita dupla por recombinação homóloga (HR; *homologous recombination*); e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ; *non-homologous end joining*).

As vias de reparo do DNA são reguladas por diversos genes, dentre os quais *XRCC1*, *hOGG1*, *ERCC1*, *hMSH2*, *hMLH1* e *hMTH1* (Madhusudan & Middleton, 2005). O gene *X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1)*, localizado no braço curto do cromossomo 19, codifica a proteína de mesmo nome, que está envolvida no reparo de quebras de fita simples pela via BER, inclusive de danos no DNA induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) e por agentes ionizantes e alquilantes (Lei *et al.*, 2002; Tumer *et al.*, 2010). Os aductos 7,8-diidro-8-oxoguanina (8oxoG), um dos tipos mais comuns de lesões oxidativas, são resultantes da interação da 8-oxo-7,8-diidrodexoxiguanosina trifosfato (8-oxo-dGTP) com a molécula de DNA e podem originar mutações do tipo transversões (G:C → T:A) após a duplicação da molécula (Shibutani *et al.*, 1991). Uma das vias para se prevenir os danos causados pelas 8oxoG é a hidrolização da 8-oxo-dGTP à 8-oxo-GMP, mediada pela proteína hMTH1 expressa pelo gene *Human MutT Homologue 1* da via *mismatch repair (hMTH1)*, impedindo sua ligação ao DNA e a conseqüente formação de 8oxoG (Furuichi *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 2003). Outra via de reparo desse tipo de lesão no DNA é mediada pela 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 humana (hOGG1), que atua removendo a 8oxoG do DNA pelo mecanismo de BER. Em células humanas, o gene *hOGG1*, localizado no braço curto do cromossomo 3, codifica 2 formas da proteína hOGG1 que resultam

de *splicing* alternativo de RNAm; a proteína hOGG1 alfa, que se localiza no núcleo, e a forma beta, que encontra-se nas mitocôndrias (Boiteux & Radicella, 2000; Janssen *et al.*, 2001).

As translocações cromossômicas, que estão sempre presentes na maioria dos LNHS, podem também ser originadas por deficiências nos mecanismos de reparo de DNA. Dentre essas, destacam-se a fusão dos genes *BCL2* e *IgH*, presente em 80% dos linfomas foliculares e 57% dos linfomas difusos de grandes células B (Fan & Rizkalla, 2003). Enquanto algumas translocações podem ter origem em reparos errôneos de quebras de fita dupla induzidas, por exemplo, pela radiação ionizante, alterações em processos endógenos como a recombinação dos segmentos gênicos V (*variable*), D (*diversity*) e J (*joining*), no *locus* da imunoglobulina (Ig), podem também contribuir para rearranjos cromossômicos. Esse processo de recombinação é um dos responsáveis pela variabilidade na produção de anticorpos e ocorre por meio da indução de quebras de fita dupla orientadas pelas seqüências sinalizadoras da recombinação (RSS, *Recombination Signal Sequences*), localizadas adjacentes a tais segmentos. As quebras de fita dupla ocorrem pela ação do complexo protéico RAG (RAG1 e RAG2), enquanto a posterior união dos segmentos, pela ação de várias proteínas do sistema NHEJ, destacando-se o complexo Ku70/Ku86, com alta afinidade por extremidades livres do DNA e responsável pelo recrutamento de outros complexos protéicos como DNA-PKcs, XRCC4 e DNA ligase IV. Assim, as alterações nos genes codificadores das proteínas envolvidas nesta via de reparo podem ser consideradas eventos cruciais para a gênese do linfoma (Jäger *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2004; Lieber *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2006)

Recentemente, Hill *et al.* (2006) avaliando o polimorfismo de 19 genes relacionados a cinco vias de reparo do DNA em indivíduos com diversos tipos de LNHS observaram que os genes relacionados às vias NHEJ e de recombinação V (D) J, respectivamente os genes *LIG4* (DNA ligase IV) e *RAG1* (*recombination-activating gene 1*), poderiam alterar o risco para o

desenvolvimento de LNHs. Além disso, a presença da variante alélica *XRCC1 194 W*, conferiu aumento de 1,4 vezes no risco de desenvolvimento de LNH. Da mesma forma, Wang *et al.* (2006) e Lan *et al.* (2007) investigaram se os polimorfismos dos genes relacionados ao estresse oxidativo poderiam estar associados ao desenvolvimento de LNHs. Nesses dois estudos foram avaliados genes envolvidos no aumento da síntese de ROS como, por exemplo, os genes *NOS2A* (*óxido nítrico sintetase*) e os da superfamília *AKR* (aldo-ceto redutase), além daqueles responsáveis pela defesa endógena contra a formação de ROS e de lesões genotóxicas, dentre os quais, os genes *SOD* (superóxido desmutase), *MPO* (mieloperoxidase) e *hOGG1*. Os resultados mostraram que, de um modo geral, os genes relacionados ao estresse oxidativo - *NOS2A*, *AKR1A1*, *CYBA* (*citocromo b-245*) - podem alterar o risco de desenvolvimento de LNHs, especialmente dos linfomas de maior incidência, como o difuso de grandes células B e o linfoma folicular, confirmando, assim, o importante papel do estresse oxidativo na gênese do linfoma. Mais recentemente, Kim *et al.* (2010a) observaram que a variante polimórfica homozigota do gene *hOGG1* (Cys326Cys) estava relacionada à proteção contra a progressão tumoral em pacientes com carcinoma urotelial invasivo, embora os mecanismos envolvidos nessa proteção não tivessem sido elucidados. Zhang *et al.* (2010), avaliando o mesmo polimorfismo, observaram que os indivíduos heterozigotos (Ser326Cys) apresentavam risco diminuído de desenvolvimento de câncer de próstata, ao passo que uma ou duas cópias da variante polimórfica do gene *XRCC1* (*códon 399*) conferia risco aumentado para o desenvolvimento de tal neoplasia. Além desses, outros estudos mostraram que as variantes polimórficas do gene *XRCC1* para os *códons 399* e *194* estão associadas ao risco de desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda, LH e LNH (linfoma difuso de grandes células B). Entretanto, no caso do LNH não foi demonstrada a relação de tais polimorfismos com a resposta aos tratamentos (El-Zein *et al.*, 2009; Tumer *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010b).

Os genes envolvidos nas vias de reparo do DNA podem, também, estar relacionados à eficácia dos tratamentos antineoplásicos, uma vez que os efeitos citotóxicos e genotóxicos induzidos pelos agentes terapêuticos estão associados à capacidade das células em reverter tais danos (Madhusudan & Middleton, 2005). Em 2004, Mertens *et al.* avaliaram, além dos genes de metabolismo *GSTM1* e *GSTT1*, o papel do gene *XRCC1* no risco relativo de desenvolvimento de neoplasias secundárias em indivíduos com LH na infância e adolescência, e que apresentaram sobrevida acima de cinco anos após o tratamento. Nesse estudo, os autores observaram que a perda do gene *GSTM1* estava correlacionada ao aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias secundárias, e que o polimorfismo no códon 399 do gene *XRCC1* estava relacionado ao aumento, embora não significativo, do risco de desenvolvimento de câncer de mama e à diminuição (não significativa) do risco de desenvolvimento de carcinoma de tireóide.

Além do polimorfismo dos genes de reparo poder estar envolvido na modulação do risco de desenvolvimento de linfomas e de neoplasias relacionadas a tratamentos prévios, a diminuição dos níveis de expressão desses genes pode, também, interferir na incidência de danos no DNA e, conseqüentemente, no risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas a mutações genéticas. Contudo, são ainda escassos os dados na literatura referentes à expressão de RNAm para os genes *XRCC1* e *hOGG1* em pacientes com câncer, especialmente quando se refere aos efeitos tardios decorrentes dos protocolos terapêuticos. Alguns estudos mostraram o aumento da expressão de RNAm para o gene *hOGG1* em indivíduos cronicamente expostos ao arsênio e em pacientes com leucemia aguda antes de qualquer terapia (Mo *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Além disso, o aumento dos níveis de expressão do gene *XRCC1* foi observado em pacientes com câncer colorretal, quando se comparou o tecido tumoral ao tecido normal adjacente (Yu *et al.*, 2006). Sudprasert *et al.* (2006) avaliando os efeitos toxicogênicos da radiação  $\gamma$  (5 – 50 Gy) sobre

células sanguíneas *in vitro*, observaram que o nível de expressão dos genes *XRCCI* e *hOGGI* era inversamente proporcional às doses e à indução de bases oxidadas no DNA (sítios FPG-positivos). Além disso, os pesquisadores demonstraram que a radiação  $\gamma$  pode diminuir a expressão dos genes de reparo aumentando o nível de danos no DNA, embora por mecanismos moleculares ainda não totalmente conhecidos. Portanto, a avaliação de lesões no DNA tem se mostrado útil para a predição da sensibilidade de células neoplásicas e não neoplásicas (provenientes de pacientes diagnosticados com câncer) à radiação e a compostos antineoplásicos, com possível aplicação na prática clínica, a fim de prever o comportamento do tumor e os possíveis efeitos deletérios para os pacientes frente às terapias prescritas (McKenna *et al.*, 2008). Alapetite *et al.* (1999) relataram que pacientes com câncer de mama ou LH, que apresentavam reações severas à radioterapia (reações esofágicas, disfunção pulmonar, doença cardiovascular, dentre outros), também apresentavam reparo ineficiente das lesões induzidas *in vitro* pela radiação em linfócitos de sangue periférico. Outros estudos também demonstraram o aumento de lesões genotóxicas em células germinativas, epiteliais e sanguíneas em pacientes com câncer, antes ou após o término da terapia, correlacionando a doença ou o efeito residual das terapias antineoplásicas ao aumento dos danos no DNA (Gontijo *et al.*, 2002; Nadin *et al.*, 2006; Spermon *et al.*, 2006; Lorenzo *et al.*, 2009).

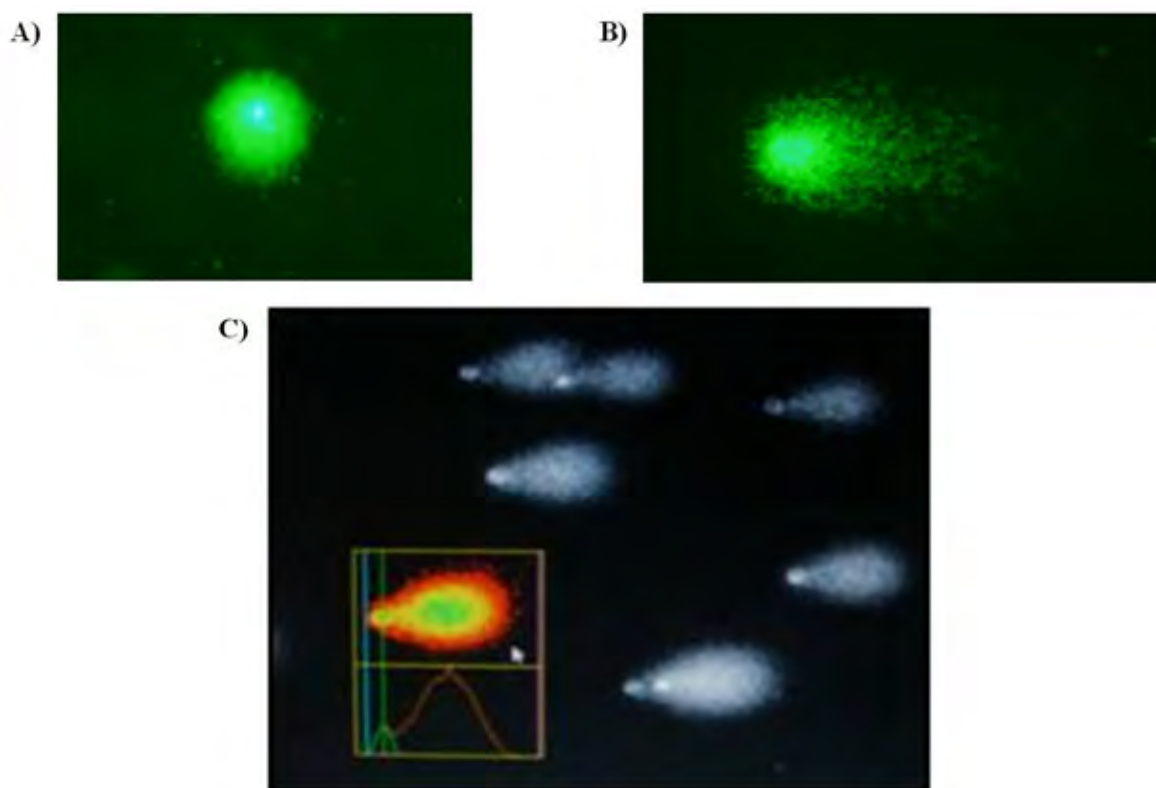
#### ***1.4- Avaliação de efeitos toxicogenômicos e de variantes gênicas***

A Toxicogenômica é o campo da ciência que estuda os efeitos de agentes endógenos e exógenos sobre a estrutura e a função do genoma, combinando dados clínicos, da genômica funcional, da proteômica e da metabolômica em uma estrutura unificada, para o entendimento da

base genética de várias doenças (Olden *et al.*, 2001; Aardema & MacGregor, 2002; Hamadeh *et al.*, 2002; Simmons & Portier, 2002). As metodologias empregadas na Toxicogenômica permitem, por exemplo, o entendimento da relação entre exposições ambientais a agentes genotóxicos e a susceptibilidade a doenças, além de permitir a identificação de biomarcadores genéticos de patologias.

