

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Triterpenos pentacíclicos e sua atividade frente a células de leucemia mieloide crônica:
revisão da literatura e prospecção de novos inibidores de BCR-ABL1

DÉBORA RENZ BARRETO VIANNA

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Triterpenos pentacíclicos e sua atividade frente a células de leucemia mieloide crônica:
revisão da literatura e prospecção de novos inibidores de BCR-ABL1

Dissertação apresentada por
Débora Renz Barreto Vianna para
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Diogo André Pilger

PORTO ALEGRE, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Mestrado Acadêmico, e aprovada em 27 de setembro de 2021 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Grace Gosmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marcela Silva Lopes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Renz Barreto Vianna, Débora
Triterpenos pentacíclicos e sua atividade frente a células de leucemia mieloide crônica: revisão da literatura e prospecção de novos inibidores de BCR-ABL1 / Débora Renz Barreto Vianna. -- 2021. 140 f.
Orientador: Diogo André Pilger.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Leucemia mieloide crônica. 2. BCR-ABL1. 3. Terapia alvo-específica. 4. Triterpenos pentacíclicos. 5. Planejamento de fármacos. I. André Pilger, Diogo, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido através de uma colaboração entre o Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) e o Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS), ambos localizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na cidade de Porto Alegre. Para sua realização, a autora recebeu bolsa de estudos do CNPq (Abril, 2019 – Dezembro, 2020) e da CAPES (Janeiro, 2021 – Março, 2021).

Esta dissertação foi estruturada conforme as recomendações para elaboração de Teses e Dissertações do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFRGS), e organizada no modelo de encarte de publicações, em dois capítulos, sendo o capítulo 1 composto por um artigo científico e o capítulo 2 composto de resultados experimentais preliminares.

À minha família,
pelo amor, suporte e incentivo ao longo de todo caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Diogo André Pilger, por embarcar comigo nessa jornada desafiadora, pela orientação, disponibilidade, confiança, parceria e amizade, e por todos ensinamentos e exemplos, que, tenho certeza, são essenciais para o meu desenvolvimento profissional.

À professora Dra. Simone Gnoatto, por acreditar na colaboração e no projeto, por todos os conselhos, apoio e incentivo, fundamentais nos momentos de dificuldade e insegurança, e pela enorme contribuição à minha trajetória.

À Jessica, pela paciência e dedicação em ensinar, pelo companheirismo incansável, pelos dias e noites de laboratório e, principalmente, por ter se tornado uma amiga que vou levar para o resto da vida.

À Fernanda, por todo conhecimento compartilhado, pelo convívio e auxílio no laboratório, por ser exemplo e inspiração de tantas maneiras, e pela grande amizade que também levo para a vida toda.

Aos colegas e amigos do LABC, pelo aprendizado e pelos ótimos momentos, especialmente à Camila e à Carol, pela imensurável ajuda e dedicação, e aos colegas e amigos do LaFiS, por me ensinarem e ajudarem tanto, e pelo convívio no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade, e à Capes e ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Aos meus queridos amigos e familiares, pelo apoio, suporte e paciência.

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor, carinho, cuidado e paciência, por sempre acreditarem em mim e apoiarem as minhas escolhas, e por terem me ensinado o valor dos estudos.

Ao Carlos, por sempre me incentivar a ir atrás dos meus sonhos, pelo exemplo de determinação e força de vontade, por toda paciência, compreensão, amor e companheirismo, por ser meu melhor amigo e porto seguro, e pela vida que estamos construindo juntos.

RESUMO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica caracterizada pelo cromossomo *Philadelphia* (Ph⁺), resultante da translocação t(9;22)(q34;q11), que origina uma oncoproteína, BCR-ABL1, com hiperatividade tirosina cinase que promove proliferação e sobrevivência celular descontroladas. O tratamento da LMC consiste no uso de inibidores de tirosina cinase (ITC); entretanto, casos de resistência representam um importante desafio no manejo da doença. Os ácidos betulínico (AB) e ursólico (AU) são triterpenos pentacíclicos com relevante atividade contra variados tipos de câncer, porém com baixa seletividade de alvo, além de alta lipofilia e baixa biodisponibilidade que prejudicam seu uso terapêutico. Considerando esse cenário, o presente estudo teve como objetivo fazer uma ampla revisão da atividade de triterpenos pentacíclicos naturais e semissintéticos no tratamento de células de LMC, além de planejar e produzir novos inibidores de BCR-ABL1 a partir de AB e AU. Através do artigo de revisão, demonstramos que os triterpenos pentacíclicos são promissores agentes pró-apoptóticos em células de LMC e que seus derivados representam oportunidades no desenvolvimento de novos fármacos para combate da doença. Visando obter seletividade para inibição de BCR-ABL1, 202 novos derivados triterpênicos foram planejados com base em fragmentos moleculares dos cinco ITC aprovados para tratamento da LMC. Compostos promissores foram identificados através de ensaios de *docking* molecular, com modelos proteicos de BCR-ABL1, e de predição *in silico* de características farmacológicas. Os derivados JDB-28I e JDU-28I foram produzidos por semissíntese a partir de AB e AU, respectivamente. O composto JDB-28I foi purificado, elucidado por análises de RMN e espectrometria de massas, e avaliado *in vitro* frente a células K562 (Ph⁺) e células mononucleares saudáveis de sangue periférico. Resultados preliminares indicam o potente valor de IC₅₀ em K562, porém com baixo índice de seletividade para células leucêmicas. Dentre as perspectivas do estudo encontram-se a purificação e a caracterização de JDU-28I, bem como sua avaliação *in vitro*, além da investigação dos mecanismos de citotoxicidade dos compostos sintetizados para confirmação de atividade anti-BCR-ABL1.

Palavras-chave: leucemia mieloide crônica; BCR-ABL1; terapia alvo-específica; triterpenos pentacíclicos; planejamento de fármacos.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematologic neoplasm characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph+), resulting from the t(9;22)(q34;q11) translocation, which originates an oncoprotein, BCR-ABL1, with tyrosine kinase hyperactivity that promotes uncontrolled cell proliferation and survival. CML treatment consists of tyrosine kinase inhibitors (TKI); however, cases of resistance represent an important challenge in managing the disease. Betulinic (BA) and ursolic (UA) acids are pentacyclic triterpenes with relevant activity against several types of cancer, though with poor target selectivity, as well as high lipophilicity and low bioavailability that affect their therapeutic use. Considering this context, this study aimed to make a comprehensive review of the activity of natural pentacyclic triterpenes and their semi-synthetic derivatives in the treatment of CML cells, in addition to planning and producing new BCR-ABL1 inhibitors derivatives from BA and UA. Through the review article, we showed that pentacyclic triterpenes are promising pro-apoptotic agents against CML cells and that their derivatives represent opportunities for the development of new drugs to treat the disease. Aiming to obtain selectivity for BCR-ABL1 inhibition, 202 new triterpene derivatives were planned based on molecular fragments of the five TKI approved for the treatment of CML. Promising compounds were identified through molecular docking assays, with protein models of BCR-ABL1, and in silico prediction of pharmacological features. Derivatives JDB-28I and JDU-28I were produced by semisynthesis from BA and UA, respectively. Compound JDB-28I was purified, elucidated by NMR analysis and mass spectrometry, and evaluated in vitro against K562 cells (Ph+) and healthy peripheral blood mononuclear cells. Preliminary results indicate a potent IC₅₀ value in K562, with a low selectivity index for leukemic cells. Among the perspectives of the study are the purification and characterization of JDU-28I, as well as its in vitro evaluation, in addition to the investigation of the mechanisms involved in the cytotoxicity of the synthesized compounds, to confirm anti-BCR-ABL1 activity.

Keywords: chronic myeloid leukemia; BCR-ABL1; targeted therapy; pentacyclic triterpenes; drug design.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABL1</i>	Tirosina-cinase 1 de Abelson (do inglês, <i>Abelson tyrosine-protein kinase 1</i>)
Akt	Proteína cinase B
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	Proteína X associada a Bcl-2 (do inglês, <i>Bcl-2 associated X</i>)
Bcl-2	Linfoma de células B 2 (do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>)
Bcl-xL	Linfoma de células B extragrande (do inglês, <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
<i>BCR</i>	Região de ponto de interrupção de cluster (do inglês, <i>Breakpoint cluster region</i>)
CCyR	Resposta citogenética completa (do inglês, <i>Complete Cytogenetic Response</i>)
CHR	Resposta hematológica completa (do inglês, <i>Complete Hematologic Response</i>)
DL50	Dose letal mediana
DMR	Resposta molecular profunda (do inglês, <i>Deep Molecular Response</i>)
DP	Desvio padrão
FA	Fase acelerada
FB	Fase blástica
FC	Fase crônica
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
Gfi-1	Repressor de transcrição independente de fator de crescimento 1 (do inglês, <i>Growth factor independent 1 transcriptional repressor</i>)
IC50	Concentração inibitória média
IFN α	Interferon-alfa