A primeira quantificação direta dos danos no DNA em células individualizadas foi realizada por Ryderberg & Johanson (1978). Esses pesquisadores submeteram células a condições levemente alcalinas que promovem o desenrolamento parcial da molécula do DNA e, assim, permitem a visualização dos danos ao microscópio. Posteriormente, Ostling & Johanson (1984) aumentaram a sensibilidade da técnica submetendo células embebidas em agarose à microeletroforese em condições neutras, o que permitiu a detecção de quebras de fita dupla de DNA. Mais tarde, com a utilização de condições altamente alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ) de eletroforese tornou-se possível, também, a detecção de quebras de fita simples e sítios alcali-labéis no DNA, aumentando, ainda mais, a sensibilidade da técnica (Singh *et al.*, 1988). Collins *et al.* (1993) com a introdução, na metodologia, de duas enzimas bacterianas (endonuclease III – endo III; formamido pirimidina DNA glicosilase – FPG) que reconhecem e clivam o DNA, respectivamente no local de pirimidinas e purinas oxidadas, tornaram possível a quantificação de lesões oxidativas na molécula. Após imersão de células eucarióticas em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos e posterior eletroforese, os nucleóides com frequência aumentada de quebras no DNA apresentam maior taxa de migração da molécula em direção ao ânodo. Após coloração com fluorocromos DNA-específicos é possível visualizar em microscópio de fluorescência, figuras semelhantes a um cometa (Figura 2), o que levou Olive (1989) a sugerir o nome *Comet Assay* para a técnica também conhecida por *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*.

O teste do cometa, além de detectar quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas, permite, também, avaliar alterações no sistema de reparo do DNA (Collins *et al.* 1998; Tice *et al.*, 2000). Dentre as principais vantagens do teste do cometa destacam-se a necessidade de apenas pequeno número de células (não necessitando células em divisão), a simplicidade, a rapidez para a obtenção dos resultados, a sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA e a flexibilidade, uma vez que pode ser utilizado para qualquer população de células, necessitando, apenas, de células viáveis (Gontijo & Tice, 2003).



**Figura 2** – Imagem de nucleóides (linfócitos de sangue periférico) não apresentando danos (A) e com níveis aumentados de danos no DNA (B), ambos corados com SYBR<sup>®</sup> Gold (diluição 1:10.000). C) Imagem processada pelo *software Comet Assay IV*. Aumento de 400X.



Shen *et al.* (1998) foram os primeiros a reportar variantes dos genes de reparo, identificando cinco polimorfismos do gene *XRCC1*. A partir de então, vários pesquisadores iniciaram estudos, *in vivo* e *in vitro*, buscando determinar a possível associação entre os genes envolvidos nas vias de reparo do DNA e o desenvolvimento de diferentes patologias, utilizando, para isso, a metodologia de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Abdel-Rahman *et al.*, 2000; Ratnasinghe *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Rossit *et al.*, 2002). O princípio da técnica baseia-se na amplificação das sequências exônicas que contém os polimorfismos de base única a partir do DNA genômico por meio da utilização de pares de *primers* específicos. Posteriormente, é feita a digestão dos fragmentos amplificados (*amplicons*) utilizando-se enzimas de restrição de origem bacteriana. Essas enzimas clivam os *amplicons* nos sítios de restrição que contém a base alterada e, após a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, pode-se diferenciar os genótipos por meio do tamanho dos fragmentos gerados após a restrição (Deng, 1988).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR), por sua vez, é uma técnica que permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA e RNA por meio de um único sistema, que monitora os produtos amplificados por meio da detecção da fluorescência emitida durante os ciclos da reação de PCR. A possibilidade de monitorar a quantidade amplificada a cada ciclo e de quantificar o produto durante a fase exponencial confere maior precisão e reprodutibilidade à técnica. Desta forma, este tem sido o método de escolha para a análise de expressão gênica quando o estudo requer sensibilidade, especificidade e quantificação reprodutível de RNAm, além da simplicidade e rapidez para a avaliação da expressão gênica (Bustin, 2000).

## 2- OBJETIVOS

Considerando a incidência de linfomas e neoplasias secundárias na população, o grande número de pacientes submetidos a terapias antineoplásicas com potencial genotóxico e a relação direta entre alterações genéticas e a carcinogênese, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos toxicogenômicos tardios de protocolos terapêuticos antitumorais utilizados em pacientes com história de linfoma. De maneira geral, a proposta era contribuir para a elucidação de mecanismos relacionados à gênese de neoplasias secundárias e para o estabelecimento de estratégias terapêuticas menos tóxicas para o paciente. Para isso, foram incluídos no estudo pacientes recém-diagnosticados com linfoma (portanto, antes de qualquer terapia) e pacientes que finalizaram o tratamento há pelo menos três anos. Os parâmetros investigados foram:

- os níveis de danos no DNA;
- o padrão de expressão dos genes de reparo do DNA, *XRCC1* e *hOGG1*;
- a relação entre os níveis de danos no DNA e a expressão dos genes *XRCC1* e *hOGG1*;
- a relação entre os polimorfismos dos genes *XRCC1* e *hOGG1* e os níveis de danos no DNA.

### 3- MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

#### **Toxicogenomic late effects of antineoplastic therapies for lymphomas**

##### **Introduction**

Lymphomas are heterogeneous malignancies that arise in nodal sites with or without extranodal involvement (Fisher *et al.*, 2004). The therapies for such diseases use different drugs associated or not to radiation. Polychemotherapy with adriamycin, bleomycin, vincristine and dacarbazine (ABVD) is a gold standard used for Hodgkin's Lymphoma (HL). It is related with less long-term toxicity with cure rates above 85% for early stages (Meyer *et al.*, 2004; Klimm *et al.*, 2005). For Non-Hodgkin Lymphoma (NHL), mainly diffuse large B cell lymphoma, combination of cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin and prednisone (CHOP) has presented high complete response and cure rates with less fatal toxic reactions. Furthermore, the CHOP plus rituximab (monoclonal antibody anti-CD20) treatment have improved patient outcomes (Fisher *et al.*, 2004; Flowers *et al.*, 2010).

However, it is known that antineoplastic therapies can induce genetic mutations in somatic cells, which could be related to development of second malignancies (SM) (Felix *et al.*, 1998; Ahuja *et al.*, 2000). Maule *et al.* (2007), through a large database from population-based cancer registries (follow-up of 6.5 years) have observed a total of 133 SM in survivors of childhood leukemia, and Hodgkin and Non-Hodgkin lymphomas. The most frequent SM were brain cancer, NHL and thyroid cancer for leukemia patients; thyroid, breast and non-melanoma cancers for HL patients; and thyroid and breast cancer for NHL patients. Furthermore, it has been described associations between SM and radiotherapies (mainly brain, thyroid, breast, skin tongue and salivary glands tumors) and SM and chemotherapies (acute nonlymphocytic leukemia and bladder cancer) (Maule *et al.*, 2007).

Antineoplastic treatments can act on cancer cells by different ways. They can promote cytotoxicity and apoptosis by inducing directly or indirectly DNA strand breaks and crosslinks; lipoperoxidation of cellular membranes and oxidative DNA lesions through reactive oxygen species (ROS) production; inhibition of proteins involved on cell metabolism; changes on the expression of key genes (Minotti *et al*, 2004; Singh *et al*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Inaba & Pui, 2010; Liu *et al*, 2010). DNA lesions, if not repaired, can interfere with the DNA replication, and transcription, and alter critical cell functions such as cell cycle regulation and cell division (Benhamou & Sarasin, 2000; Joseph *et al.*, 2005). The protein encoded by the X-ray cross-complementing group 1 (*XRCCI*) gene is involved in base excision repair (BER) pathway, and efficiently repair oxidized and reduced bases, DNA adducts and single strand breaks caused by ROS, alkylating agents and ionizing radiation (Zdzienicka *et al.*, 1992; Lei *et al.*, 2002). *hOGG1* (human 8-hydroxydeoxyguanosine glycosylase 1), other BER gene, is responsible for repairing 8oxo-guanine DNA lesion, the most abundant oxidized DNA damage (Shibutani *et al.*, 2001). It has been reported that polymorphisms of *hOGG1* and *XRCCI* genes, resulting in nonconservative amino acid changes, can modulate protein-protein interactions or catalytic activity of protein with consequent inefficient repair activity (Zhang *et al.*, 1998; Lunn *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2004). However, some controversial results regarding functional properties of the polymorphisms on these genes are also described in literature (Poplawski *et al.*, 2006; Wozniak *et al.*, 2009; Kiyohara *et al.*, 2010; Sterpone *et al*, 2010). *hOGG1* Cys<sup>326</sup>Cys polymorphism was related to protection against bladder tumor progression and the heterozygote variant (*Ser*<sup>326</sup>Cys) with decreased risk for prostate cancer development (Kim *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010). On the other hand, polymorphisms at codons 194, 280 and 399 of *XRCCI* gene were associated with

increased risk for prostate cancer, acute lymphoblastic leukemia, HL and NHL (diffuse large B cell lymphoma) (El-Zein *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Tumer *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010b)

The gene expression profile represents a new tool that will outperform the currently clinical parameters in predicting disease outcome, providing information for developing more effective therapies (van 'tVeer *et al.*, 2002). Although literature is scarce in relation *hOGGI* and *XRCCI* gene expression in cancer patients, some studies have showed increased *hOGGI* mRNA in leukemia patients before therapy (Zhou *et al.*, 2007). Furthermore, increased *XRCCI* mRNA expression has been also observed in the tumor tissue from colorectal cancer patients (Yu *et al.*, 2006). However, other studies have shown a deficient repair in cancer patients, and an increased level of endogenous DNA damage related to disease or to a residual effect of the antineoplastic treatment in germ, epithelial and blood cells (Alapetite *et al.*, 1999; Gontijo *et al.*, 2002; Nadin *et al.*, 2006; O'Flaherty *et al.*, 2008; Lorenzo *et al.*, 2009).

Therefore, based on previous described, the aim of the present study was to evaluate toxicogenomic late effects of antineoplastic therapies for lymphoma. DNA damage and DNA repair capability as depicted by the comet assay, *XRCCI* and *hOGGI* genes expression, the functional role of *XRCCI* (codons 280 and 399) and *hOGGI* (codon 326) polymorphisms on basal and induced DNA damage, were investigated.

## **Material and Methods**

### *Subjects*

This study was approved by the ethics committees of Botucatu Medical School, Amaral Carvalho Hospital – Jaú and Oncologic Pediatric Institute – São Paulo. Informed consent was obtained from all subjects. It was enrolled in the study a total of 14 patients (6 males and 8 females) diagnosed with lymphoma and before any antineoplastic treatment (pre-therapy group); 29 patients (17 males and 12 females) with history of lymphoma and that finished treatments at least three years ago (3 – 15 years; mean  $7 \pm 3$  years), therefore they were disease free (post-therapy group); and 29 healthy subjects (13 males and 16 females) matched for age and sex (control group). All the subjects had age ranged between 18 and 45 years. The patients were recruited from the Botucatu Medical School, Amaral Carvalho Cancer Hospital and Oncologic Pediatric Institute (IOP/GRAACC/UNIFESP); healthy subjects were from Botucatu – SP - Brazil and surrounding area. All participants answered a detailed questionnaire about personal (age, tobacco smoking, alcohol and drugs consumption habits, previous exposure to radiation and environmental pollutants) and medical data (intercurrent illness, medicine usage). Tumor diagnostic (histopathology) and treatment protocols were obtained from the medical records.

### *Blood sampling*

Peripheral blood sample (10 mL) was collected through venipuncture in EDTA tubes for immediately lymphocytes isolation and posterior genomic DNA extraction; and in PAXgene Blood RNA Tubes (Qiagen/PreAnalytiX, Switzerland), for RNA stabilization. These tubes were placed at room temperature for 12 h and, then, placed into a freezer at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; blood for DNA extraction was placed into a freezer at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until processing.

### *Chemicals*

Ficoll-Paque®, for lymphocyte isolation, was purchased from GE (Sweden); RPMI 1640 culture medium from Cultilab (Brazil); hydrogen peroxide (to induce oxidative-DNA damage) and boric acid were purchased from Merck (Germany); ethidium bromide from Sigma (USA); normal melting point (NMP) and low melting point (LMP) agaroses, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sodium hydroxide, blue juice, Tris and SYBR Gold® were purchased from Invitrogen (USA).

### *Lymphocyte isolation*

Lymphocytes were isolated in Ficoll-Paque® gradients according Braz & Salvadori (2007), with some modifications. Samples of peripheral blood (3 mL) were mixed with 3 mL of RPMI 1640 medium, layered in 3 mL of Ficoll-Paque, and centrifuged at 1100 x g for 30 min, at room temperature. The lymphocyte layer was removed, mixed with 4 mL of RPMI 1640, centrifuged at 400 x g for 15 min and resuspended in RPMI 1640. Lymphocytes were used for the comet assay.

### *Alkaline comet assay*

The protocol used for the comet assay followed the general guidelines proposed by Singh *et al.* (1988) and Tice *et al.* (1991), with some modifications. Every step was carried out under indirect light. Slides were coded and blindly analyzed. Volumes of 10 µL of fresh lymphocytes were added to 120 µL of LMP agarose at 37 °C. The mixtures were layered onto slides precoated with 1.5% of NMP agarose, covered with a cover slip, and left for 5 min at 4 °C to solidify the agarose. Afterwards, the cover slips were gently removed and the slides immersed, overnight,

into a cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, with pH 10, 1% Triton X-100, and 10% DMSO). Afterwards slides were exposed to a freshly prepared alkaline buffer (1mM EDTA, 300 mM NaOH with pH>13) in a horizontal electrophoresis tank. After 20 min DNA unwinding period, electrophoresis was conducted at 25 V and 300 mA for 30 min. Following 15 min neutralization with 0.4 M Tris (pH 7.5), the slides were fixed in absolute ethanol, and stored at 4 °C.

In the DNA repair experiments, cell treatments was performed according Piperakis *et al.* (2009a), with some modifications. Aliquots of isolated lymphocytes were treated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, for 5 min, at 4 °C. After this period, cells were washed twice with RPMI 1640, centrifuged for 4 min at 600 x g, and incubated at 37 °C for 2 h for repairing DNA damage. Two slides were made immediately after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and after the incubation period. The amount of repaired DNA damage were calculated according Vodicka *et al.* (2007) as a difference between the levels of DNA damage immediately after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the levels of DNA damage after 2h of incubation (without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Therefore, higher value of DNA damage is related to higher DNA repair capability. The comet assay was conducted as described above.

For analysis, the slides were stained with 60  $\mu$ L SYBR Gold® and the nucleoids scored in a fluorescent microscope under 400X magnification. Images from 100 nucleoids (two replicates) per patient or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment were measured using the Comet Assay IV Image System software (from Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolkm UK). Tail intensity (TI - % DNA in tail) was used to estimate DNA damage.



### *XRCC1 and hOGG1 genotyping*

Genomic DNA was extracted from whole blood using Illustra Blood genomic prep mini spin kit (GE, Sweden), according manufacturer's protocol. The concentration of genomic DNA was evaluated using the spectrophotometer NanoVue (GE, Sweden), and each sample was assessed for purity by absorbance at 260 and 280 nm (260/280 between 1.9 and 2.1). DNA integrity was assessed by 1.5% agarose gel using Tris/borate/EDTA buffer (TBE). DNA was stored at -20 °C until amplification.

The *XRCC1* and *hOGG1* genotypes were determined by PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism). For *XRCC1*, the exons 9 and 10, in which the polymorphic fragments *Arg*<sup>280</sup>*His* and *Arg*<sup>399</sup>*Gln* are located, were amplified using the following primer: F: 5'-TTG ACC CCC AGT GGT GCT AA-3' and R: 5'-GGC TGG GAC CAC CTG TGT T-3' (Lee *et al.*, 2001). The PCR amplification products were obtained using 25 µL reaction [0.2 µg of genomic DNA, 1X PCR buffer, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2µm each primer and 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen – USA)]. The reactions were carried out at the following thermocycle conditions: denaturation at 94°C for 4 min, 35 cycles of 40 sec at 94 °C, 30 sec at 50 °C and 40 sec at 72°C subsequently, followed by a 10 min extension period at 72°C. Following PCR, 10 µl aliquots were subjected to restriction digestion for 5 min at 37 °C, separately with 2 units of RsaI and MspI (FastDigest® - Fermentas, EU) for codons 280 and 399, respectively. The products were resolved on 2% agarose gels, stained with ethidium bromide. For the PCR product of codon 280, a restriction site of RsaI was created in the *Arg* allele and gave rise to products of 63, 201 and 597 bp, while the *His* allele gave the products of 201 and 660 bp. For the PCR product of codon 399, a restriction site of MspI was

created in the *Arg* allele and gave the products of 115, 285 and 461 bp, while the *Gln* allele gave the products of 285 and 576 bp.

For *hOGG1*, the exon 7, in which the polymorphic fragments *Ser*<sup>326</sup>*Cys* are located, were amplified using the primer as follow: F: 5'-AGG GGA AGG TGC TTG GGG AA-3' and R: 5'-ACT GTC ACT AGT CTC ACC AG-3' (Wang *et al.*, 2006). The PCR amplification products were obtained using 25 µL reaction [(0.2 µg of genomic DNA, 1X PCR buffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2µm each primer and 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen – USA)]. The reactions were carried out at the following thermocycle conditions: denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 20 sec at 94 °C, 20 sec at 61 °C and 40 sec at 72°C subsequently, followed by a 7 min extension period at 72°C. Following PCR, 10 µl aliquots were subjected to restriction digestion for 5 min at 37 °C separately with 2 units of Fnu4H (FastDigest® - Fermentas, EU). The products were resolved on 3% agarose gels, stained with ethidium bromide. A restriction site of Fnu4H was created in the *Ser* allele and gave rise to product of 200 bp, while the *Cys* allele gave the product of 100 bp. To assure PCR-RFLP quality, randomly selected 10% of samples were duplicate experiment for each polymorphism.

#### *Analysis of hOGG1 and XRCC1 mRNA by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)*

RNA was isolated with PAXgene Blood RNA kit according to manufacturer's protocol (Qiagen/PreAnalytiX, Switzerland), with DNase treatment. The concentration of total RNA was determined by spectrophotometer (NanoVue - GE, Sweden), and each sample was assessed for purity by absorbance at 260 and 280 nm (260/280 between 1.9 and 2.1). RNA integrity was assessed by 1.5% agarose gel using Tris/borate/EDTA buffer (TBE). RNA was stored at -80 °C until reverse transcription. RNA was reverse-transcribed (cDNA) with High Capacity cDNA

reverse Transcription kit according manufacturer's protocol (Applied Biosystems – ABI, USA). After this procedure samples was placed into freezer -20 °C until PCR. qRT-PCR was performed using Taqman FAM-MGB probes and primers, ordered as inventoried from ABI for the genes *XRCC1*(assay Hs00959834\_m1) and *hOGGI*(assay ID Hs00608023\_m1) with amplicon length 75 bp and 82 bp, respectively, and no genomic DNA was detected. After comparing three candidate genes for the endogenous control,  $\beta$ -actin (*ACTB*) was selected. *XRCC1* and *hOGGI* mRNA concentrations was normalized by the levels of  $\beta$ -actin (housekeeping gene), using also ABI primers and probes labeled at the 5' end with FAM as a reporter dye and 3' end with MGB as a quencher dye.

For amplification, Taqman Universal Master Mix (ABI) was used. A final 10  $\mu$ L volume was used for each reaction. Thermal cycling and real-time detection of the fluorescence were carried out in an ABI Prism 7500 Fast, using the following amplification parameters: denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 sec, and 60 °C for 60 sec. Negative control (no cDNA) in duplicate was added in each plate to ensure no contamination. For the control, it was used a pool of cDNA from healthy subjects. All controls were run simultaneously with the test samples throughout the experiments. Cycle threshold (Ct) values were determined as the cycle where ROX-normalized fluorescence over background was significantly above background levels. Fold induction was calculated using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (29 ref mari), where  $\Delta\Delta Ct = \text{average } \Delta Ct (\text{treated}) - \text{average } \Delta Ct (\text{control})$ ;  $\Delta Ct$  is a difference between Ct of the interest gene and Ct of  $\beta$ -actin. For each sample, it was determined the relative quantification (RQ) in comparison to the control samples. In the pool samples (control), RQ for both genes varied from 0.9 to 1.1. Based on these data, genes were considered up regulated when RQ from patients were  $\geq 1.5$ , and down-regulated when RQ  $< 0.5$ .

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out using SAS software, version 9.2. The DNA damage data and the effect of demographic variables and polymorphisms on DNA damage were analyzed through Gamma distribution considering a model of generalized distribution. One Way ANOVA was used for gene expression comparisons. Correlation between genes expression and DNA damage was analyzed through the Spearman Rank Order Correlation. Sex and age distributions were tested using the  $\chi^2$  test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### *Characteristics of the study population*

Demographic and medical data of the study population are presented in Table 1. There was no significant difference among the groups ( $p > 0.05$ ) in relation to the age and gender distribution. In the pre-therapy group, 10 (71.4%) patients were non-smokers, three (21.4%) current smokers and one (7.2%) was former smoker; in the post-therapy group, 23 (79.3%) were non-smokers, two (6.9%) current smokers and four (13.8%) were former smokers. The control group had 27 (93%) non-smokers, one (3.5%) current smoker and one (3.5%) former smoker. All patients in the post-therapy group were submitted to polychemotherapy, and just five were not submitted to radiotherapy. For patients submitted just to polychemotherapy (without radiotherapy), two (40%) of them received CHOP and three (60%) GBTLS (vincristine, doxorubicin, dexamethasone, cytarabine, methotretaxe, intrathecal dexamethasone, L-asparaginase.) treatments. For patients submitted to combined therapy (polychemotherapy and radiotherapy - 24 patients); 16 (66.7%) received ABVD alone, three (12.5%) received CHOP alone, and five (20.8%) ABVD plus MOOP (mechlorethamine, vincristine, procarbazine,

prednisone) and ESHAP (etoposide, methylprednisolone, cytarabine, cisplatin) treatments. All patients treated with combined therapy received 36 Gy (1.8 Gy per day, during 20 days) as the total dose of radiation; except two patients that received a total dose of 32.4 Gy and 40 Gy, respectively. The average time between the last antineoplastic treatment and recruitment was  $7 \pm 3$  years.

#### *DNA damage and repair capability*

Statistically significant ( $p < 0.01$ ) increases of DNA damage were detected in pre-therapy and post-therapy groups, when compared to the control group (Table II). No difference was observed between pre- and post-therapy. *In vitro* treatment with  $H_2O_2$  increased DNA damage in the three groups ( $p < 0.01$ ), however, both pre- and post-therapy groups presented lower level of damage, when compared to the control group ( $p < 0.01$ ); DNA damage was also lower in pre-therapy when compared to the post-therapy group ( $p < 0.05$ ). Significant decrease of damage ( $p < 0.01$ ) was observed in the three groups after the repairing period (2 hours; residual damage), however, the DNA lesions continued being higher ( $p < 0.01$ ) than before  $H_2O_2$  treatment (basal). When the repair capability was measured ( $H_2O_2$ -induced DNA damage minus residual damage), patients in post-therapy group showed statistically significant ( $p < 0.05$ ) higher level of DNA damage (lower repair capability) compared to pre-therapy patients and healthy subjects.

**Pre-therapy patients (n=14)****Gender:** Male (n=6) / Female (n=8)**Age (mean  $\pm$  standard deviation):** 30  $\pm$  8 years**Neoplasia:** HL (n=5) (35.7%) / NHL (n=9) (64.3%)

HL: nodular sclerosis (40%); mixed cellularity (20%); HL ws (40%)

NHL: large B-cell lymphoma ws (66.7%); small B-cell lymphoma ws (11.1%); LNH ws (22.2%)

**Smoking habit:**

Current smokers (n=3) / Former-smokers (n=1) / Non-smokers (n=10)

Cigarettes smoked per day (mean  $\pm$  sd): 14  $\pm$  8**Post-therapy patients (n=29)****Gender:** Male (n=17) / Female (n=12)**Age (mean  $\pm$  sd):** 29  $\pm$  7 years / **Age at diagnosis (mean  $\pm$  sd):** 22  $\pm$  7 years**Neoplasia:** HL (n=21) (72.4%) / NHL (n=8) (27.6%)

HL: nodular sclerosis (42.8%); mixed cellularity (23.8%); lymphocytic predominance (4.8%); HL ws (28.6%)

NHL: large B-cell lymphoma ws (50%); T-cell lymphoma ws (25%); MALT (12.5%); NHL ws (12.5%)

**Smoking habit:**

Current smokers (n=2) / Former-smokers (n=4) / Non-smokers (n=23)

Cigarettes smoked per day (mean  $\pm$  sd): 13  $\pm$  6**Antineoplastic treatment****Only chemotherapy (n=5):**

CHOP (n=2); GBTLS (n=3)

**Chemotherapy + radiotherapy (n=24)**

ABVD (n=16); CHOP (n=3); ABVD/MOOP (n=2); ABVD/ESHAP (n=3)

**Time after the end of therapy (disease free) (mean  $\pm$  sd):** 7  $\pm$  3 years**Controls (n=29)****Gender:** Male (n=13) / Female (n=16)**Age (mean  $\pm$  sd):** 31  $\pm$  7 years**Smoking habit:**

Current smokers (n=1) / Former-smokers (n=1) / Non-smokers (n=27)

Cigarettes smoked per day (mean  $\pm$  sd): 12  $\pm$  10

---

HL: Hodgkin's Lymphoma; NHL: Non-Hodgkin Lymphoma; ws: without specification; pre and post-therapy: patients with history of lymphoma before and at least 2 after the end of therapy, respectively; controls: healthy subjects; MALT: mucosa-associated lymphoid tissue;. ABVD: adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine; CHOP: cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone MOPP: mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone; ESHAP: etoposide, methylprednisolone, cytarabine, cisplatin; GBTLI (Brazilian Group for Treatment of Childhood Lymphoma): vincristine, doxorubicin, dexamethasone, cytarabine, methotretate, intrathecal dexamethasone, L-asparaginase

**Table II** - DNA damage (mean  $\pm$  standard error) and repair capability in lymphocytes of patients with history of lymphoma, before (pre-therapy) and at least two years after the end of therapy (post-therapy)

Groups	Number of subjects	Basal DNA damage	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced DNA damage	Residual DNA damage <sup>+</sup>	DNA repair capability <sup>++</sup>
Controls	29	8.0 $\pm$ 0.004 <sup>1,a</sup>	33.0 $\pm$ 0.001 <sup>2,a**</sup>	18.4 $\pm$ 0.002 <sup>3**</sup>	13.6 $\pm$ 36.54 <sup>a</sup>
Pre-therapy	14	9.6 $\pm$ 0.05 <sup>1,b**</sup>	26.8 $\pm$ 0.002 <sup>2**,b**</sup>	14.7 $\pm$ 0.07 <sup>3**</sup>	12.7 $\pm$ 30.8 <sup>a</sup>
Post-therapy	29	10.6 $\pm$ 0.003 <sup>1,b**</sup>	29.9 $\pm$ 0.001 <sup>2**,c**,#</sup>	21.3 $\pm$ 0.002 <sup>3**</sup>	7.8 $\pm$ 38.43 <sup>b*</sup>

Controls: healthy subjects; <sup>+</sup> residual DNA damage: 2h after *in vitro* exposure to 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; <sup>++</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage minus residual DNA damage. Different numbers mean differences within the same group (line); different letters mean significant differences among groups (column); \* p<0.05; \*\* p<0.01; # p=0.02 in relation to pre-therapy.