ITC	Inibidor de tirosina-cinase
LMC	Leucemia mieloide crônica
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MDR1	Proteína de resistência a múltiplas drogas (do inglês, <i>Multidrug Resistance Protein 1</i>)
MMR	Resposta molecular maior (do inglês, <i>Major Molecular Response</i>)
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina (do inglês, <i>Mammalian target of rapamycin</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PCyR	Resposta citogenética parcial (do inglês, <i>Partial Cytogenetic Response</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
P-gp	Glicoproteína-P
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês, <i>Protein Kinase C</i>)
Ras	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato (do inglês, <i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>)
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real quantitativa
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription</i>)
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoéticas
TFR	Remissão livre de tratamento (do inglês, <i>Treatment-Free Remission</i>)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO T(9;22)(Q34;Q11).....	29
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DOS MECANISMOS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DO CLONE LEUCÊMICO POR BCR-ABL1 NA LMC.....	31
FIGURA 3. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS CINCO INIBIDORES DE TIROSINA-CINASE (ITC) APROVADOS PELO FDA PARA O TRATAMENTO DA LMC.....	33
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS INIBIDORES DE TIROSINA-CINASE (ITC) EM CÉLULAS PH+.....	34
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DOS DOIS PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ITC.....	38
FIGURA 6. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS TRITERPENOS PENTACÍCLICOS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO.....	42
FIGURA 7. ESQUEMA ORGANIZACIONAL DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO APRESENTADO NESSA DISSERTAÇÃO, O QUAL FOI DIVIDIDO EM DOIS CAPÍTULOS.....	47
FIGURA 8. MODIFICAÇÕES PLANEJADAS PARA AS POSIÇÕES C-3 (À ESQUERDA, EM ROXO) E C-28 (À DIREITA, EM LARANJA) PARA AMBOS OS TRITERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO E ÁCIDO URSÓLICO.....	78
FIGURA 9. EXEMPLIFICAÇÃO DA NOMENCLATURA ATRIBUÍDA AOS NOVOS COMPOSTOS.....	79
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DOS 10 DERIVADOS DO AB COM MELHORES ESCORES DE INTERAÇÃO COM BCR-ABL1 NO DOCKING MOLECULAR.....	86
FIGURA 11. LISTAGEM ILUSTRATIVA DOS ESCORES DE INTERAÇÃO OBSERVADOS EM ENSAIO DE DOCKING MOLECULAR EM GOLD FRENTE À PROTEÍNA BCR-ABL1 SELVAGEM (3QRI) E COM A MUTAÇÃO T315I (3QRJ) PARA AS MOLÉCULAS PLANEJADAS, EM ORDEM DECRESCENTE.....	87
FIGURA 12. ESTRUTURAS QUÍMICAS DE GLB1A E GLB5A, DERIVADOS DO AB QUE CONTÊM A MODIFICAÇÃO 28A EM C-28 EM COMUM COM AS MOLÉCULAS PLANEJADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	88
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS GERADOS EM SWISSTARGETPREDICTION PARA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA PROMISCUIDADE DE ALVOS DOS DERIVADOS PROPOSTOS.....	92

FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O ITC IMATINIBE, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	94
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O ITC PONATINIBE, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	95
FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O DERIVADO JDB-28I, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	96
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O DERIVADO JDB-3J-28I, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	96
FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O DERIVADO JDU-28I, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	98
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE O SÍTIO ALVO DE 3QRI E 3QRJ E O DERIVADO JDU-3J-28I, OBSERVADAS EM DOCKING MOLECULAR.	98
FIGURA 20. ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPOSTOS JDB-28I E JDU-28I, COM CARBONOS DIAGNÓSTICOS PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL POR ¹ H E APT RMN.	99
FIGURA 21. ESPECTRO DE ¹ H RMN DA AMOSTRA JDB-28I PREPARADA EM DIMETILSULFÓXIDO DEUTERADO. ESPECTRO INDICATIVO DE ALTO TEOR DE PUREZA NA AMOSTRA.	100
FIGURA 22. ESPECTRO DE APT RMN DA AMOSTRA JDB-28I PREPARADA EM DIMETILSULFÓXIDO DEUTERADO. ESPECTRO INDICATIVO DE ALTO TEOR DE PUREZA NA AMOSTRA.	101
FIGURA 23. ESPECTRO DE APT RMN DA AMOSTRA JDU-28I PREPARADA EM CLOROFÓRMIO DEUTERADO. ESPECTRO INDICATIVO DE BAIXO TEOR DE PUREZA NA AMOSTRA.	102
FIGURA 24. CROMATOGRAMAS UFLC-UV/VIS DE JDU-28I E DE JDB-28I.	103
FIGURA 25. ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA JDB-28I.	103
FIGURA 26. ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA JDU-28I.	104
FIGURA 27. CURVAS DOSE-RESPOSTA APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO DE CÉLULAS K562 E CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) COM OS COMPOSTOS GLB1A E GLB5A.	106
FIGURA 28. CURVA DOSE-RESPOSTA OBTIDA PELO TRATAMENTO DE CÉLULAS K562, MODELO CELULAR DE LMC, BEM COMO DE PBMC, CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS SAUDÁVEIS, COM JDB-28I POR 48H.	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CRITÉRIOS PARA MONITORAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA AO TRATAMENTO COM ITC DE PRIMEIRA ESCOLHA SEGUNDO A EUROPEAN LEUKEMIA NET (ELN).....	35
TABELA 2. ESCORES DE INTERAÇÃO COM O SÍTIO ALVO DA PROTEÍNA BCR-ABL1 SELVAGEM (3QRI) E MUTADA EM T315I (3QRJ) GERADOS PELO ENSAIO DE DOCKING MOLECULAR EM GOLD PARA AS MOLÉCULAS MAIS PROMISSORAS DENTRE AS PLANEJADAS (EM CINZA CLARO), PARA OS CONTROLES (DESTACADOS EM VERDE PARA 3QRI E EM AZUL PARA 3QRJ), E PARA OS COMPOSTOS DA QUIMIOTECA DO LAFIS, GLB1A E GLB5A (DESTACADOS EM LARANJA PARA 3QRI E EM ROSA PARA 3QRJ).	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	25
1.1. <i>Histórico da leucemia mieloide crônica (LMC)</i>	27
1.2. <i>Patofisiologia da LMC</i>	29
1.3. <i>Diagnóstico e estadiamento da LMC</i>	31
1.4. <i>Tratamento da LMC</i>	32
1.5. <i>Resistência ao tratamento com inibidores de tirosina-cinase</i>	37
1.6. <i>Fontes naturais de compostos bioativos</i>	40
1.7. <i>Triterpenos pentacíclicos no tratamento da LMC</i>	41
2. OBJETIVOS GERAIS	45
3. CAPÍTULO 1: ARTIGO DE REVISÃO	49
4. CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	77
5. DISCUSSÃO GERAL	111
6. CONCLUSÕES GERAIS	121
7. PERSPECTIVAS	123
8. REFERÊNCIAS	125
9. ANEXOS	135

1. INTRODUÇÃO GERAL

Leucemias são neoplasias hematológicas que abrangem, atualmente, um conjunto bastante diversificado de doenças, que podem ser classificadas com base na linhagem celular comprometida, linfoide ou mieloide, e no seu tempo de desenvolvimento, agudo ou crônico. No Brasil, são esperados para cada ano do triênio 2020-2022, em torno de 5.920 novos casos de leucemia em homens e 4.890 em mulheres (INCA, 2020). A categorização de tumores dos tecidos linfoides e hematopoiético pela Organização Mundial da Saúde (OMS) divide essas doenças em 9 grandes grupos, de acordo com critérios morfológicos, citoquímicos, imunofenotípicos, genéticos, clínicos e prognósticos; assim, a leucemia mieloide crônica (BCR-ABL1 positiva) se enquadra no grupo das neoplasias mieloproliferativas, enquanto a rara leucemia mieloide crônica atípica (BCR-ABL1 negativa) pertence ao grupo das neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, com uma sobreposição de características dos grupos de neoplasias mieloproliferativas e de síndromes mielodisplásicas (ARBER et al., 2016).

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa maligna de células-tronco hematopoéticas, de desenvolvimento lento, que corresponde a cerca de 15 a 20% de todos os casos de leucemia em adultos, com incidência mundial estimada de 1 a 2 novos casos a cada 100.000 habitantes (FLIS; CHOJNACKI, 2019; JABBOUR; KANTARJIAN, 2020). A taxa de mortalidade anual da LMC reduziu expressivamente ao longo das duas últimas décadas com a introdução de terapia-alvo no manejo da doença, após o desenvolvimento do inibidor de tirosina-cinase imatinibe, passando de 10-20% para 1-2% (O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

A LMC é frequentemente diagnosticada em exames hematológicos de rotina como o hemograma, com importante leucocitose, e aproximadamente metade dos pacientes são assintomáticos ao diagnóstico. Quando manifestos, os sintomas podem incluir fraqueza e perda de peso, comumente resultantes de anemia, suor noturno e esplenomegalia. Com a progressão da doença de sua fase crônica para a blástica, que corresponde à forma mais grave da doença, sintomas como febre, dores ósseas, cefaleia, trombose, hemorragia ou sinais de leucostasia em vasos cerebrais ou pulmonares (como dispneia, confusão e dificuldade locomotora) se tornam mais comuns (APPERLEY, 2015; O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

1.1. Histórico da leucemia mieloide crônica (LMC)

Datam de 1845 os primeiros relatos, ocorridos em diferentes ocasiões na Europa, por Bennett, Craigie e Virchow, de pacientes cuja sintomatologia leucêmica, como hepatoesplenomegalia, fraqueza, febre, alteração na viscosidade sanguínea e leucocitose, conferiu os primeiros diagnósticos de uma doença ainda não identificada, mas que em 1847 seria denominada leucemia (*“leukämie”*) por Virchow. Em 1870, Neumann sugere a existência da leucemia do tipo mieloide (*“myelogeneous”*) ao observar em necrópsia de um paciente com leucemia alterações importantes no aspecto da medula óssea (GEARY, 2000).

Apesar destes avanços no conhecimento a respeito da leucemia, pouco se sabia sobre sua etiologia. Bennett e Virchow inicialmente suspeitavam de uma possível origem infecciosa, hipótese que logo foi descartada por falta de evidências (GEARY, 2000). Apenas após a Segunda Guerra Mundial, com o acompanhamento de sobreviventes dos ataques de Hiroshima e Nagasaki, no Japão, foi possível confirmar a radiação como um agente leucemogênico ao relacionar-se a exposição à radiação emitida pelas explosões com o desenvolvimento de leucemias, com predominância das agudas e da mieloide crônica (FOLLEY; BORGES; YAMAWAKI, 1952). Porém, até então, ainda não estava claro o mecanismo envolvido na indução dos diferentes clones leucêmicos; entretanto, logo começaria a ser elucidado o papel de alterações genético-moleculares no processo de leucemogênese da LMC.

Em 1960, com as técnicas de cultura primária de células de sangue periférico e microscopia óptica disponíveis à época, os pesquisadores Peter Nowell e David Hungerford, da Universidade da Pensilvânia e do Instituto de Pesquisa em Câncer, na Filadélfia, descreveram a presença recorrente de um cromossomo muito pequeno em células leucêmicas provenientes de dois pacientes diagnosticados com leucemia granulocítica crônica e, ainda, a ausência dessa alteração cromossômica em leucócitos provenientes de doadores saudáveis e em células leucêmicas de pacientes diagnosticados com leucemia granulocítica aguda (NOWELL; HUNGERFORD, 1960). Este seria o primeiro relato do que posteriormente recebeu o nome de cromossomo

Philadelphia (Ph), devido ao local de seu descobrimento, e viria então a ser reconhecido como marcador citogenético da LMC, presente em praticamente todos os casos da doença, sendo o acontecimento essencial e suficiente para iniciação do clone leucêmico (SOVERINI et al., 2018).

Janet Rowley, em 1973, ao estudar células mitóticas de nove pacientes com LMC utilizando colorações de Giemsa e fluorescência para microscopia, identificou que o cromossomo Ph, presente em células de todos os pacientes estudados, era resultado de uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Ainda, Rowley observou que essa alteração cromossômica era independente do estágio da LMC apresentado pelo paciente, indicando então sua possível presença desde o início até o fim do desenvolvimento da doença (ROWLEY, 1973).

Todos esses achados levaram a LMC a se tornar a primeira neoplasia humana a ser consistentemente associada a uma anomalia cromossômica (SOVERINI et al., 2018). Porém, apenas alguns anos mais tarde, com o advento e aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular, foi possível determinar as regiões e respectivos genes dos cromossomos 9 e 22 comprometidos com a translocação, bem como suas consequências. Na primeira metade dos anos 1980, houve a identificação da transferência do oncogene humano *Abelson tyrosine-protein kinase 1 (ABL1)*, originalmente localizado no cromossomo 9, para o cromossomo 22, em justaposição à porção restante do gene à época descoberto e denominado *breakpoint cluster region (BCR)*, após as quebras e translocação $t(9;22)(q34;q11)$, originando o cromossomo Ph (Figura 1). Assim, a consequente formação de um oncogene quimérico *BCR-ABL1* e seu produto proteico BCR-ABL1, com atividade tirosina-cinase constitutivamente ativada, foi logo associada à transformação maligna da LMC (GROFFEN et al., 1984; GROFFEN; HEISTERKAMP, 1987; KLEIN et al., 1982). Essas descobertas essenciais abriram muitas portas para a elucidação da patofisiologia dessa leucemia e para o desenvolvimento de terapia alvo-específica.

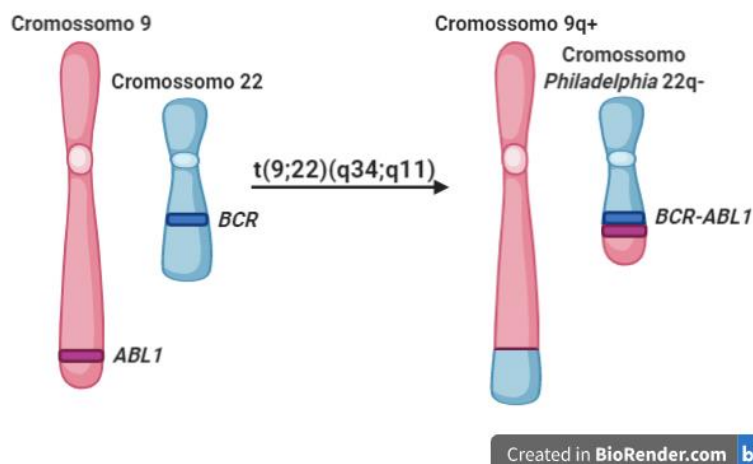


Figura 1. Representação da translocação $t(9;22)(q34;q11)$. A alteração resulta na formação do cromossomo Philadelphia, considerado marcador citogenético da LMC por carregar o oncogene de fusão BCR-ABL1, responsável pelo desenvolvimento do clone leucêmico. Imagem criada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com.

1.2. Patofisiologia da LMC

A ocorrência da translocação cromossômica $t(9;22)(q34;q11)$ em células-tronco hematopoiéticas é capaz de dar início ao desenvolvimento do clone leucêmico, sendo um dos poucos casos conhecidos em que apenas uma mutação genética é suficiente para iniciar uma neoplasia. Isso é possível devido à atividade fosforilativa superativa do produto proteico BCR-ABL1 gerado pelo gene de fusão *BCR-ABL1*. Embora as quebras sempre ocorram nos genes *ABL1* e *BCR*, nos cromossomos 9 e 22, respectivamente, sabe-se que a localização específica da quebra pode variar resultando na formação de transcritos distintos e, conseqüentemente, na tradução de diferentes isoformas da proteína BCR-ABL1 (O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

Cerca de 95% dos pacientes com LMC são Ph-positivos; destes, aproximadamente 98% expressam os transcritos e13a2 ou e14a2, que levam à formação de uma proteína BCR-ABL1 com 210kDa ($p210^{BCR-ABL1}$) (ROSS; HUGHES, 2020). Proteínas $p190^{BCR-ABL1}$ e $p230^{BCR-ABL1}$ são observadas principalmente em pacientes com leucemia linfocítica aguda e leucemia neutrofílica crônica, respectivamente, nos casos

em que o cromossomo Ph ocorre nessas doenças (FLIS; CHOJNACKI, 2019; SOVERINI et al., 2018).

A habilidade leucemogênica de BCR-ABL1 é explicada pela sua atividade tirosina-cinase constantemente ativada. A proteína original ABL1 possui um importante domínio regulatório de sua atividade fosforilativa, através do qual por meio da adição de ácido mirístico, processo denominado miristoilação, ocorre a inativação do seu sítio ativo; entretanto, com a quebra e a translocação cromossômica das quais resulta a proteína quimérica BCR-ABL1, esse domínio regulatório é perdido e a proteína permanece em seu estado ativo, podendo assim fosforilar ininterruptamente suas proteínas-alvo (HANTSCHHEL; SUPERTI-FURGA, 2004; SOVERINI et al., 2018).

A proteína BCR-ABL1, através da transferência de um grupamento fosfato da molécula energética adenosina trifosfato (ATP) para diversas proteínas substratos (por exemplo, proteínas CRKL, GRB2 e SHB), desencadeia a ativação de cascatas de sinalização celular que levam à proliferação, escape da morte por apoptose, alteração da adesão e favorecimento da migração celular da medula óssea para o sangue periférico (FRAZER; IRVINE; MCMULLIN, 2007). Ainda, sabe-se que a autofosforilação de BCR-ABL1 é um importante fator para amplificação dos efeitos de sua atividade tirosina-cinase. Representantes de conhecidas vias oncogênicas já estão amplamente descritos como colaboradores à jusante da sinalização leucemogênica por BCR-ABL1, como as cascatas de Ras/MAPK e PI3K/Akt, e os fatores de transcrição STAT5 e Myc (Figura 2) (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000; QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009; REN, 2005).

Patofisiologia da LMC

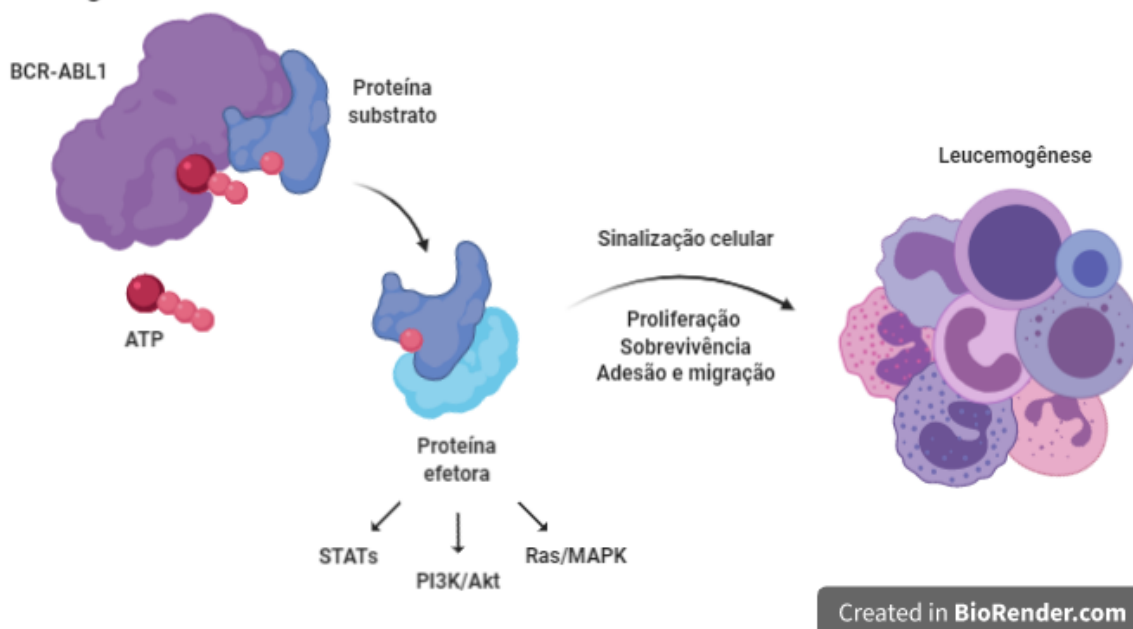


Figura 2. Representação dos mecanismos bioquímicos envolvidos na formação do clone leucêmico por BCR-ABL1 na LMC. Na imagem, é possível observar um grupamento fosfato (representado pelas pequenas esferas rosas no ATP) sendo transferido para uma proteína substrato de BCR-ABL1, que então ativa proteínas efetoras de diferentes vias de sinalização celular. Imagem criada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com.