Table III presents DNA damage values in the three groups of the study population, distributed according to the age and gender. Statistically significant differences were detected in the control and pre-therapy groups. In control, the highest level of DNA damage was observed in subjects younger than 30 years, while in pre-therapy in the oldest patients (p<0.01). Regarding to the gender, the only statistically significant difference was detected in the pre-therapy group: female presented more DNA damage than male patients (p<0.05). When comparisons were made among the groups, patients younger than 30 years in the pre-therapy group, presented less DNA damage than control, while post-therapy patients had higher level of genetic lesions than the control subjects (p<0.01). Patients older than 30 years, both in pre- and post-therapy groups, presented more DNA damage than the control subjects (p<0.01). Similarly, female pre- and post-therapy patients had higher DNA damage control subjects (p<0.01), while only males of the post-therapy group presented more DNA damage than controls (p<0.01).

**Table III -** Level of DNA damage (mean  $\pm$  standard error) according to demographic variables in patients with history of lymphoma, before(pre-therapy) and at least two years after the end of therapy (post-therapy)

	Controls		Pre-therapy		Post-therapy		
	n	DNA damage	n	DNA damage	n	DNA damage	
<b>Age (years)</b>	$\leq 30$	15	9.4 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	6	7.6 $\pm$ 0.01 <sup>b**</sup>	19	10.9 $\pm$ 0.004 <sup>c**</sup>
	$> 30$	14	6.2 $\pm$ 0.01 <sup>1**a</sup>	8	11.04 $\pm$ 0.005 <sup>1**b**</sup>	10	9.9 $\pm$ 0.005 <sup>b**</sup>
<b>Gender</b>	Male	13	8.4 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	6	7.9 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	17	10.7 $\pm$ 0.004 <sup>b**</sup>
	Female	16	7.7 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	8	10.8 $\pm$ 0.006 <sup>1* b**</sup>	12	10.4 $\pm$ 0.005 <sup>b**</sup>

<sup>1</sup> Statistical difference within the same group (column); different letters mean significant differences among groups (line);

\* p<0.05; \*\* p<0.01



### *DNA damage and gene polymorphisms*

The relationship between DNA damage and *XRCC1* and *hOGGI* genotypes are shown in Table IV. In some cases, statistical analysis was not performed due to the small number of subjects with that genotype. Regarding to basal DNA damage in the control group, the highest values were observed in those subjects with *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup> (p<0.05), *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> (p<0.01) and *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup> (p<0.05) gene variants. No other group presented different level of basal DNA damage among genotypes. Similar result was observed for *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage. Only in the control group was detected association between the amount of genetic lesions and genotypes. Highest values were measured in those subjects with *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup> and *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> variants (p<0.01). When DNA repair capability was evaluated, relationship between amount of damage and gene polymorphism was observed in control and post-therapy groups. In the pre-therapy group, no comparisons were made within the group because of the small number of subjects with each genotype. Subjects with *XRCC1*<sup>399arg/gln</sup>, and *hOGGI*<sup>326ser/cys</sup> genotypes presented lower repair capability than those with the homozygous variants *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup> (p<0.01) and *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup> (p<0.01). Only in the control group, *XRCC1*<sup>280arg/arg</sup> genotype was related to lower repair capability.

DNA damage according to genotypes was also compared among the three groups (Table IV). However, sometimes these comparisons were impaired because of the small number of subjects. Data showed no relationship between the increased basal damage observed in the pre- and post-therapy group when compared to the respective control (Table II), and the *XRCC1*<sup>399</sup> polymorphisms. Both homozygous and heterozygous variants were related to the increased amount of damage. Because of the small number of patients with the *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> genotype in pre- and post therapy groups, it was not possible to check the relationship between DNA damage

and *XRCCI*<sup>280</sup> polymorphisms. Nevertheless, those patients with the *XRCCI*<sup>280arg/arg</sup> genotype presented more DNA damage than the respective controls ( $p < 0.01$ ). Similar findings were observed for the *hOGGI*<sup>326</sup> polymorphisms. Both homozygous and heterozygous patients in the post-therapy group showed increased DNA damage when compared to the respective controls. Therefore, there was no association between the amount of genetic damage and *hOGGI*<sup>326</sup> genotypes for the post-therapy patients. However, apparent relationship was observed in the pre-therapy groups, since no difference was detected between *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup> patients and the respective health subjects, while an apparently (only 4 individuals) increased DNA damage was observed in the *hOGGI*<sup>326ser/cys+cys/cys</sup> patients (no statistical analysis was done).

Regarding to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-capability to induce *in vitro* DNA damage in lymphocytes from the three groups of individuals, data showed no relationship between the lower levels of DNA damage observed in pre-and post-therapy patients than in controls (Table II), and the three genes variants analyzed. Conversely, when the study population was distributed according to the genotypes, pre-(*XRCC280*<sup>arg/arg</sup> and *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup>) and post-therapy (*XRCCI*<sup>399arg/arg</sup>) patients presented statistically significant ( $p < 0.01$ ) lower levels of damage than the health subjects.

Data about DNA repair capability showed that individuals with the *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup> variant in pre-and post-therapy groups and those with *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup> in post-therapy present lower ability for repairing damage than the respective controls ( $p < 0.01$ ). On the other hand, both pre and post-therapy patients with the *XRCCI*<sup>399arg/gln+gln/gln</sup> genotypes present higher DNA repair capability than the respective control ( $p < 0.01$ ).

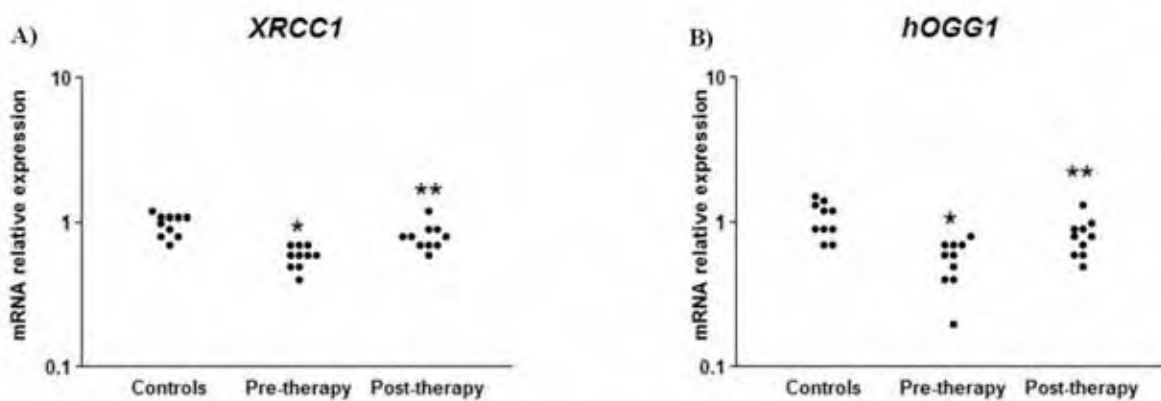
**Table IV:** DNA damage (mean  $\pm$  standard error) in lymphocytes of patients with history of lymphoma and according to the gene polymorphism

Genotypes	Controls			Pre-therapy			Post-therapy		
	Basal DNA Damage	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced DNA damage	DNA repair capability <sup>†</sup>	Basal DNA damage	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced DNA damage	DNA repair capability	Basal DNA Damage	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced DNA damage	DNA repair capability
<i>XRCCI</i> <sup>399</sup> <i>arg/arg</i>	8.6 $\pm$ 0.005 (n=16) <sup>1**a</sup>	35.1 $\pm$ 0.001 (n=16) <sup>1**a</sup>	21.4 $\pm$ 0.001 (n=16) <sup>1**a</sup>	11.9 $\pm$ 0.07 (n=4) <sup>0</sup>	28.7 $\pm$ 0.003 (n=4) <sup>0</sup>	14.7 $\pm$ 0.004 (n=4) <sup>0</sup>	10.7 $\pm$ 0.005 (n=11) <sup>b**</sup>	29.8 $\pm$ 0.001 (n=11) <sup>b**</sup>	16.2 $\pm$ 0.002 (n=11) <sup>1**b**</sup>
<i>XRCCI</i> <sup>399</sup> <i>arg/gln+gln/gln</i>	7.3 $\pm$ 0.007 (n=13) <sup>a</sup>	27.2 $\pm$ 0.002 (n=13) <sup>a</sup>	9.8 $\pm$ 0.003 (n=13) <sup>a</sup>	8.55 $\pm$ 0.007 (n=10) <sup>b**</sup>	26.3 $\pm$ 0.002 (n=10) <sup>a</sup>	14.9 $\pm$ 0.004 (n=10) <sup>b**</sup>	10.5 $\pm$ 0.004 (n=18) <sup>c**</sup>	29.9 $\pm$ 0.001 (n=18) <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 0.003 (n=18) <sup>b**</sup>
<i>XRCCI</i> <sup>280</sup> <i>arg/arg</i>	7.2 $\pm$ 0.005 (n=23) <sup>a</sup>	30.7 $\pm$ 0.001 (n=23) <sup>a</sup>	15.9 $\pm$ 0.002 (n=23) <sup>a</sup>	9.2 $\pm$ 0.007 (n=11) <sup>b**</sup>	26.6 $\pm$ 0.002 (n=11) <sup>b**</sup>	16.2 $\pm$ 0.06 (n=11) <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.003 (n=26) <sup>c**</sup>	30.2 $\pm$ 0.001 (n=26) <sup>a</sup>	14.7 $\pm$ 0.002 (n=26) <sup>a</sup>
<i>XRCCI</i> <sup>280</sup> <i>arg/his</i>	10.9 $\pm$ 0.006 (n=6) <sup>1**</sup>	36.7 $\pm$ 0.001 (n=6) <sup>1**</sup>	21.1 $\pm$ 0.003 (n=6) <sup>1**</sup>	10.7 $\pm$ 0.009 (n=3) <sup>0</sup>	27.7 $\pm$ 0.003 (n=3) <sup>0</sup>	9.01 $\pm$ 0.01 (n=3) <sup>0</sup>	8.2 $\pm$ 0.01 (n=3) <sup>0</sup>	8.2 $\pm$ 0.007 (n=3) <sup>0</sup>	15 $\pm$ 0.007 (n=3) <sup>0</sup>
<i>hOGGI</i> <sup>326</sup> <i>ser/ser</i>	8.7 $\pm$ 0.05 (n=19) <sup>1**a</sup>	31.5 $\pm$ 0.001 (n=19) <sup>a</sup>	19.4 $\pm$ 0.002 (n=19) <sup>1**a</sup>	8.4 $\pm$ 0.006 (n=10) <sup>a</sup>	25.3 $\pm$ 0.002 (n=10) <sup>b**</sup>	15.2 $\pm$ 0.003 (n=10) <sup>b**</sup>	10.6 $\pm$ 0.004 (n=18) <sup>b**</sup>	30.1 $\pm$ 0.001 (n=18) <sup>a</sup>	15.9 $\pm$ 0.002 (n=18) <sup>1**b**</sup>
<i>hOGGI</i> <sup>326</sup> <i>ser/cys+cis/cis</i> <sup>#</sup>	6.7 $\pm$ 0.08 (n=10) <sup>a</sup>	33.5 $\pm$ 0.01 (n=10) <sup>a</sup>	13.02 $\pm$ 0.003 (n=10) <sup>a</sup>	12.3 $\pm$ 0.007 (n=4) <sup>0</sup>	30.6 $\pm$ 0.002 (n=4) <sup>0</sup>	14.1 $\pm$ 0.004 (n=4) <sup>0</sup>	10.5 $\pm$ 0.005 (n=11) <sup>b**</sup>	29.5 $\pm$ 0.001 (n=11) <sup>a</sup>	12.8 $\pm$ 0.004 (n=11) <sup>a</sup>

Basal: endogenous DNA damage; <sup>†</sup> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage minus residual DNA damage). <sup>0</sup> it was not considered in statistical analyses because of the small number of subjects; <sup>#</sup> only one patient in the post-therapy group; <sup>1</sup> significant difference between genotypes (column); different letters mean differences among the groups (line); \* p<0.05; \*\* p<0.01.

### DNA repair genes expression

*XRCC1* and *hOGG1* genes expression in peripheral blood cells of pre- and post-therapy patients and of healthy subjects are shown in Figure 1. For both genes, statistically significant down-regulation was observed in pre-therapy when compared to control and to post-therapy groups ( $p < 0.01$ ); and also in post-therapy when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). No correlation was detected between these two genes expression and basal DNA damage in the three groups ( $p > 0.05$ ) (Table V).



**Fig 1:** Relative *XRCC1* and *hOGG1* expressions in peripheral leukocytes of health subjects (control) and of patients with history of lymphomas before antineoplastic treatments (pre-therapy) or at least two years after the end of treatment (disease free). \*  $p < 0.01$  in relation to control and post-therapy groups; \*\* $p < 0.05$  in relation to control group. Data were obtained from 30 subjects (10 per group).

**Table V** - Correlation between DNA damage and *XRCC1* and *hOGG1* genes expression

	<b>Controls</b>	<b>Pre-therapy</b>	<b>Post-therapy</b>
<i>XRCC1</i>	0.22 (0.52)	-0.22 (0.53)	-0.54 (0.12)
<i>hOGG1</i>	0.12 (0.74)	-0.05 (0.9)	-0.56 (0.09)

Data are expressed as correlation coefficient (p value); n = 10 individuals/group.