1.3. Diagnóstico e estadiamento da LMC

A LMC é uma neoplasia trifásica de desenvolvimento lento que inicia com a fase crônica (FC), na qual cerca de 90% dos pacientes são identificados através de hemograma de rotina alterado, com leucocitose e neutrofilia progressivas e de origem inexplicada, geralmente associadas a esplenomegalia (O'BRIEN; JABBOUR, 2016). A análise do aspirado de medula óssea é necessária e resulta em medulograma hiper celular, comumente por hiperplasia de células mieloides em todos os estágios de maturação, incluindo os precursores metamielócitos, mielócitos, promielócitos e até mesmo blastos, refletindo os achados do hemograma. A confirmação da LMC é feita pela identificação do cromossomo Ph em exame citogenético de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) ou da oncoproteína BCR-ABL1 por técnica molecular de reação em

cadeira da polimerase com transcrição reversa em tempo real quantitativa (RT-qPCR) (FLIS; CHOJNACKI, 2019).

Sabe-se que a instabilidade genética e o acúmulo de mutações adicionais nas células leucêmicas, que já possuem uma anomalia cromossômica, estão relacionados à progressão da doença e contribuem para um mau prognóstico com pior resposta terapêutica. Um paciente com FC mal controlada ou não tratada pode progredir para fase acelerada (FA), uma fase de transição para a fase blástica (FB), estágio final e mais agressivo da doença, associado a um tempo de sobrevida médio de 5 meses (O'BRIEN; JABBOUR, 2016; SOVERINI et al., 2018). Com a evolução da LMC ocorre a piora do quadro clínico aliado à acentuação da leucocitose e a FA tem como característica principal a presença de 10 a 19% de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, enquanto a FB se caracteriza por mais de 20% dessas células nesses materiais ou pela presença de um infiltrado blástico extramedular, segundo classificação da Organização Mundial da Saúde (ARBER et al., 2016).

A FB representa uma agudização da doença e, de fato, se apresenta como uma leucemia aguda, na maioria dos casos mieloide (60%), embora em alguns casos também possa se manifestar como linfóide (30%), megacariocítica ou indiferenciada (10%) (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020).

1.4. Tratamento da LMC

Até o início dos anos 2000, o tratamento da LMC era restrito à utilização de medicamentos citotóxicos não específicos como bussulfano, hidroxiureia ou interferon-alfa (IFN α), sendo esse último o tratamento de escolha, isolado ou em associação à citarabina. Como única medida curativa, recorria-se ao transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), que apresenta altos riscos de morbimortalidade e, por isso, não é indicado para todos os casos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020).

A união de todos os conhecimentos obtidos acerca da ocorrência do cromossomo Ph e da consequente formação da oncoproteína quimérica BCR-ABL1 conferiu à doença

uma oportunidade inovadora à época: o alvo terapêutico perfeito, presente somente nas células leucêmicas, portanto, ausente em células normais, diferente do observado nos alvos tumorais estudados até então. Assim, em 1990 começou o desenvolvimento do primeiro inibidor de tirosina-cinase (ITC) com especificidade para BCR-ABL1: um composto líder foi identificado em um *screening* com inibidores de outra cinase, proteína cinase C (PKC), e modificações no esqueleto fenilamino foram sendo realizados objetivando aumentar a especificidade para tirosina-cinases, melhorar atividade celular, reduzir atividade inibitória frente à PKC e melhorar a biodisponibilidade oral, resultando na molécula final do imatinibe (Glivec®, STI571) (Figura 3) (CAPDEVILLE et al., 2002). Apenas 11 anos depois, em 2001, o imatinibe foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos para o tratamento da LMC e, em 2002, depois de ensaios clínicos que comprovaram a superioridade do tratamento com imatinibe frente ao IFN α em pacientes com FC de LMC, esse ITC foi aprovado como primeira escolha de tratamento para todos novos casos diagnosticados da doença (SOVERINI et al., 2018).

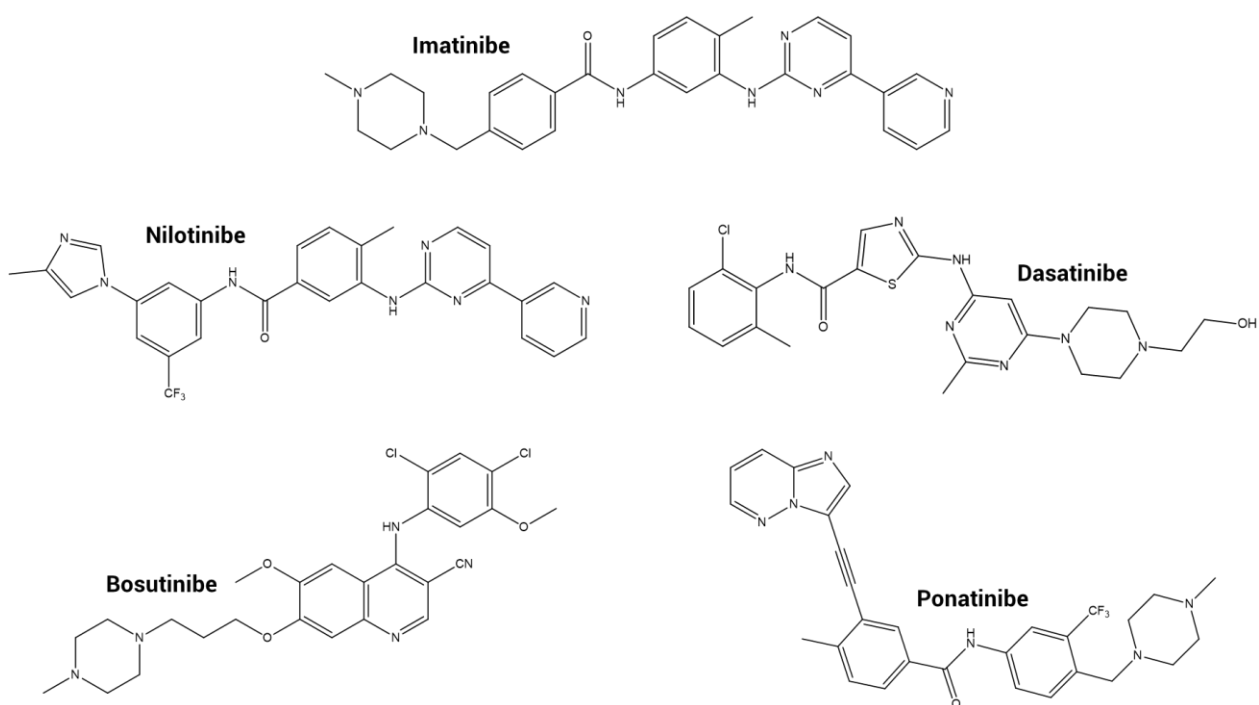


Figura 3. Estruturas moleculares dos cinco inibidores de tirosina-cinase (ITC) aprovados pelo FDA para o tratamento da LMC. Estão representados o imatinibe, ITC de primeira geração, nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe, de segunda geração, e ponatinibe, inibidor de terceira geração. Estruturas desenhadas pela autora no *software* ChemDraw v12.0.

Os ITC atualmente aprovados pelo FDA para tratamento da LMC, são o inibidor de primeira geração, imatinibe, os de segunda geração nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe, e o de terceira geração, ponatinibe (Figura 3). Eles atuam em BCR-ABL1 ao inibir competitivamente o sítio de ligação de ATP na oncoproteína, impedindo que ocorra sua autofosforilação e subsequente fosforilação dos resíduos de tirosina das suas proteínas substrato, impedindo toda sinalização pró-leucemogênica à jusante e levando à remissão da doença (Figura 4). Aspectos relacionados à estrutura química e à escolha para utilização de cada um serão abordados no item referente à resistência aos ITC.

Terapia-alvo com inibidores de tirosina-cinase (ITC)

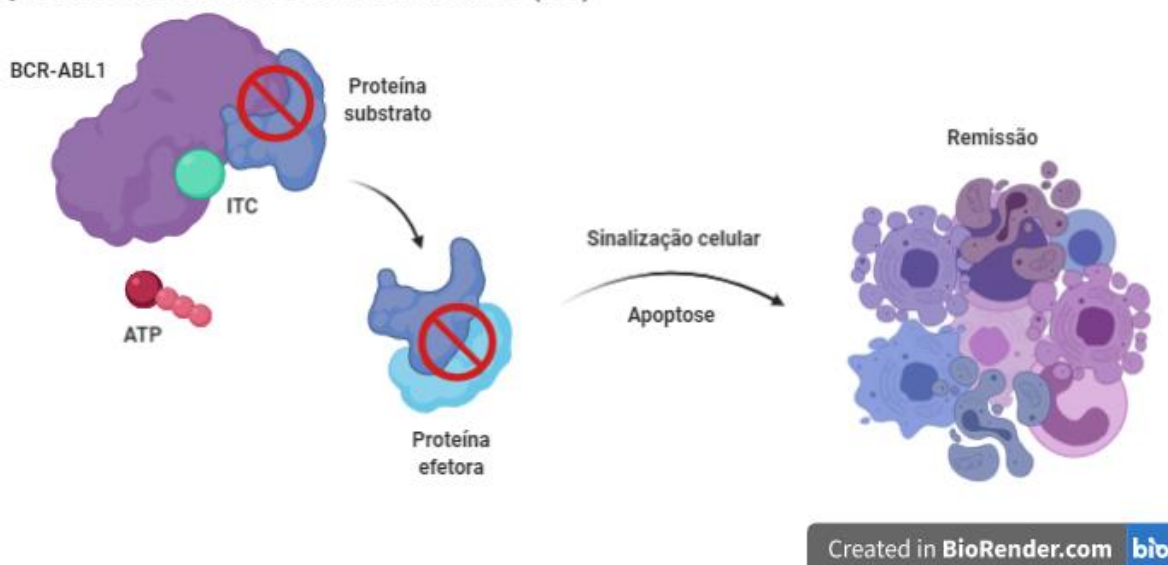


Figura 4. Representação do mecanismo de ação dos inibidores de tirosina-cinase (ITC) em células Ph+. A presença dos ITC impede a fosforilação da proteína substrato e ativação da efetora, consequentemente induzindo à remissão do clone leucêmico. Imagem criada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com.

Atualmente, os objetivos principais do tratamento da LMC são impedir a progressão da doença, melhorar a qualidade de vida do paciente e garantir uma expectativa de vida próxima daquela da população geral, com monitoramento do sucesso terapêutico através da avaliação de remissão (a) hematológica, por normalização do hemograma, (b) citogenética, pela ausência de cromossomo Ph no exame específico e

(c) molecular, por níveis muito baixos ou indetectáveis de transcritos de *BCR-ABL1* conforme critérios estabelecidos pela *European Leukemia Net* (ELN) (Tabela 1) (BACCARANI et al., 2015; FLIS; CHOJNACKI, 2019).

Dessa forma, para sucesso terapêutico, com resposta ótima, o paciente deve apresentar: após 3 meses de tratamento, resposta hematológica completa e níveis de transcritos de *BCR-ABL1* $\leq 10\%$ em relação a *ABL1* normal ou quantidade de cromossomos *Philadelphia* $\leq 35\%$ em metáfases de ao menos 20 células da medula óssea; após 6 meses, níveis de transcritos *BCR-ABL1* $\leq 1\%$ ou resposta citogenética completa (CCyR) com ausência de cromossomos *Philadelphia*; e, após 12 meses, resposta molecular maior (MMR) com níveis de transcritos *BCR-ABL1* $\leq 0,1\%$. Para pacientes candidatos à remissão livre de tratamento (TFR), a resposta ótima em qualquer momento do tratamento é resposta molecular profunda (DMR) com níveis de *BCR-ABL1* $\leq 0,01\%$. Respostas subótimas (alerta e falha) evidenciam a necessidade de ajuste ou troca do tratamento atual (HOCHHAUS et al., 2020).

Tabela 1. Critérios para monitoramento e classificação da resposta terapêutica ao tratamento com ITC de primeira escolha segundo a *European Leukemia Net* (ELN).

Resposta	Ótima	Alerta	Falha
3 meses	BCR-ABL1 $\leq 10\%$ ou Ph+ $\leq 35\%$	BCR-ABL1 $> 10\%$ ou Ph+ 36–95%	CHR ausente ou Ph+ $> 95\%$
6 meses	BCR-ABL1 $\leq 1\%$ ou Ph+ 0 (CCyR)	BCR-ABL1 1–10% ou Ph+ 1–35% (PCyR)	BCR-ABL1 $> 10\%$ ou Ph+ $> 35\%$
12 meses	BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$ (MMR)	BCR-ABL1 0,1–1%	BCR-ABL1 $> 1\%$ ou Ph+ $\geq 1\%$
A qualquer momento	BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$ (MMR)	BCR-ABL1 0,1–1% ou perda de MMR	BCR-ABL1 $> 1\%$, mutações de resistência ou anomalias cromossômicas adicionais de alto risco

BCR-ABL1 = monitoramento de resposta molecular pelos níveis de transcritos de *BCR-ABL1*; Ph+ = monitoramento de resposta citogenética pela quantidade de cromossomos Ph; CHR = Resposta hematológica completa; CCyR = Resposta citogenética completa; PCyR = Resposta citogenética parcial; MMR = Resposta molecular maior. Adaptado de Baccarani *et al.* (2015) e Hochhaus *et al.* (2020).

Ainda, a ELN propõe a remissão livre de tratamento (TFR) como um objetivo da terapia em LMC. Muitos estudos estão em andamento para avaliar os casos elegíveis

para a descontinuação do tratamento com ITC e os riscos de retorno da doença, porém geralmente são inclusos pacientes que passaram por tratamento com ITC por no mínimo 3 anos e possuem ao menos MMR (BCR-ABL $\leq 0,1\%$) sustentada por no mínimo 1 ano, embora melhores resultados pareçam estar relacionados a pacientes que atingiram DMR (BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$). Sabe-se que a chave para atingir TFR em todas neoplasias é uma efetiva terapia de primeira linha; assim, recomenda-se que pacientes mais jovens e sem grandes comorbidades recebam inicialmente um ITC de segunda geração, mais potente que o imatinibe, com o intuito de minimizar as chances de progressão para FA ou FB nos anos iniciais da doença e aumentar as de alcançar TFR com segurança (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020; ROSS; HUGHES, 2020).

Apesar do grande avanço que os ITC trouxeram para a melhora na qualidade de vida e da sobrevivência dos pacientes, logo após a sua aprovação para o tratamento da doença os casos de resistência e má adesão ao tratamento, com conseqüente falha terapêutica, começaram a ser reportados e a ressaltar a relevância desses fatores no manejo da farmacoterapia da LMC. A ocorrência de reações adversas é o principal fator contribuinte para a má adesão à terapia, uma vez que essas afetam a qualidade de vida dos pacientes. Diarreia e constipação são reações comuns a todos ITC, assim como citopenia; hepatotoxicidade com alteração das transaminases e alguns casos de pancreatite são observados principalmente em usuários de nilotinibe e bosutinibe, sendo o nilotinibe também associado à hiperglicemia; sangramentos por alteração na função plaquetária podem ocorrer em pacientes em uso de dasatinibe (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020; O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

Além disso, existem contraindicações importantes devido a conhecidas toxicidades crônicas pelo uso prolongado de determinados ITC. Pacientes com função renal comprometida devem evitar o imatinibe e aqueles com doença pulmonar não devem utilizar dasatinibe, enquanto nilotinibe e ponatinibe são fortemente contraindicados em pacientes com doenças arteriovasculares (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020). A grande classe de inibidores de tirosina-cinase também tem sido amplamente relacionada à cardiotoxicidade (FORCE; KRAUSE; VAN ETTEN, 2007).

Outro importante fator que limita a ampla adesão terapêutica aos ITC é o alto custo desses medicamentos. Em 2013, um grupo de mais de 100 especialistas em LMC de todo o mundo publicou na *Blood*, uma relevante revista científica da área, um artigo em que expõem uma opinião em comum: os custos do tratamento da LMC são muito elevados e insustentáveis, comprometem o acesso de pacientes que necessitam de terapia altamente efetiva, e são danosos à sustentabilidade dos sistemas de saúde. (ABBOUD et al., 2013)

Uma consulta ao portal transparência do Governo Federal do Brasil mostrou o valor de R\$ 50,38 por comprimido de mesilato de imatinibe 400 mg. Considerando que a dose preconizada é de 400 mg por dia, como primeira linha de tratamento para LMC ao primeiro diagnóstico, têm-se um custo mensal em torno de R\$ 1.511,40 por paciente para o sistema público de saúde. (GOVERNO FEDERAL, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Esse valor tem ainda maior impacto levando em consideração que se trata de um tratamento de longa duração. Além disso, quando se avalia esses valores no setor privado, em drogarias, os preços são ainda mais exorbitantes, podendo variar cerca de 3 a 6 vezes esse valor, para medicamentos genéricos (caixa com 30 comprimidos de 400 mg), e até mesmo em torno de 15 vezes para o medicamento referência Glivec® na mesma apresentação (busca realizada em novembro de 2021 em sites de grandes redes).

1.5. Resistência ao tratamento com inibidores de tirosina-cinase

Já estão descritos variados mecanismos pelos quais as células leucêmicas desenvolvem resistência aos ITC, dentre os quais destacam-se dois: (1) como mecanismo BCR-ABL1-dependente, a ocorrência de mutações de ponto no gene *BCR-ABL1* que resulta na troca de um aminoácido de uma posição essencial para a inibição farmacológica da atividade tirosina-cinase de BCR-ABL1, como a mutação T315I, com maior impacto dentre as diversas já relatadas, decorrente da troca de uma treonina por uma isoleucina na posição 315 que impede a interação de todos ITC de primeira e segunda gerações com o sítio de ligação de ATP, e, portanto, frente à qual atualmente

apenas o ponatinibe se mostra efetivo; (2) como mecanismo BCR-ABL1-independente, a superexpressão de bombas de efluxo de xenobióticos, como a glicoproteína-P (P-gp), também conhecida como proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR1), responsável pela expulsão do fármaco do meio intracelular e amplamente associada à quimiorresistência de diversas neoplasias (Figura 5) (SOVERINI et al., 2018).