## Discussion

In the present study we evaluated the late effects of antineoplastic therapies in individuals with history of lymphoma. The casuistic included male and female Hodgkin's and Non-Hodgkin Lymphoma patients newly diagnosed (before chemo and radiotherapies) and out of treatment for at least three years. Initially, we observed that patients with HL or NHL, even before treatments, presented higher levels of DNA damage in peripheral blood lymphocytes than healthy subjects. Similar findings have been described by other investigators evaluating different types of neoplasias (Gontijo *et al.*, 2002; Nadin *et al.*, 2006; Sterpone *et al.*, 2010; Synowiek *et al.*, 2008; O'Flaherty *et al.*, 2008), although different results have been also described (Poplaswki *et al.*, 2006; Krupa *et al.* 2010). The increased amount of DNA damage observed in lymphocytes of breast cancer patients before antineoplastic therapy has been associated to a high metabolism due to the cancer and/or increased replication and proliferation of T cells in response to disease (Blasiak *et al.*, 2004). M'Kacher *et al.* (2003), investigating cytogenetic modifications, have found higher levels of chromosomal aberrations (CA) and complex chromosomal rearrangements in patients with HL (before treatments) than in a healthy population, and they concluded that HL patients have a certain degree of chromosomal instability.

In our study, we also detected increased level of DNA damage in individuals who had finished treatment for lymphoma at least three years before (current histopathologically negative for neoplasia). These patients were submitted to ABVD or CHOP chemotherapeutic protocols with or without radiotherapy, and they were 3-15 years (mean  $7 \pm 3$ ) out of therapy by the time of the blood collection. In a few cases, the ABVD protocol was administered in combination with MOOP or ESHAP. Similarly to our results, it has been described higher level of genetic damage in Hodgkin's Lymphoma post-therapy patients (mean time after treatment = 12.5 years) than in healthy subjects. Furthermore, the amount of damage has been even higher in patients

with a second tumor than in those without it (Lorenzo *et al.*, 2009). Ryabchenko *et al.* (2003) have also reported increased level of chromosome aberration in HL post-therapy patients (mean time after treatment = 16 years). These authors have concluded that this high frequency of chromosomal alterations and primary DNA lesions might be related to the permanent damage caused by the antineoplastic therapy in the cell renewal systems. Additionally, the authors suggest that the high levels of DNA damage and chromosome aberrations in post-therapy patients could increase the risk for developing a second malignance. Nevertheless, literature also reports no late effect of antineoplastic therapy in patients with history of HL and breast cancer (Alapetite *et al.*, 1999). Furthermore, it has been demonstrated that the amount of DNA damage returns to the pre-treatment level 3 weeks after ifosfamide administration to patients with different types of neoplasias (Willits *et al.*, 2005).

The higher levels of genetic damage detected in lymphoma patients than in controls could be also corroborated by our findings that demonstrated *hOGG1* and *XRCC1* down-regulation in both pre- and post-therapy groups. However, when analyzed separately, no relationship between each gene expression and DNA damage was detected. Liu *et al.* (2007) have observed down-regulation of six DNA repair genes (*MGMT*, *hOGG1*, *XRCC1*, *XPB*, *hMLH1*, and *hMSH2*) in peripheral blood mononuclear cells from patients with esophageal squamous-cell carcinoma. Recently, it has been also reported the role of *XRCC1* on gastric carcinogenesis (Wang *et al.*, 2010). The authors have detected a gradual decrease in the *XRCC1* protein expression according to progression of gastric carcinogenesis (atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia and cancer). Furthermore, they have also observed a down-regulation of *XRCC1* expression in tumor tissue in relation to normal adjacent tissue, as a consequence of gene promoter methylation (Wang *et al.*, 2010).

When the study population was distributed according to some demographic characteristics, our data showed an effect of age and gender on the level of genetic lesions. While healthy subjects younger than 30 years presented the highest level of DNA damage in the comet assay, in patients with lymphoma (before therapy) the amount of damage was higher in those older than 30 years. However, it should be notice that most of the younger subjects in our study had the *XRCCI*<sup>280arg/his</sup>, *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup> genotypes, which were related to the increased basal DNA damage. On the other hand, the statistically significant differences detected among the three groups appears to be not related to the age, since for both ranges DNA damage was higher in lymphoma patients than in controls. Literature has shown that healthy subjects at mean age of 69 years present more genetic lesions than those with age ranged between 35 to 47 years (Mladinic *et al.*, 2010). Similar results had been previously described by Weng *et al.* (2009), who have detect increased damage in subjects older than 47 years, and by Piperakis *et al.*, (2009b), who have observed higher DNA damage in erderly (70-80 years) than in adults (40-50 years) and children (5-10 years). Contrarily, Mendoza-Núñez *et al.* (2010) have not observed any difference between individuals older than 45 years and younger than 44 years old. Additionally, no interference of age on DNA damage has been reported in a study with 170 healthy subjects ranged from 20 to 64 years old (Kopjar *et al.*, 2006). Regarding to the gender, difference was only detected in those patient with the disease, but still not submitted to any treatment (pre-therapy group). In this case, female had higher level of DNA damage than male patients. Therefore, it might be suggested that some hormonal activity would contributed to the increased DNA damage in female lymphoma patients. Some authors have found no interference of gender on the amount of DNA damage in healthy subjects (Giovanelli *et al*, 2002; Marcon *et al*, 2003; Kopjar *et al.*, 2006). However, it has been described higher level of oxidized cytosine and adenine in female than male (Proteggente *et al.*, 2002). Similarly, literature has also reported a



relationship between endogenous levels of 17  $\beta$ -estradiol and the consume of oral contraceptive and increased DNA damage in women (Biri *et al.*, 2002; Kapizeswka *et al.*, 2005). No age or gender interferences were detected in the post-therapy group. Perhaps, the high genotoxicity of antineoplastic therapies overcomes the effect of these demographic variables.

In order to also evaluate cell sensitivity and DNA repair capability, lymphocytes from the study population were *in vitro* treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Our data showed lower genotoxicity in blood cells from pre and post-therapy patients than in healthy subjects immediately after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Furthermore, lymphocytes from those patients from the post-therapy group were more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced genotoxicity than those from the pre-therapy group. Literature reports different results regarding *in vitro* cell sensitivity to chemical- and physical-induced DNA lesions. While some authors have shown higher DNA damage in cancer patients (pre and post-therapy) than in healthy subjects (Blasiak *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2009; Sterpone *et al.*, 2010; Synoviec *et al.*, 2010), other have not found such association (Alapetite *et al.*, 1999; Nadin *et al.*, 2006; Krupa *et al.*, 2010). Lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage has been observed in lymphocytes from breast cancer patients than in controls (Agnoletto *et al.*, 2007). The authors suggest that this result might be due to a delay in the DNA repair mechanisms in cancer patients. Furthermore, in this same study it was also observed a negative correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances), what suggest that increased oxidative stress could lead to a decrease in the susceptibility to hydrogen peroxide genotoxicity (Agnoletto *et al.*, 2007). It must be remind that primary DNA lesions as depicted by the comet assay can also reflect strand breaks caused by the earliest DNA repair step and by incomplete excision repair (Speit & Hartmann, 1995). In our study, the lower H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage found in pre and post-therapy patients than in controls might also be associated to the down-regulation of *hOGG1* and *XRCC1* genes observed in the lymphoma patients. Delay or

low activity of DNA repair earliest step might be responsible for these decreased amounts of primary DNA strand breaks.

When DNA damage was measured 2 hours after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (DNA repair capability assay), we did not find difference between pre-therapy patients and healthy subjects. Contrarily, patients from the post-therapy group presented decreased ability for repairing DNA lesions induced by hydrogen peroxide when compared to control and pre-therapy patients. Our results are in agreement with those in literature, which have demonstrated no alterations in DNA repair effectiveness in pre-therapy cancer patients (Poplawsky *et al.*, 2006; Nadin *et al.*, 2006; Krupa *et al.*, 2010), and a decreased repair in post-therapy patients (Alapetite *et al.*, 1999; Lorenzo *et al.*, 2009). Alapetite *et al.* (1999) have demonstrated that breast cancer patients with severe early and late reactions (necrosis, pulmonary fibrosis, and other) to radiotherapy present slow repair of the induced DNA damage. Recently, Lorenzo *et al.* (2009) have also observed decreased DNA repair capability in post-therapy patients with history of Hodgkin's Lymphoma, suggesting that the base excision repair (BER) mechanism might be compromised in these patients. Nevertheless, some studies have also reported lower repair activity in cancer patients before therapies than in controls (Blasiak *et al.*, 2004; Synowiec *et al.*, 2010). Since in the present study we did not evaluate *XRCC1* and *hOGG1* expression after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, we could not correlate DNA repair capacity in such situation with the gene expression profile.

Our data showed that *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup>, *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> and *hOGG1*<sup>326ser/ser</sup> genotypes were associated to increased amount of DNA lesions in healthy subjects, even after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. Similar result has been described in Japanese healthy individuals with the *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> gene variant (Weng *et al.*, 2008). On the other hand, Cornetta *et al.* (2006) have found no influence of *XRCC1*<sup>399</sup> and *hOGG1*<sup>326</sup> polymorphisms on the level of DNA damage in a healthy population. However, these authors show that cells from individuals with the *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup> genotype

present increased DNA damage after *in vitro* exposure to  $\gamma$  radiation. Rhor *et al.* (2010) have not detected increased DNA damage in subjects with *hOGGI*<sup>326ser/ser</sup> genotype. Nevertheless, when they have investigated a population exposed to pesticides, increased amount of DNA damage was observed in those individuals with the heterozygous *hOGGI*<sup>326ser/cys</sup> genotype. Because of the low frequency of *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup>, *XRCCI*<sup>280arg/his</sup> and *hOGGI*<sup>326cys/cys</sup> variants, it was not possible to evaluate the association between gene polymorphisms and DNA damage in our pre-therapy group.

In those patients after therapy, no relationship between basal genetic damage and genotypes was detected, i.e., the increased amount of DNA lesion was not associated to a specific gene variant. However, similarly to controls, in the post-therapy group, DNA repair capability after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was more evident in individuals with the homozygous *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup> and *hOGGI*<sup>280ser/ser</sup> genotypes than in those with the other respective variants. According to Smart *et al.* (2006) the repair capacity of a particular protein may only be evident in adverse cellular conditions. Data in literature have also associated higher repair capability to the *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup> genotype than to the other respective polymorphisms in healthy subjects (Vodicka *et al.*, 2007). However, some authors have not found a relationship between the *XRCCI*<sup>399arg/arg</sup> variant and a higher repair capability (Cornetta *et al.*, 2006). Recently, Sterpone *et al.* (2010) have described that *XRCCI*<sup>399</sup> polymorphisms had no influence on DNA repair mechanisms in breast cancer patients. Herein, the lower repair capability found in lymphocytes from patients (pre and post-therapy) with the wild type *XRCCI*<sup>399</sup> than in controls with the same genotype, might be intrinsically related with the disease or to the effect of the antineoplastic treatment.

Although literature has shown evidence of DNA repair genes polymorphisms on cancer risk development (El-Zein *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Tumer *et al.*, 2010; Kim *et al.*,

2010b), the functional role of these variants must be better elucidated (Hung *et al.*, 2005; Kiyohara *et al.*, 2010). In our study, it was not possible to correlate *XRCCI* and *hOGG1* gene expression to the DNA repair capability after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment because the transcriptome analysed was only done just at the moment of blood collection.

In conclusion, our data demonstrated that lymphomas were associated with high level of damage and low DNA repair capability, and that even with negative diagnosis patients after therapy might have increased risk for developing genetic-related diseases, since they still have increased amount of DNA lesions. However, long-term epidemiological studies, including patients with second malignancies, should be conducted to confirm the relationship between the late effects of antineoplastic therapies and the development of second malignancies.

### References

Agnoletto, M.H., Guecheva, T.N., Dondé, F., de Oliveira, A.F., Franke, F., Cassini, C., Salvador, M., Henriques, J.A., Saffi, J. (2007) Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clin. Biochem.*, **40**:1252-8.

Ahuja, H.G., Felix, C.A., Aplan, P.D. (2000) Potential role for DNA topoisomerase II poisons in the generation of t(11;20)(p15;q11) translocations. *Genes Chromos. Cancer*, **29**, 96-105.

Alapetite, C., Thirion, P., de la Rochefordière, A., Cosset, J.M., Moustacchi, E. (1999) Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int. J. Cancer.*, **83(1)**:83-90.

Benhamou, S., Sarasin, A. (2000) Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat. Res.*, **462**: 149-58.

Biri,A., Civelek,E., Karahalil,B., Sardaş,S.(2002) Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. *Mut. Res.*, **521(1-2)**:113-9.

Blasiak,J., Arabski,M., Krupa,R., Wozniak,K., Rykala,J., Kolacinska,A., Morawiec,Z., Drzewoski,J., Zadrozny,M.(2004) Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mut. Res.*, **554(1-2)**:139-48.

Braz,M.G., Salvadori,D.M. (2007) Lack of genotoxicity induced by endogenous and synthetic female sex hormones in peripheral blood cells detected by alkaline comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, **48(5)**:414-20.

Cornetta,T., Festa,F., Testa,A., Cozzi,R. (2006) DNA damage repair and genetic polymorphisms: assessment of individual sensitivity and repair capacity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **66(2)**:537-45.

El-Zein,R., Monroy,C.M., Etzel,C.J., Cortes,A.C., Xing,Y., Collier,A.L., Strom,S.S. (2009) Genetic Polymorphisms in DNA Repair Genes as Modulators of Hodgkin Disease Risk. *Cancer*, **115(8)**:1651-59.

Felix,C.A. (1998) Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 233-255.

Fisher,R.I., Miller,T.P., O'Connor,O.A. (2004) Diffuse aggressive lymphoma. *Hematol.*, 221-236.

Flowers,C.R., Sinha, R., Vose,J.M. (2010) Improving outcomes for patients with diffuse large b-cell lymphoma. *CA Cancer J. Clin.*,**60**, 393-408.

Giovannelli,L., Saieva,C., Masala,G., Testa,G., Salvini,S., Pitozzi,V., Riboli,E., Dolaro,P., Palli,D. (2002) Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis*, **23(9)**:1483-9.

Gontijo,A.M., Marcondes,J.P., Elias,F.N., de Oliveira,M.L, de Lima,R.O., Salvadori,D.M., de Camargo,J.L.(2002) DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.*,**40(3)**:190-9.