Resistência ao tratamento com ITC

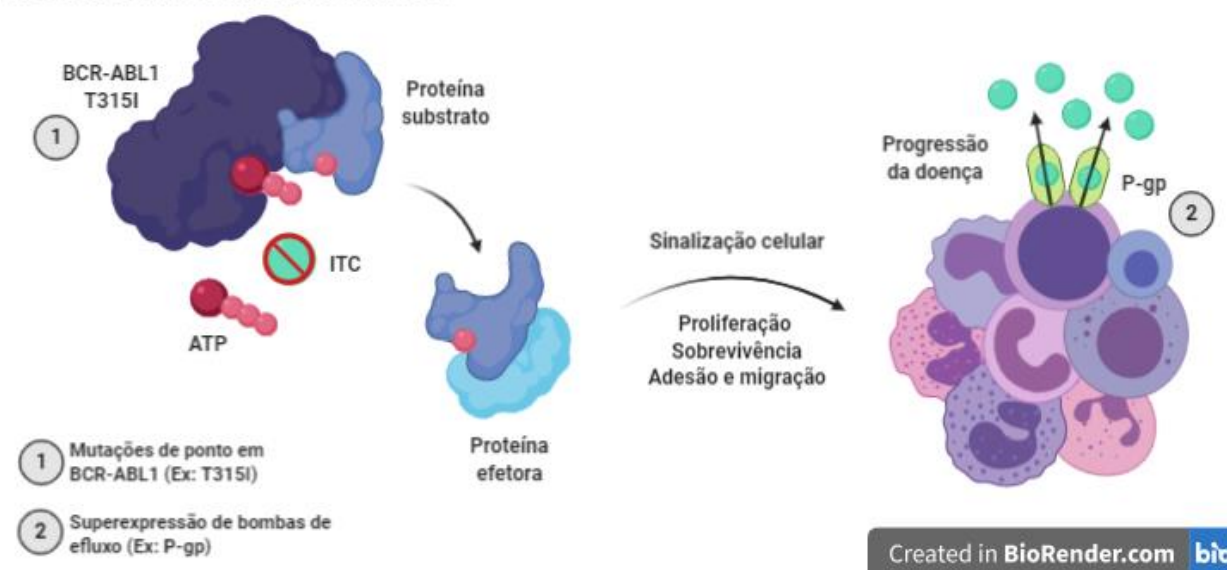


Figura 5. Representação dos dois principais mecanismos de resistência ao tratamento com ITC. São eles: (1) mutações em BCR-ABL1 que impedem a atuação dos ITC e (2) a superexpressão de bombas de efluxo que removem esses fármacos das células. Imagem criada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com.

Os ITC de segunda e terceira geração foram desenvolvidos com o intuito de superar a resistência ao imatinibe. O nilotinibe apresenta modificações estruturais em relação ao imatinibe que conferem maior número de interações de van der Waals e menor contribuição das ligações de hidrogênio com resíduos chave para mutação em BCR-ABL1, conferindo maior potência e eficácia contra grande parte das mutações descritas. Essas modificações incluem a inversão da função amida, a substituição do anel piperazina por 3-metilimidazol e a adição do grupo trifluorometil ao substituinte

anilino-carbonila. Além disso, o nilotinibe não é substrato de P-gp, o que o torna muito menos suscetível a mecanismos de resistência tanto BCR-ABL1-dependentes quanto independentes. O dasatinibe possui menor estrutura química e, assim, interage de forma mais versátil com o sítio ativo de BCR-ABL1, sendo também ativo contra variadas mutações já descritas. Ainda, confere resposta mais rápida e profunda ao tratamento que o imatinibe. Já o bosutinibe possui estrutura química mais diferenciada, uma vez que foi desenvolvido a partir de um inibidor da tirosina-cinase Src, sendo menos seletivo que os ITC anteriores, mas com a vantagem de não ser bom substrato de bombas de efluxo, além de atuar contra várias formas mutantes de BCR-ABL1. Por fim, o representante da terceira geração ponatinibe foi desenvolvido como inibidor duplo de BCR-ABL1 e Src para, especificamente, driblar a mutação T315I, contra a qual é o único que apresenta atividade, inserindo importante alternativa terapêutica ao transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico no manejo de pacientes com essa mutação. Estruturalmente, possui modificações em relação ao nilotinibe (um terminal imidazo[1,2-b]piridazina no lugar do grupo piridina-pirimidina) que otimizam a interação por ligação de hidrogênio dentro do bolsão hidrofóbico onde interage com a proteína-alvo (ROSSARI; MINUTOLO; ORCIUOLO, 2018).

A escolha terapêutica para tratamento da LMC costuma ser uma decisão individualizada para cada paciente, considerando as particularidades de cada caso e o estágio da doença (HOCHHAUS et al., 2020). Entretanto, a primeira linha de tratamento é constituída atualmente de imatinibe e dos ITC de segunda geração nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020). Resistência ao tratamento com qualquer um desses fármacos leva à troca da terapia para ITC de segunda escolha, sendo o ponatinibe recomendado apenas para uso nesses casos ou em pacientes diagnosticados com BCR-ABL1 T315I (O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

Pacientes com resposta subótima ao tratamento com dois ou mais ITC, ou seja, com níveis de transcritos de BCR-ABL1 >1% ou com resposta citogenética inferior à completa apresentando Ph+ >0 (Tabela 1), tem o TCTH alogênico como única alternativa terapêutica (HOCHHAUS et al., 2020). Entretanto, essa abordagem terapêutica tem importantes limitações, sendo a principal delas a busca por doador compatível, com

tempo médio de 3 a 6 meses desde o início do processo até o transplante. Além disso, apresenta melhores resultados em pacientes mais jovens e naqueles com a FC da doença (O'BRIEN; JABBOUR, 2016).

1.6. Fontes naturais de compostos bioativos

Tendo em vista que a incidência de resistência ao tratamento com os ITC existentes representa uma importante problemática e que, embora a maior parte dos pacientes com LMC tratados com ITC tenham bons resultados, com sobrevida global estimada de 83,3% após 10 anos (JABBOUR; KANTARJIAN, 2020), a remissão livre de tratamento duradoura, considerada próxima da cura da doença, ainda é um desafio. Mesmo em pacientes que não apresentam resistência podem existir células Ph+ residuais em níveis praticamente indetectáveis, intimamente relacionadas com o relapso da doença (SOVERINI et al., 2018). Somando-se isso às dificuldades de adesão ao tratamento ou contraindicações específicas devido às reações adversas e toxicidades apresentadas pelos ITC disponíveis, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos para a LMC.

Fontes naturais e sua grande biodiversidade têm sido amplamente exploradas e fornecido uma gama de compostos bioativos para as mais diversas patologias humanas. Conforme revisado por Newman e Cragg (NEWMAN; CRAGG, 2020), entre 1981 e 2019 foram aprovados para tratamento de neoplasias humanas 247 novos agentes antitumorais, dos quais destaca-se que 18 são de origem natural inalterados, representados principalmente pelo paclitaxel, importante agente citotóxico; 43 são derivados de produtos naturais, como o docetaxel, a citarabina e o etoposídeo; e 45 são drogas sintéticas com farmacóforos de produtos naturais e que mimetizam esses tipos de compostos, onde se enquadram os ITC, como imatinibe e ponatinibe.

A OMS estima que 65% da população mundial dependa de medicamentos tradicionais derivados de plantas para seus cuidados primários de saúde, e a vasta utilização dessas na medicina popular tornou-as a fonte dominante de novos compostos

bioativos. A associação de compostos fitoderivados com o tratamento de neoplasias possui um longo histórico. A investigação de agentes hipoglicemiantes na vinca-de-Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don) devido ao seu uso popular em pacientes diabéticos por variadas culturas, levou ao isolamento dos primeiros fitocompostos com atividade antitumoral a serem aprovados para uso clínico, os alcaloides vincristina e vimblastina, após a observação da redução da contagem de leucócitos e da supressão da medula óssea em ratos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009), com aprovação para tratamento de neoplasias humanas na primeira metade da década de 1960 (NEWMAN; CRAGG, 2016). Ainda, Hartwell descreveu em 1982 uma lista contendo mais de 3000 espécies de plantas com relatos no tratamento do câncer, já indicando a diversidade disponibilizada pelas fontes vegetais para pesquisa de agentes antineoplásicos.

1.7. Triterpenos pentacíclicos no tratamento da LMC

Metabólitos secundários de plantas, como fenóis, alcaloides e terpenoides, fornecem uma grande variedade de estruturas químicas, muitas vezes complexas, que contribuem com potenciais múltiplos alvos terapêuticos para a atividade antitumoral observada em compostos botânicos (FAKHRI et al., 2020).

Triterpenos pentacíclicos são fitocompostos que contém 30 carbonos em estrutura cíclica formadas por 6 unidades básicas de isopreno (C_5H_8), sintetizadas em células vegetais pela ciclização do precursor squaleno (KUSHIRO; EBIZUKA, 2010). Essas moléculas são encontradas em uma ampla variedade de plantas, nas folhas, cascas, frutos e raízes, e possuem a função, em células vegetais, de manter as adequadas estrutura e fluidez da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática, de forma semelhante ao colesterol em células mamíferas (GILL; KUMAR; NAVGEET, 2016).

Os triterpenos pentacíclicos podem ser divididos em três grupos – oleanano, ursano e lupano – em relação aos seus diferentes esqueletos químicos. O ácido ursólico (AU) é um representante do grupo ursano, constituído de um esqueleto de cinco ciclos

de seis membros com estereoquímica *cis* nos anéis D e E, enquanto o ácido betulínico (AB) faz parte do grupo lupano com estrutura formada por quatro ciclos de seis membros e um de cinco, e estereoquímica *trans* nos anéis D e E (Figura 6). Esses dois compostos isômeros possuem diversas atividades biológicas descritas, como anti-inflamatória e analgésica (SULTANA; SAEED SAIFY, 2012), antibacteriana (OLOYEDE et al., 2017), antimalárica (INNOCENTE et al., 2012), antiviral (BAGLIN et al., 2005), hepatoprotetora (SARAVANAN; VISWANATHAN; PUGALENDI, 2006), e antitumoral (GILL; KUMAR; NAVGEET, 2016).

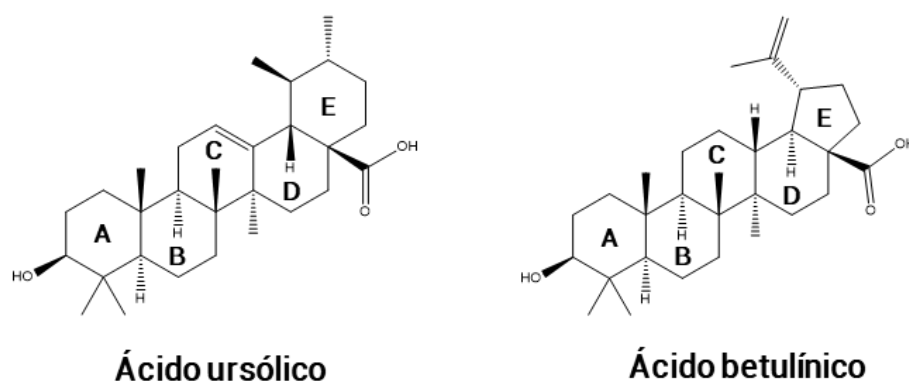


Figura 6. Estruturas moleculares dos triterpenos pentacíclicos ácidos ursólico e betulínico. Estruturas desenhadas no software ChemDraw v12.0.

A atividade antineoplásica de AU e AB tem se destacado nos últimos anos, e diversos estudos têm demonstrado seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos *in vitro* contra diversos tipos tumorais, como os cânceres de próstata, pele, mama, ovário, colo do útero e colorretal, conforme revisado por Chudzik *et al* (2015) e Zhang *et al* (2014). Essas moléculas apresentam efeito citotóxico através da interação com variadas vias de sinalização celular, entre elas as importantes vias oncogênicas PI3K/Akt/mTOR e NF-κB, com uma relevante variabilidade de alvo terapêuticos (BARRETO VIANNA et al., 2021; FAKHRI et al., 2020; GILL; KUMAR; NAVGEET, 2016).

Em relação à LMC, os efeitos antileucêmicos de AU e AB já foram avaliados e resultados bastante promissores estão relatados na literatura, tanto em cultura de linhagem celular Ph⁺ sensível à quimioterapia (FERNANDES et al., 2003; RAGHUVAR

GOPAL et al., 2005; SHAN et al., 2011) quanto em linhagens celulares Ph+ com fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) por superexpressão de P-gp (FERNANDES et al., 2003; SHAN et al., 2011).

Estudos acerca dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade desses compostos em células de LMC demonstram que o AU pode desempenhar sua atividade pró-apoptótica em células K562 (Ph+) pela inibição de STAT5/Akt através da indução do repressor transcricional Gfi-1 (LIN; JIANG; LIU, 2016) e pela regulação da via MAPK com redução na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL (LIU; JIANG, 2007). Além disso, o AB levou as células K562 (Ph+) à apoptose por superexpressão da proteína pró-apoptótica Bax e ativação da protease caspase-3, além de exercer efeito antiproliferativo com parada do ciclo celular na fase S (WU et al., 2010).

Diversos estudos a respeito da citotoxicidade de diferentes triterpenos pentacíclicos naturais, incluindo AB e AU, e de seus derivados semissintéticos, frente às células de LMC, foram recuperados através de uma busca sistemática e analisados em uma revisão que compõe o capítulo 1 dessa dissertação de mestrado. Nesse artigo de revisão, são analisados resultados obtidos tanto com linhagens celulares imortalizadas de LMC quanto com culturas primárias, bem como os mecanismos envolvidos na promoção da morte celular (BARRETO VIANNA et al., 2021).

Apesar da relevante atividade antitumoral apresentada por AB e AU, suas propriedades farmacocinéticas são prejudicadas por sua alta lipofilia, conferindo solubilidade aquosa limitada, rápida metabolização e reduzida biodisponibilidade oral e sistêmica, e dificultando seu uso terapêutico (CHEN et al., 2015; VALDÉS et al., 2016). Além disso, a ausência de atividade inibitória direta em BCR-ABL1, oncoproteína chave da fisiopatologia da LMC, também é um importante fator limitante na utilização desses compostos na terapia da doença, uma vez que o tratamento com ITC se mostra até o momento a melhor forma de manejo. Assim, a produção de novos compostos semissintéticos derivados desses triterpenos, com modificações moleculares planejadas de forma a garantir a melhoria das características farmacológicas e a potencialização da atividade antineoplásica, promovendo um caráter alvo-específico frente à BCR-ABL1,

com a possibilidade de obtenção de novas moléculas ativas inclusive contra os fenótipos de resistência, se mostra necessária e promissora para o desenvolvimento de potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da LMC.

2. OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista as necessidades e possibilidades anteriormente apresentadas, bem como as dificuldades que ainda devem ser superadas para garantir opções de tratamento seguro e eficaz para todos os pacientes com LMC, esse estudo tem como objetivo principal o planejamento, a produção e a avaliação biológica de novos compostos derivados de AB e AU para terapia alvo dessa neoplasia. Assim, para realização desse trabalho, propõe-se a execução dos seguintes objetivos específicos:

1. Revisão teórica abrangente da literatura quanto ao efeito antileucêmico de triterpenos pentacíclicos e seus derivados semissintéticos para tratamento da LMC, e elaboração de um artigo de revisão;
2. Planejamento das modificações estruturais e funcionais a serem realizadas em AB e AU;
3. Avaliação *in silico* por *docking* molecular dos novos compostos planejados a fim de selecionar os de melhor interação com a proteína BCR-ABL1, tanto em sua forma selvagem quanto na variante mutante T315I;
4. Triagem *in silico* dos melhores compostos obtidos na etapa de *docking* molecular quanto às características toxicológicas e farmacocinéticas de interesse, e seleção final dos compostos a serem obtidos por semissíntese;
5. Desenvolvimento de rotas de semissíntese para os compostos selecionados, assim como purificação e caracterização química dos derivados produzidos;
6. Avaliação biológica *in vitro* da atividade citotóxica dos derivados em linhagem celular de LMC (K562) sensível ao tratamento com inibidores de tirosina-cinase;
7. Avaliação *in vitro* de possível efeito citotóxico em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis, para determinação do índice de seletividade para as células leucêmicas em relação às células normais.

Dessa forma, para melhor apresentação dos resultados, a presente dissertação está dividida em dois capítulos, conforme apresentado na Figura 7. O capítulo 1 refere-se ao artigo de revisão intitulado “*Natural and Semisynthetic Pentacyclic Triterpenes for Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Reality, Challenges and Perspectives*”, publicado na revista ChemMedChem em março de 2021, enquanto o capítulo 2 refere-se à descrição dos resultados parciais obtidos nos estudos experimentais.



Figura 7. Esquema organizacional do desenvolvimento do estudo apresentado nessa dissertação, o qual foi dividido em dois capítulos.

O conteúdo completo do capítulo 1, compreendido entre as páginas 51 - 76 da versão completa desta dissertação, foi suprimido por tratar-se de um artigo publicado no periódico *ChemMedChem* (fator de impacto: 3,466), na qualidade de *Review*, intitulado “*Natural and Semisynthetic Pentacyclic Triterpenes for Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Reality, Challenges and Perspectives*”. O artigo faz parte da coleção especial “*BrazMedChem 2019: Medicinal Chemistry in Latin America*”. O manuscrito foi submetido em 15 de janeiro de 2021 e aceito em 07 de março de 2021.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a neoplasm characterized by BCR-ABL1, an oncoprotein with vital role in leukemogenesis. Its inhibition by tyrosine kinase inhibitors represents the main choice of treatment. However, therapeutic failure is worrying given the lack of pharmacological options. Pentacyclic triterpenes are phytochemicals with outstanding antitumoral properties and have also been explored as a basis for the design of potential leads. In this review, we have gathered and discuss data regarding both natural and semisynthetic pentacyclic triterpenes applied to CML cell treatment. We found consistent evidence that the class of pentacyclic triterpenes in general exerts promising pro-apoptotic and antiproliferative activities in sensitive and resistant CML cells, and thus represents a rich source for drug development. We also analyze the predicted drug-like properties of the molecules, discuss the structural changes with biological implications and show the great opportunities this class represents, as well as the perspectives they provide on drug discovery for CML treatment.

Keywords: chronic myeloid leukemia; cytotoxicity; medicinal chemistry; pentacyclic triterpenes; phytochemistry.

D. R. Barreto Vianna, J. Gotardi, S. C. Baggio Gnoatto, D. A. Pilger, *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1835. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100038>

O texto completo do capítulo 2, compreendido entre as páginas 79 – 109 da versão completa dessa dissertação, foi suprimido por tratar-se dos resultados experimentais obtidos durante a realização desse projeto, que serão publicados em periódico relevante da área. A parte experimental desse projeto consistiu em diferentes etapas subsequentes, do planejamento à análise *in vitro*, sendo que os resultados obtidos em cada uma foram determinantes para tomada de decisão quanto às etapas seguintes. Partiu-se do planejamento inicial de moléculas derivadas de AB e AU. Após, através de estudo *in silico* do potencial inibitório de BCR-ABL1, além de diferentes parâmetros de interesse, alguns compostos foram selecionados para semissíntese e posterior avaliação *in vitro* frente a células de LMC.