Hung,R.J., Hall,J., Brennan,P., Boffetta,P. (2005) Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.*, **162(10)**:925-42.

Inaba,H., Pui C. (2010) Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.*,**11**: 1096–106.

Joseph,T., Kusumakumary,P., Chacko,P., Abraham,A., Pillai,M.R. (2005) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.*, **217**:1724-24.

Kapiszewska,M., Kalemba,M., Grzesiak,A., Kocemba,K. (2005) The level of endogenous DNA damage in lymphocytes isolated from blood is associated with the fluctuation of 17beta-estradiol concentration in the follicular phase of healthy young women. *Acta Biochim. Pol.*, **52(2)**:535-9.

Kim,E., Yan,C., Ha,Y., Jeong,P., Kim,I.K., Moon,S., Choi,Y.H., Kim,W. (2010a) Analysis of *hOGG1* genotype as a prognostic marker for muscle invasive bladder cancer: A novel approach using peptide nucleic acid-mediated, real-time PCR clamping. *Urol. Oncol.*, doi:10.1016/j.urolonc.2010.07.008.

Kim,I.S., Kim,D.C., Kim,H.G., Eom,H.S., Kong,S.Y, Shin,H.J., Hwang,S.H., Lee,E.Y., Kim,S., Lee,G.W. (2010b) DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **196** : 31-7.

Kiyohara,K., Takayama,K., Nakanishi,Y. (2010) Lung cancer risk and genetic polymorphisms in dna repair pathways: a meta-analysis. *J. Nucleic Acids*, **2010**.

Klimm,B., Diehl,V., Pfistner,B., Engert,A. (2005) Current treatment strategies of the German Hodgkin Study Group (GHSg). *Eur. J. Haematol.*, **74**, 125-134.

Kopjar,N., Zeljezić,D., Garaj-Vrhovac,V. (2006) Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim. Pol.*, **53(2)**:321-36.

Krupa,R., Sobczuk,A., Popławski,T., Wozniak,K., Blasiak,J. (2010) DNA damage and repair in endometrial cancer in correlation with the hOGG1 and RAD51 genes polymorphism. *Mol. Biol. Rep.*, **38(2)**:1163-70.

Lee,J.M., Lee,Y.C., Yang,S.Y., Yang,P.W., Luh,S.P., Lee,C.J., Chen,C.J., Wu,M.T. (2001) Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer.*, **95(4)**:240-6.

Lee,H., Jeon,J., Ryu,Y.S., Jeong,J.E, Shin,S., Zhang,T., Kang,S.W., Hong,J.H., Hur,G.M. (2010) Disruption of microtubules sensitizes the dna damage-induced apoptosis through inhibiting nuclear factor  $\kappa$ b (nf- $\kappa$ b) dna-binding activity. *J. Korean Med. Sci.*, **25**: 1574-81.

Lei,Y., Hwang,S., Chang,C., Kuo,H., Luo,J., Chang,M.J.W., Cheng,T. (2002) Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mut. Res.*, **519**: 93–101.

Liu,R., Yin,L.H., Pu,Y.P.(2007) Reduced expression of human DNA repair genes in esophageal squamous-cell carcinoma in china. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **70(11)**:956-63.

Liu,L.V., Bell III,C.B., Wong,S.B., Wilson,S.A., Kwak,Y., Chow,M.S., Zhao,J., Hodgson,K.O., Hedman,B., Solomon, E.I. (2010) Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods. *PNAS*, **107**: 22419–24.

Lorenzo,Y., Provencio,M., Lombardía,L., Díaz,R., Silva,J., Herrera,M., García,J.M., Peña,C., García,V., Romero,J., Domínguez,G., Bonilla,F. (2009) Differential genetic and functional markers of second neoplasias in Hodgkin's disease patients. *Clin. Cancer. Res.*, **15(15)**:4823-8.

Lunn,R.M., Langlois,R.G., Hsieh,L.L., Thompson,C.L., Bell,D.A. (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.*, **59**:2557–61.

Marcon,F., Andreoli,C., Rossi,S., Verdina,A., Galati,R., Crebelli,R.(2003). Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mut. Res.*, **541(1-2)**:1-8.

Maule,M., Scélo,G., Pastore,G., Brennan,P., Hemminki,K., Tracey,E.,Sankila,R., Weiderpass,E., Olsen,J.H., McBride,M., Brewster,D.H.,Pompe-Kirn,V, Kliwer,E.V, Chia,K.S., Tonita,J.M., Martos,C., Jonasson,J.G., Merletti,F., Boffetta,P. (2007). Risk of second malignant neoplasms after childhood leukemia and lymphoma: an international study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**: 790 – 800.

Mendoza-Núñez,V.M., Beristain-Pérez,A., Pérez-Vera,S.P., Altamirano-Lozano,M.A. Age-related sex differences in glutathione peroxidase and oxidative DNA damage in a healthy Mexican population. *J. Womens Health.*, **19(5)**:919-26.

Meyer,R.M., Ambinder, R.F., Stroobants, S. (2004) Hodgkin's Lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *Hematol.*, 184-202.

Minotti,G., Menna,P., Salvatorelli,E., Cairo,G.,Giann,L. (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **56**:185–229.

M'kacher,R., Girinsky,T., Koscielny,S., Dossou,J., Violot,D., Béron-Gaillard,N., Ribrag,V., Bourhis,J., Bernheim,A., Parmentier,C., Carde,P. (2003) Baseline and treatment-induced



chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **57(2)**:321-6.

Mladinic,M., Kopjar,N., Milic,M., Dasovic,A.B., Huzak,M., Zeljezic,D. (2010) Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. *Mutagenesis*, **25(5)**:455-62.

Nadin,S.B., Vargas-Roig,L.M., Drago,G., Ibarra,J., CioccaD.R.(2006) DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Lett.*, **239(1)**:84-97.

O'FlahertyC., Vaisheva,F., Hales,B.F., Chan,P., Robaire,B.(2008) Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Hum. Reprod.*, **23(5)**:1044-52.

Piperakis,S.M., Kontogianni,K., Karanastasi,G., Iakovidou-Kritsi,Z., Cebulska-Wasilewska,A., Piperakis,M.M. (2009a) Investigation of the genotoxic effect of pesticides on greenhouseworkers' lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **50**:121-6.

Piperakis,S.M., Kontogianni,K., Karanastasi,G., Iakovidou-Kritsi,Z., Piperakis,M.M. (2009b) The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child,adult, and old age populations. *Cell Biol. Toxicol.*, **25(1)**:65-71.

Poplawski,T., Arabski,M., Kozirowska,D., Blasinska-Morawiec,M., Morawiec,Z., Morawiec-Bajda,A., Klupínska,G., Jeziorski,A., Chojnacki,J., Blasiak,J. (2006) DNA damage and repair in gastric cancer-A correlation with the *hOGG1* and *RAD51* genes polymorphisms. *Mut. Res.*, **601**: 83–91.

Proteggente,A.R., England,T.G., Rehman,A., Rice-Evans,C.A., Halliwell,B. (2002) Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. *Free Radic. Res.*, **36(2)**:157-62.

Rohr,P., da Silva,J., Erdtmann,B., Saffi,J., Guecheva,T.N., Henriques,A.P., Kvitko,K. (2010) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ. Mol. Mutagen.*, **52(1)**:20-7.

Ryabchenko,N., Nasonova,V., Antoschina,M., Fesenko,E., Kondrashova,T., Ivanova,T., Pavlov,V., Ryabikhina,N., Terekhova,A. (2003) Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. *Int. J. Radiat. Biol.*, **79(4)**:251-7.

Shibutani,S., Takeshita,M., Grollman,A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**:431-4.

Singh,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R., Schneider,E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, **175(1)**:184-91.

Singh,N., Nigam,M., Ranjan,V., Sharma,K., Balapure,A.K., Rath,S.K. (2009) Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide and resveratrol-treated MCF-7 cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **109**:473-85.

Smart,D.J., Chipman,J.K., Hodges,N.J. (2006) Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *DNA Repair*, **5(11)**:1337-45.

Speit,G., Hartmann,A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis.*, **10(6)**:555-9.

Sterpone,S., Cornetta,K., Padua,L., Mastellone,V., Giammarino,D., Testa,A., Tirindelli,D., Cozzi,R., Donato,V. (2010) DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. *Mut. Res.*, **684**:43-8.

Synowiec,E., Stefanska,J., Morawiec,Z., Blasiak,J., Wozniak,K. (2008) Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mut. Res.*, **648(1-2)**:65-72.

Synowiec,E., Krupa,R., Morawiec,Z., Wasylecka,M., Dziki,L., Morawiec,J., Blasiak,J.,Wozniak,K. (2010) Efficacy of DNA double-strand breaks repair in breast cancer is decreased in carriers of the variant allele of the UBC9 gene c.73G>A polymorphism. *Mut. Res.*, **694(1-2)**:31-8.

Tice,R.R., Andrews,P.W., Hirai,O., Singh,N.P. (1991) The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991;283:157-64.

Tumer,T.B., Yilmaz,D., Tanrikut,C., Sahin,C., Ulusoy,G., Arinç,E. (2010) DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism alone, and in combination with CYP2E1 polymorphisms significantly contribute to the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, **34**: 1275-81.

van 't Veer,L.J., Dai,H., van de Vijver,M.J., He,Y.D., Hart,A.A., Mao,M., Peterse,H.L., van der Kooy,K., Marton,M.J., Witteveen,A.T., Schreiber,G.J., Kerkhoven,R.M., Roberts,C., Linsley,P.S., Bernardis,R., Friend,S.H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **415**:530-6.

Vodicka,P., Stetina,R., Polakova,V., Tulupova,E., Naccarati,A., Vodickova,L., Kumar,R., Hanova,M., Pardini,B., Slyskova,J., Musak,L., De Palma,G., Soucek,P., Hemminki,K.(2007) Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis*, **28(3)**:657-64.

Wang,C.L., Hsieh,M.C., Hsin,S.C., Lin,H.Y., Lin,K.D., Lo,C.S., Chen,Z.H., Shin,S.J. (2006) The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism is associated with decreased insulin sensitivity in subjects with normal glucose tolerance. *J. Hum. Genet.*, **51(2)**:124-8.

Wang,P., Tang,J.T., Peng,Y.S., Chen,X.Y., Zhang,Y.J., Fang,J.Y. (2010) XRCC1 downregulated through promoter hypermethylation is involved in human gastric carcinogenesis. *J Dig Dis.*, **11(6)**:343-51.

Weng,Z., Lu,Y., Weng,H., Morimoto,K. (2008) Effects of the XRCC1 gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers. *Environ. Mol. Mutagen.*, **49(9)**:708-19.

Weng,H., Weng,Z., Lu,Y., Nakayama,K., Morimoto,K. (2009) Effects of cigarette smoking, XRCC1 genetic polymorphisms, and age on basal DNA damage in human blood mononuclear cells. *Mut. Res.*, **679**: 59–64.

Willits,I., Price,L., Parry,A., Tilby,M.J., Ford,D., Cholerton,S., Pearson,A.D., Boddy,A.V.(2005) Pharmacokinetics and metabolism of ifosfamide in relation to DNA damage assessed by the COMET assay in children with cancer. *Br. J. Cancer.*, **92(9)**:1626-35.

Wozniak,K., Szaflik,J.P., Zaras,M., Sklodowska,A., Janik-Papis,K., Poplawski,T.R., Blasiak,J., Szaflik,J. (2009) DNA damage/repair and polymorphism of the hOGG1 gene in lymphocytes of AMD patients. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2009**.

Yamane,A., Kohno,T., Ito,K., Sunaga,N., Aoki,K., Yoshimura,K., Murakami,H., Nojima,Y., Yokota,J. (2004) Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis*, **25**:1689-94.

Yu,J., Mallon,M.A., Zhang,W., Freimuth,R.R., Marsh,S., Watson,M.A., Goodfellow,P.J., McLeod,H.L. (2006) DNA repair pathway profiling and microsatellite instability in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*,**12(17)**:5104-11.

Zdzienicka,M.Z., van der Schans,G.P., Natarajan,A.T., Thompson,L.H., Neuteboom,I., Simons, J.W.I.M. (1992) A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. *Mutagenesis*, **7**:265-69.

Zhang,X., Moréra,S., Bates,P.A., Whitehead,P.C., Coffey,A.I., Hainbucher,K., Nash,R.A., Sternberg,M.J.E., Lindahl,T., Freemont,P.S. (1998) Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein–protein interaction module. *The EMBO J.*,**17**:6404-11.

Zhang,J., Dhakal,I.B., Greene,G., Lang,N.P., Kadlubar,F.F. (2010) Polymorphisms in *hOGG1* and *XRCC1* and risk of prostate cancer: effects modified by plasma antioxidants. *Urol.*, **75**:779-85.

Zhou,F., Zhang,W., Wei,Y., Zhou,D., Su,Z., Meng,X., Hui,L., Tian,W. (2007) The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leuk. Res.*,**31**(3):387-93.

#### 4- CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

1) pacientes com linfoma, antes de qualquer tratamento antineoplásico, apresentam níveis aumentados de lesões primárias no DNA;

2) pacientes com diagnóstico histopatológico atual negativo para linfoma e que finalizaram o tratamento há, em média, 7 anos (grupo pós-terapia) apresentam maiores níveis de lesões primárias no DNA que indivíduos sem história da neoplasia;

3) pacientes há, em média, 7 anos do término da terapia antineoplásica para linfoma apresentam menor capacidade de reparo dos danos induzidos, *in vitro*, pelo peróxido de hidrogênio;

4) pacientes com diagnóstico atual de linfoma e aqueles que finalizaram o tratamento há, em média, 7 anos, apresentam diminuição da expressão dos genes *XRCC1* e *hOGG1*;

5) igualmente à população sem história de linfoma, nos pacientes pré-e pós-terapia para a neoplasia os genótipos *XRCC1*<sup>399arg/arg</sup>, *XRCC1*<sup>280arg/his</sup> e *hOGG1*<sup>326ser/ser</sup> estão relacionados à maior capacidade de reparo de lesões induzidas pelo peróxido de hidrogênio.

Diante de tais achados, pode-se sugerir que os pacientes que se submeteram ao tratamento para linfoma, mesmo após sete anos do término da terapia, apresentam riscos aumentados para o desenvolvimento de doenças relacionadas a mutações genéticas, como por exemplo, a recidiva do linfoma ou o desenvolvimento de neoplasias secundárias. No entanto, nossos dados não permitem confirmar se o aumentado índice de danos no DNA observado nesses indivíduos está relacionado aos efeitos tardios dos protocolos terapêuticos ou a alterações genéticas persistentes e características do linfoma. Desta forma, sugerimos a realização de estudos epidemiológicos mais longos e que incluam pacientes com neoplasias secundárias, a fim de confirmar a relação entre os efeitos tardios das terapias antitumorais e o desenvolvimento de neoplasias secundárias.

## 5- REFERÊNCIAS

Aardema MJ, Macgregor JT. Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxigenomics”: impact of “omics” technologies. *Mutat Res.* 2002; 499:13-25.

Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-Badawy SA, Khaled HM, *et al.* Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 2000; 159(1):79-86.

Ahuja HG, Felix CA, Aplan PD. Potential role for DNA topoisomerase II poisons in the generation of t(11;20)(p15;q11) translocations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000; 29(2):96-105.

Akiyama Y, Ma Q, Edgar E. Identification of Strong DNA Binding Motifs for Bleomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130:9650–1.

Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordière A, Cosset JM, Moustacchi E. Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer.* 1999;83(1):83-90.

Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res.* 2000; 462:149-58.

Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat Res.* 2000; 462(2-3):71-82.

Bilban-Jakopin C, Bilban M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res.* 2001; 497(1-2):81-8.

Boiteux S and Radicella JP. The human *OGG1* gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 377(1):1-8.

Brock N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. *Cancer Res.* 1989; 49:1-7.

Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:169-93.

Chao MP, Alizadeh AA, Tang C. Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell*. 2010; 142:699–713.

Chow LM, Nathan PC, Hodgson DC, Jenkin D, Weitzman S, Grant RM, *et al.* Survival and late effects in children with Hodgkin's lymphoma treated with MOPP/ABV and low-dose, extended-field irradiation. *J Clin Oncol*. 2006; 24(36):5735-41.

Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*. 1993; 14(9):1733-5.

Collins AR, Raslová K, Somorovská M, Petrovská H, Ondrusová A, Vohnout B, Fábry R, Dusinská M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25(3):373-7.

Deng G. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(13):6231.

Dunleavy K, Piekarz RL, Zain J. New strategies in peripheral t-cell lymphoma: understanding tumor biology and developing novel therapies. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(23):5608–17.

El-Zein R, Monroy CM, Etzel CJ, Andrea C, Cortes, MS, Xing Y, *et al.* Genetic Polymorphisms in DNA Repair Genes as Modulators of Hodgkin Disease Risk. *Cancer*. 2009; 115(8): 1651–9.

Fan Y S, Rizkalla K. Comprehensive cytogenetic analysis including multicolor spectral karyotyping and interphase fluorescence *in situ* hybridization in lymphoma diagnosis: a summary of 154 cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003; 143(1):73-9.

Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1400: 233-55.

Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology* 2004; 221-36.

Flowers CR, Sinha R, Vose JM. Improving Outcomes for Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60:393-408.

Furuichi M, Yoshida MC, Oda H, Tajiri T, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, *et al.* Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics*. 1994; 24(3):485-90.



Ganem G, Cartron G, Girinsky T, Haas RL, Cosset JM, *et al.* Localized low-dose radiotherapy for follicular lymphoma: history, clinical results, mechanisms of action, and future outlooks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 78(4):975-82.

Girdhani S, Bhosle SM, Thulsidas SA, Kumar A, Mishra KP. Potencial of radiosensitizing agents in cancer chemo-raditherapy. *J Cancer Res Ther.* 2005; 1(3):129-31.

Gontijo AM, Marcondes JP, Elias FN, de Oliveira ML, de Lima RO, Salvadori DM, *et al.* DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ Mol Mutagen.* 2002; 40(3):190-9.

Gontijo AMMC, Tice R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editores. *Mutagênese ambiental.* Canoas: Editora da Ulbra ; 2003. p. 247-79.

Hamadeh H K, Amin RP, Paules RS, Afshari CA. An overview of toxicogenomics. *Curr Issues Mol Biol.* 2002; 4:45-56.

Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK, *et al.* Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood.* 2006; 108(9):3161-7.

Hooning MJ, Botma A, Aleman BM, Baaijens MH, Bartelink H, Klijn JG, *et al.* Long-term risk of cardiovascular disease in 10-year survivors of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(5):365-75.

Horwitz SM. The emerging role of histone deacetylase inhibitors in treating T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep.* 2011; 6(1):67-72.

Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(5):1171-83.

Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2010; 11(11):1096-106.

Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2010 [citado 20 jan 2011]. disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research *Hematol.* 2009; 523-31.

Jäger U, Böcskör S, Le T, Mitterbauer G, Bolz I, Chott A, *et al.* Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood.* 2000; 95(11):3520-9.

Janssen K, Schlink K, Götte W, Hippler B, Kaina B, Oesch F. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res.* 2001; 486(3):207-16.

Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Pillai MR. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2005; 217(1):17-24.

Keating GM. Rituximab. A Review of its Use in Chronic Lymphocytic Leukaemia, Low-Grade or Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Drugs* 2010; 70 (11):1445-76.

Kelly K M, Perentesis J P. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and markers of genotoxicity to identify patients with Hodgkins's at risk to treatment-related complications. *Ann Oncol.* 2002; 13(1):34-9.

Kennedy C H, Pass H I and Mitchell JB. Expression of Human *mutT* Homologue (*hMTH1*) protein in primary non-small-cell lung carcinomas and histologically normal surrounding tissue. *Free Rad Biol Med.* 2003; 34(11):1447-57.

Kim EJ, Yan C, Ha YS, Jeong P, Yi Kim I, Moon SK, *et al.* Analysis of *hOGG1* genotype as a prognostic marker for muscle-invasive bladder cancer: A novel approach using peptide nucleic acid-mediated, real-time PCR clamping. *Urol Oncol.* 2010a; No prelo.

Kim IS, Kim DC, Kim HG, Eom HS, Kong SY, Shin HJ, *et al.* DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010b; 196(1):31-7.

Klein G, Michaelis J, Spix C, Wibbing R, Eggers G, Ritter J, *et al.* Second malignant neoplasms after treatment of childhood cancer. *Eur J Cancer.* 2003; 39(6):808-17.

Klimm B, Diehl V, Pfistner B, Engert A. Current treatment strategies of the German Hodgkin Study Group (GHSg). *Eur J Haematol.* 2005; 74:125-34.

Klimo P & Connors JM. MOPP/ABV Hybrid Program: Combination Chemotherapy Based on Early Introduction of Seven Effective Drugs for Advanced Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol.* 1985; 3:1174-82.

Knoops L, Haas R, de Kemp S, *et al.* In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma. *Blood.* 2007; 110:1116–22.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Patologia Básica.* 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Lan Q, Zheng T, Shen M, Zhang Y, Wang S, Zahm S H, *et al.* Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Hum Genet.* 2007; 121(2):161-8.

Lee H, Jeon J, Ryu YS, Jeong JE, Shin S, Zhang T *et al.* Disruption of microtubules sensitizes the DNA damage-induced apoptosis through inhibiting nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) DNA-binding activity. *J Korean Med Sci.* 2010; 25(11):1574-81.

Lee JM, Lee YC, Yang SY, Yang PW, Luh SP, Lee CJ, *et al.* Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer.* 2001; 95(4):240-6.

Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJ, *et al.* Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat Res.* 2002;519(1-2): 93-101.

Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair.* 2006; 5(9-10):1234–45.

Liu LV, Bell CB 3rd, Wong SD, Wilson SA, Kwak Y, Chow MS *et al.* Definition of the intermediates and mechanism of the anticancer drug bleomycin using nuclear resonance vibrational spectroscopy and related methods. *Proc Natl Acad Sci.* 2010; 107(52):22419-24.

Liu S, Semenciw R, Mao Y. Increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Canada, 1970-1996: age-period-cohort analysis. *Hematol Oncol.* 2003; 21(2):57-66.

Lorenzo Y, Provencio M, Lombardía L, Díaz R, Silva J, Herrera M, *et al.* Differential genetic and functional markers of second neoplasias in Hodgkin's disease patients. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(15):4823-8.

Madanat-Harjuoja LM, Malila N, Lähteenmäki P, Pukkala E, Mulvihill JJ, Boice JD, *et al.* Risk of cancer among children of cancer patients - a nationwide study in Finland. *Int J Cancer.* 2010; 126(5):1196-205.

Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2005; 31(8):603-17.

Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res.* 2007; 56(4):275-87.

Maule M, Scélo G, Pastore G, Brennan P, Hemminki K, Tracey E *et al.* Risk of second malignant neoplasms after childhood leukemia and lymphoma: an international study. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(10):790-800.

McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis.* 2008; 23(3):183-90.

Mertens AC, Mitby PA, Radloff G, Jones IM, Perentesis J, Kiffmeyer WR, *et al.* XRCC1 and glutathione-S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to radiotherapy-related malignancies in survivors of Hodgkin disease. *Cancer.* 2004; 101(6):1463-72.

Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin's Lymphoma: Evolving concepts with implications for practice. *Hematol.* 2004; 184 – 202.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(2):185-229.

Mo J, Xia Y, Wade TJ, Schmitt M, Le XC, Dang R, *et al.* Chronic arsenic exposure and oxidative stress: OGG1 expression and arsenic exposure, nail selenium, and skin hyperkeratosis in Inner Mongolia. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(6):835-41.

Mols F, Vingerhoets AJ, Coebergh JW, Vreugdenhil G, Aaronson NK, Lybeert ML, *et al.* Better quality of life among 10-15 year survivors of Hodgkin's lymphoma compared to 5-9 year survivors: a population-based study. *Eur J Cancer.* 2006; 42(16):2794-801.

Moser EC, Noordijk EM, van Leeuwen FE, Baars JW, Thomas J, Carde P. Risk of second cancer after treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma; an EORTC cohort study. *Haematologica*. 2006; 91(11):1481-8.

Nadin SB., Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J, Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2006; 239(1):84-97.

Neglia JP, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, *et al*. Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(8):618-29.

Oldem K, Guthrie J, Newton S. A bold new direction for environmental health risk. *Am J Public Health* 2001; 91:1964-7.

Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*. 1989; 117(1):79-92.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 30;123(1):291-8.

Ratnasinghe D, Yao SX, Tangrea JA, Qiao YL, Andersen MR, Barrett MJ, *et al*. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10(2):119-23.

Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK, Boyett JM, Hancock ML, Felix CA, *et al*. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet*. 1999; 354(9172):34-9.

Rositi AR, Cabral IR, Hackel C, da Silva R, Froes ND, Abdel-Rahman SZ. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis in older Southeastern Brazilians. *Cancer Lett*. 2002; 180(2):173-82.

Ruiz JF, Lucas D, García-Palomero E, Saez AI, González MA, Piris MA, *et al.* Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(19):5861-73.

Ryabchenko N, Nasonova V, Antoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, *et al.* Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. *Int J Radiat Biol.* 2003, 79(4):251-7.

Rydeberg B, Johanson KJ, Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanwalt PC, Friedberg EC, editors. *DNA repair mechanism.* New York: Academic Press; 1978. p. 465-8.

Shen MR, Jones LM, Mohrenweiser H. Non conservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 1998; 58: 604-8.

Shenoy P, Maggioncalda A, Malik N, Flowers CR. Incidence Patterns and Outcomes for Hodgkin Lymphoma Patients in the United States. *Adv Hematol.* 2011; No Prelo.

Shenoy PJ, Malik N, Nooka A, Sinha R, Ward KC, Brawley OW, *et al.* Racial differences in the presentation and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma in the United States. *Cancer.* 2010; No Prelo.

Shibutani S, Takeshita M and Grollman A P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 1991; 349(6308):431-4.

Simmons PT, Portier CJ. Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 903-5.

Singh N, Nigam M, Ranjan V, Sharma R, Balapure AK, Rath SK. Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109(4):473-85.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1):184-91.

Spermon JR, Ramos L, Wetzels AM, Sweep CG, Braat DD, Kiemeny LA, *et al.* Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Hum Reprod.* 2006; 21(7):1781-6.

Sudprasert W, Navasumrit P, Ruchirawat M. Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *Int J Hyg Environ Health*. 2006; 209:503–11.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 35(3):206-21.

Tumer TB, Yilmaz D, Tanrikut C, Sahin G, Ulusoy G, Arinç E. DNA repair XRCC1 Arg399Gln polymorphism alone, and in combination with CYP2E1 polymorphisms significantly contribute to the risk of development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2010; 34(10):1275-81.

van Leeuwen FE, Klokman WJ, Hagenbeek A, Noyon R, van den Belt-Dusebout AW, van Kerkhoff EH, *et al*. Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol*. 1994; 12(2):312-25.

Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W, *et al*. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2006; 27(9):1828-34.

Yu J, Mallon MA, Zhang W, Freimuth RR, Marsh S, Watson MA, *et al*. DNA repair pathway profiling and microsatellite instability in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(17):5104-11.

Zhang J, Dhakal IB, Greene G, Lang NP, Kadlubar FF. Polymorphisms in hOGG1 and XRCC1 and risk of prostate cancer: effects modified by plasma antioxidants. *Urology*. 2010; 75(4):779-85.

Zhou F, Zhang W, Wei Y, Zhou D, Su Z, Meng X, *et al*. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leuk Res*. 2007; 31(3):387-93.

## ANEXO 1

<b>Características gerais dos pacientes do grupo pré-terapia</b>						
<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Nº cigarros/dia</b>	<b>Tempo de tabagismo (anos)</b>	<b>Tempo de ex-tabagismo (anos)</b>
<b>MRO</b>	M	19	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-
<b>WRS</b>	M	32	LNH de grandes células B não especificado	10	5	10
<b>EMF</b>	F	37	LNH não especificado	20	5	-
<b>DAS</b>	F	24	LH IIA (esclerose nodular)	20	11	1 mês
<b>ECF</b>	F	41	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-
<b>MP</b>	F	21	LH IIB (esclerose nodular)	-	-	-
<b>MCFS</b>	F	37	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-
<b>AKJ</b>	M	25	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-
<b>ERS</b>	M	33	LNH não especificado	-	-	-
<b>JRLJ</b>	M	19	LH (celularidade mista)	-	-	-
<b>FAP</b>	M	32	LH IVB não especificado	-	-	-
<b>MMGP</b>	F	26	LH IIA não especificado	5	10	3 meses
<b>MISS</b>	F	45	LNH de pequenas células B	-	-	-
<b>PLI</b>	F	36	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-
Total = 14	M: 6 F: 8	30±8 anos	LH: 5; LNH: 9	fumantes: 3 ex-fumantes:1 não fumantes: 10		



**Características gerais dos pacientes do grupo pós-terapia**

<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade ao diagnóstico</b>	<b>Idade atual</b>	<b>Diagnóstico tumoral</b>	<b>Nº de cigarros/dia</b>	<b>Tempo de tabagismo (anos)</b>	<b>Tempo de ex-tabagismo (anos)</b>	<b>Protocolo terapêutico</b>	<b>Dose total de radiação</b>	<b>Dose diária de radiação</b>	<b>Tempo fora do tratamento (anos)</b>
<b>KRC</b>	F	20	28	LH (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	10
<b>RCG</b>	F	18	25	LH (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	8
<b>MJNC</b>	F	21	26	LH não especificado	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	7
<b>CJPA</b>	M	27	31	LH alto grau (esclerose nodular)	5	15	-	ABVD 6 ciclos	40 Gy	1,8 Gy	4
<b>LEB</b>	F	31	44	grandes células B não especificado	-	-	-	CHOP 4 ciclos			5
<b>LMR</b>	M	17	26	LH IIIA não especificado	-	-	-	ABVD 4 ciclos + MOOP	36 Gy	1,8 Gy	10
<b>EM</b>	M	30	36	LH IA (celularidade mista)	10	10	18	ABVD 4 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	7
<b>JRCJ</b>	M	25	28	LH IIIA (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	4
<b>NAR</b>	F	24	31	LH IIIB não especificado	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	10
<b>GOQ</b>	M	21	24	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-	CHOP 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	5
<b>AGA</b>	M	32	36	LH IIIB (celularidade mista)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	6

<b>WBS</b>	M	26	29	LH IVB (celularidade mista)	12	14	-	ABVD 8 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	4
<b>LAA</b>	M	17	23	LH IIA (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	6
<b>FSS</b>	M	25	28	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-	brasileiro	-	-	4
<b>KBV</b>	M	2	21	LNH de células T não especificado	-	-	-	brasileiro	-	-	15
<b>EA</b>	F	14	28	LNH (tipo MALT)	-	-	-	brasileiro	-	-	14
<b>APM</b>	F	20	30	LH IIA (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 4 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	10
<b>ALM</b>	M	24	27	LH IIA não especificado	20	5	3	ABVD 4 ciclos + ESHAP 4 ciclos	32,4 Gy	1,8 Gy	3
<b>PFL</b>	F	20	23	LH (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	3
<b>DCPS</b>	F	17	22	LH IIB (esclerose nodular)	-	-	-	ABVD	36 Gy	1,8 Gy	6
<b>CRLF</b>	M	16	19	LH IIA (esclerose nodular)	10	3	3	ABVD 4 ciclos + ESHAP 4 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	3
<b>JASD</b>	F	34	43	LH IIA (celularidade mista)	-	-	-	ABVD 4 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	9
<b>MRM</b>	M	22	29	LH IIB não especificado	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	7

<b>DCP</b>	F	19	23	LH IIIB não especificado	-	-	-	ABVD 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	5
<b>ACS</b>	M	21	45	LNH não especificado	20	20	2	CHOP 6 ciclos	36 Gy	1,8 Gy	8
<b>JCA</b>	M	32	39	LNH de células T não especificado	-	-	-	CHOP	-	-	8
<b>ETO</b>	M	33	37	LH (predominância linfocítica)	-	-	-	ABVD 4 ciclos + ESHAP 4 ciclos	36 Gy	1,8	3
<b>GSS</b>	M	30	34	LNH de grandes células B não especificado	-	-	-	CHOP	36 Gy	1,8	3
<b>THR</b>	F	12	22	LH III (celularidade mista)	-	-	-	ABVD 4 ciclos + MOPP 2 ciclos	36Gy	1,8 Gy	10
<b>Total: 29</b>	M:17 F:12	22±7 anos	29±7 anos	LH: 21; LNH: 8	fumantes:2 ex-fumantes:4 não fumantes:23				36.01±1,1	1,8±4.10 <sup>-16</sup>	7±3 anos

---

**Características gerais dos indivíduos do grupo controle**


---

<b>Iniciais</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Nº de cigarros/dia</b>	<b>Tempo de tabagismo (anos)</b>	<b>Tempo de ex-tabagismo</b>
<b>DA</b>	F	26	5	5	3
<b>RPP</b>	M	27	2	3	-
<b>GS</b>	F	30	-	-	-
<b>EC</b>	F	27	-	-	-
<b>BFS</b>	F	25	-	-	-
<b>TFG</b>	M	30	-	-	-
<b>BC</b>	M	25	-	-	-
<b>BRD</b>	M	26	-	-	-
<b>MGB</b>	F	28	-	-	-
<b>KG</b>	F	22	-	-	-
<b>JM</b>	M	28	20	10	-
<b>JC</b>	F	22	-	-	-
<b>ANB</b>	F	30	-	-	-
<b>JP</b>	F	29	-	-	-
<b>MSR</b>	F	23	-	-	-
<b>CASB</b>	F	35	-	-	-
<b>RAC</b>	M	35	-	-	-
<b>APGS</b>	F	38	-	-	-
<b>CSF</b>	F	40	-	-	-
<b>ACP</b>	F	45	-	-	-
<b>RC</b>	M	37	-	-	-
<b>ML</b>	M	44	-	-	-
<b>AWDC</b>	M	35	-	-	-
<b>MACA</b>	M	33	-	-	-
<b>LFF</b>	M	32	-	-	-
<b>MF</b>	M	37	-	-	-
<b>PRC</b>	M	46	-	-	-
<b>EPV</b>	F	34	-	-	-
<b>MSM</b>	F	35	-	-	-
<b>Total: 29</b>	<b>M:13 F:16</b>	<b>31±7 anos</b>	<b>fumantes:1 ex-fumantes:1 não fumantes: 27</b>		

---

## ANEXO 2

pre-therapy: patients diagnosed with lymphoma without any antineoplastic treatment;

**Table IV:** *XRCC1*Arg<sup>399</sup>Gln, *XRCC1*Arg<sup>280</sup>His and *hOGG1* Ser<sup>326</sup>Cys genotypes distribution in lymphoma patients and healthy subjects

Genotypes	Pre-therapy (%)	Post-therapy (%)	Controls (%)
<b><i>XRCC1</i>Arg<sup>399</sup>Gln</b>			
Arg/Arg	4 (28,6)	11 (37,9)	16 (55,2)
Arg/Gln	9 (64,3)	12 (41,4)	12 (41,4)
Gln/Gln	1 (7,1)	6 (20,7)	1 (3,4)
<b><i>XRCC1</i>Arg<sup>280</sup>His</b>			
Arg/Arg	11 (78,6)	26 (89,6)	23 (79,3)
Arg/His	3 (21,4)	3 (10,4)	6 (20,7)
<b><i>hOGG1</i> Ser<sup>326</sup>Cys</b>			
Ser/Ser	10 (71,4)	18 (62,1)	19 (65,5)
Ser/Cys	4 (28,6)	10 (34,5)	10 (34,5)
Cys/Cys	-	1 (3,4)	-

post-therapy: patients with history of lymphoma (free of disease) who finished antineoplastic treatment for at least 2 years; controls: healthy subjects; statistical analysis was not performed because of low number of subjects.

## ANEXO 3

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(2 VIAS: paciente e pesquisador responsável)

## I. Identificação do Paciente

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:	Bairro:	
CEP:	Estado:	Telefone:

## II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1- Título do Protocolo da Pesquisa: "Efeitos toxicogenômicos tardios de terapias antineoplásicas para linfomas".
- 2- Pesquisadores responsáveis: João Paulo de Castro Marcondes, Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, Rafael Dezen Gaiolla (médico hematologista) e Dra. Lígia Niéro-Melo (hematologista responsável).
- 3- Avaliação de risco da Pesquisa: sem risco, visto que serão coletados apenas 10 mL de sangue por punção venosa, por profissional habilitado e usando material descartável.

## III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

- 1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: Os pacientes diagnosticados com linfoma são submetidos à radio e quimioterapia, que podem levar a efeitos colaterais a curto e longo prazo. Desta forma, estamos propondo avaliar a presença de alterações genéticas que podem favorecer tais complicações, bem como, influenciar na resposta individual a tais tratamentos.
- 2 - Procedimentos utilizados: serão coletados, por profissional qualificado e utilizando material descartável, 10 mL de sangue periférico por punção venosa. A amostra será utilizada neste estudo e uma alíquota armazenada para análises futuras em estudos que serão encaminhados ao Comitê de Ética oportunamente para avaliação. Além disso, será aplicado pelos pesquisadores responsáveis, um questionário detalhado sobre os hábitos de vida de todos os pacientes. Ressaltamos, ainda, que serão utilizados, quando necessário, os dados contidos nos **prontuários médicos** de cada paciente.
- 3 - Desconfortos e riscos: o único desconforto físico é devido à coleta de sangue por punção venosa.
- 4 - Benefícios que poderão ser obtidos: contribuir, futuramente, para o estabelecimento de terapias individualizadas e identificação precoce de pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento de efeitos colaterais relacionadas ao tratamento. Não haverá benefício direto e imediato aos pacientes participantes do estudo.

## IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?

[  ] SIM[  ] NÃO

- 2- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.  
 SIM  NÃO
- 3- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?  
 SIM  NÃO
- 4- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 5- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 6- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 7- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?  
 SIM  NÃO

#### V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

ou

\_\_\_\_\_  
 Pesquisador

\_\_\_\_\_  
 Paciente ou Responsável

Este documento, após aprovação do CEP, será elaborado em duas vias, sendo uma destinada ao sujeito da pesquisa e a outra para o arquivamento pelo pesquisador.





**III – História Médica e Tratamento (a ser obtida do prontuário)****1. Tipo e grau da neoplasia:**

.....  
 .....  
 .....

**2. Data e idade ao diagnóstico.....**

**3. Terapia(s) adotada(s):****3.1. radioterapia:**

- Campo irradiado: cervical ( ) torácico ( )

- Dose Total  
 (Gy):.....

- Dose diária  
 (Gy):.....

- Nº de  
 semanas:.....

**3.2. quimioterapia**

- Drogas e concentrações utilizadas (mg/Kg):

.....  
 .....  
 .....  
 .....

- Protocolo adotado:

.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

**4. Data da última terapia.....**

## ANEXO 5

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(2 VIAS: voluntário e pesquisador responsável)

## I. Identificação do Voluntário

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:	Bairro:	
CEP:	Estado:	Telefone:

## II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 4- Título do Protocolo da Pesquisa: "Efeitos toxicogênicos tardios de terapias antineoplásicas para linfomas".
- 5- Pesquisadores responsáveis: João Paulo de Castro Marcondes, Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, Rafael Dezen Gaiolla (médico hematologista) e Dra. Lígia Niéro-Melo (hematologista responsável).
- 6- Avaliação de risco da Pesquisa: sem risco, visto que serão coletados apenas 10 mL de sangue por punção venosa, por profissional habilitado e usando material descartável.

## III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

- 1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: Os pacientes diagnosticados com linfoma são submetidos à radio e quimioterapia, que podem levar a efeitos colaterais a curto e longo prazo. Desta forma, estamos propondo avaliar a presença de alterações genéticas que podem favorecer tais complicações, bem como, influenciar na resposta individual a tais tratamentos.
- 2 - Procedimentos utilizados: serão coletados, por profissional qualificado e utilizando material descartável, 10 mL de sangue periférico por punção venosa. A amostra será utilizada neste estudo e uma alíquota armazenada para análises futuras em estudos que serão encaminhados ao Comitê de Ética oportunamente para avaliação. Além disso, será aplicado pelos pesquisadores responsáveis, um questionário detalhado sobre os hábitos de vida de todos os pacientes. Ressaltamos, ainda, que serão utilizados, quando necessário, os dados contidos nos prontuários médicos de cada paciente.
- 3 - Desconfortos e riscos: o único desconforto físico é devido à coleta de sangue por punção venosa.
- 4 - Benefícios que poderão ser obtidos: contribuir, futuramente, para o estabelecimento de terapias individualizadas e identificação precoce de pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento de efeitos colaterais relacionadas ao tratamento. Não haverá benefício imediato e direto aos pacientes participantes do estudo.

## IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 8- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?

[   ] SIM

[   ] NÃO

- 9- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.  
 SIM  NÃO
- 10- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?  
 SIM  NÃO
- 11- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 12- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 13- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 14- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?  
 SIM  NÃO

#### V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pesquisador

Voluntário

Este documento, após aprovação do CEP, será elaborado em duas vias, sendo uma destinada ao sujeito da pesquisa e a outra para o arquivamento pelo pesquisador.