5. DISCUSSÃO GERAL

O desenvolvimento da terapia alvo-específica para combate da LMC, pela inibição seletiva de BCR-ABL1 pelos ITC, revolucionou não apenas o tratamento dessa neoplasia, mas também o prognóstico dos pacientes (ROSSARI; MINUTOLO; ORCIUOLO, 2018). Estudos recentes sugerem que a expectativa de vida desses pacientes em uso dos ITC pode ser próxima àquela da população geral. Entretanto, devido à toxicidade, aos eventos adversos e, também, ao alto custo da terapia de longo prazo com ITC, tem sido explorada a possibilidade de descontinuação do tratamento em pacientes que atingem níveis de *BCR-ABL1* < 0,01%. Dessa forma, atualmente, um dos principais objetivos da terapia farmacológica no manejo da LMC é alcançar a TFR (MINCIACCHI; KUMAR; KRAUSE, 2021).

Todavia, a chave para tornar a TFR uma meta atingível aos pacientes com LMC consiste na otimização da terapia com ITC, de forma a garantir uma efetiva primeira-linha de tratamento. No cenário da LMC, ITC mais potentes tendem a resultar em uma maior proporção de pacientes com MMR nos primeiros 5 anos de tratamento em comparação ao imatinibe, primeira-linha de tratamento da doença. Dessa forma, embora não tenha sido estabelecido se essa abordagem inicial está associada a uma maior proporção de pacientes em TFR, recomenda-se que pacientes mais jovens ou com poucas comorbidades sejam inicialmente tratados com ITC de segunda geração para evitar a aceleração da doença até a crise blástica, aumentando as chances de sucesso na descontinuação da terapia. (ROSS; HUGHES, 2020)

Porém, esse caminho para alcançar a TFR pode ser dificultado por diferentes fatores, incluindo a má adesão, os eventos adversos apresentados, e o desenvolvimento de resistência ao tratamento. Esses fatores impedem que o desfecho de TFR seja uma opção para parte dos pacientes ao conduzirem à falha terapêutica, tornando a sobrevida o principal objetivo do tratamento (APPERLEY, 2015; SOVERINI et al., 2018). Nesse contexto, fica evidente porque a busca e o desenvolvimento de novas opções terapêuticas aos pacientes com LMC seguem até hoje sendo relevantes focos de pesquisa nessa área.

Produtos naturais representam uma importante fonte de novos compostos ativos, podendo também servir de base para o desenvolvimento de moléculas semissintéticas. Diversas áreas terapêuticas já se beneficiaram de produtos naturais e seus derivados, como doenças infecciosas, inflamatórias, cardiovasculares, oncológicas, entre outras. Até mesmo para a LMC há estudos de medicamentos com base em produtos naturais. Por exemplo, o mepesuccinato de omacetaxina é um alcaloide com propriedades mielossupressoras aprovado em alguns países para tratamento de pacientes com LMC que apresentam a mutação T315I (MISHRA; TIWARI, 2011).

Através da elaboração do artigo de revisão intitulado “*Natural and Semisynthetic Pentacyclic Triterpenes for Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Reality, Challenges and Perspectives*”, publicado em março de 2021 no periódico ChemMedChem, nós demonstramos o atual cenário de posicionamento dos triterpenos pentacíclicos e seus derivados no desenvolvimento de opções terapêuticas para LMC (BARRETO VIANNA et al., 2021). Para essa revisão, foram selecionados 27 estudos que envolveram o tratamento de células Ph+, tanto provenientes de linhagens celulares estabelecidas quanto de culturas primárias de amostras clínicas, com quaisquer triterpenos pentacíclicos naturais ou semissintéticos. Interessantemente, apenas cerca de um terço desses estudos avaliou compostos semissintéticos e, ainda, praticamente todos esses estudos foram realizados nos últimos três anos, o que indica o recente crescimento da área. Além disso, todos os artigos selecionados para revisão possuem data de publicação posterior à aprovação do imatinibe para tratamento da LMC, corroborando com o cenário de constante busca por novas opções terapêuticas para a doença.

Em relação aos triterpenos pentacíclicos naturais, foram discutidos artigos acerca de diferentes compostos, com destaque aos mais recorrentes, AB e AU, e aos com maior citotoxicidade frente às células de LMC, triterpenos quinonametídeos. De fato, os primeiros, ácidos ursólico e betulínico, são amplamente investigados quanto ao seu potencial citotóxico contra diversos tipos de câncer, incluindo a LMC (FAKHRI et al., 2020). Além disso, Gill *et al.* (2016) comentam em seu artigo de revisão sobre o amplo

papel dos triterpenos no tratamento do câncer, com atuação em diferentes alvos responsáveis pela progressão e pelo desenvolvimento do câncer (GILL; KUMAR; NAVGEET, 2016). Realmente, em nossa revisão da literatura para elaboração do artigo pudemos constatar a atuação da classe de triterpenos pentacíclicos nas mais variadas vias de sinalização celular, juntamente à importante conclusão de que triterpenos pentacíclicos, tanto naturais quanto semissintéticos, são importantes agentes apoptóticos em células Ph+. Esse relevante papel pró-apoptótico em células tumorais já havia sido discutida por Laszczyk (2009).

No que diz respeito aos quinonametídeos, destacamos o triterpeno tingenona pela ótima atividade, com IC₅₀ de 0,5 µM e índice de seletividade de 77 para células de LMC em relação às PBMC; esse efeito, no entanto, somente foi relatado para células sensíveis aos ITC, de forma que a atividade do composto em células resistentes ainda deve ser estudada. Já os compostos celastrol e pristimerim, ativos frente às células de LMC tanto sensíveis quanto resistentes aos ITC, apresentaram impressionantes valores de IC₅₀, na faixa de 0,2 a 0,5 µM, embora também tenham apresentado pronunciada citotoxicidade quando avaliados em PBMC. Corroborando esse achado para LMC, valores de IC₅₀ igualmente potentes são descritos na literatura para pristimerim contra diversos tipos de câncer, conforme revisado recentemente por Li *et al.* (2019). A atividade antitumoral de celastrol também já é conhecida na literatura. Inclusive, uma revisão publicada recentemente indica importantes fatores limitantes para sua aplicabilidade terapêutica no tratamento do câncer, incluindo sua estreita janela terapêutica, além de características comuns aos triterpenos pentacíclicos, como baixa biodisponibilidade, propondo estratégias que possibilitem investir nesse composto para o tratamento antitumoral (SHI *et al.*, 2020).

Além disso, sabendo dessas características comuns que limitam o uso de triterpenos na prática clínica, analisamos as propriedades *drug-likeness* dos compostos incluídos em nossa revisão. Com esse estudo, pudemos observar a predominância de altas massas moleculares, algumas inclusive ultrapassando 900 g/mol para certos

derivados, além de elevada lipofilia. Embora desfavoráveis, essas características são esperadas, uma vez que o esqueleto triterpênico por si só é lipofílico e possui massa próxima aos 500 g/mol, considerados limitantes por Lipinski *et al.* para que um fármaco apresente boa biodisponibilidade oral (LIPINSKI *et al.*, 2001); além disso, a inserção de fragmentos nesse esqueleto apenas contribui para aumento da massa. Apesar desse cenário, existem estratégias para combater essas desvantagens, como o desenvolvimento de formulações nanotecnológicas ou, até mesmo, de pró-fármacos, como comentamos em nossa revisão (BARRETO VIANNA *et al.*, 2021).

No contexto da LMC, demonstramos, como já mencionado, a promiscuidade de alvos combatidos pelos triterpenos e seus derivados, os quais estão indicados em figura ilustrativa que acompanha o fechamento do artigo (Figura 6, artigo do capítulo 1). Porém, curiosamente, poucos dos estudos incluídos em nossa revisão abordaram a via de sinalização de BCR-ABL1, sendo que apenas dois trabalhos, do mesmo autor, visaram o desenvolvimento de novos inibidores de BCR-ABL1 por semissíntese a partir de triterpenos (CIFTCI *et al.*, 2018, 2019). Além desses estudos, Ciftci (2020) investigou ainda mais recentemente o potencial inibitório de BCR-ABL1 do triterpeno natural ácido glicirretínico. Considerando o determinante papel que BCR-ABL1 desempenha na leucemogênese da LMC, seria de se esperar que essa via de sinalização fosse mais explorada para desenvolvimento semissintético de novos inibidores. Entretanto, apesar dos esforços dedicados pelo grupo de Ciftci aos compostos estudados e produzidos nesses estudos, o desenvolvimento de compostos com atividade anti-BCR-ABL1 realmente promissora ainda não foi efetivamente alcançado.

Tendo em vista esse cenário, com essa importante oportunidade a ser explorada, o presente projeto de mestrado teve como objetivo planejar e produzir potenciais novos inibidores de BCR-ABL1. Para isso, através de *design* de fármacos baseado em fragmentos químicos, planejamos novas moléculas derivadas AB e AU, com diferentes modificações nas posições C-3 e C-28 dos esqueletos triterpênicos. [*Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados*

em periódico da área.] Sabe-se que estudos *in silico* são estratégias facilitadoras no desenvolvimento de novos fármacos, possibilitando a triagem de numerosas moléculas para obtenção dos compostos com maior probabilidade de sucesso nas etapas de avaliação biológica, *in vitro* e *in vivo* (GAGO, 2012). [Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados em periódico da área.]

Estudos cristalográficos indicam que o sítio catalítico de BCR-ABL1, onde ocorre a transferência do grupamento fosfato do ATP e, também, onde os inibidores atuam, é formado por dois lóbulos, direcionados às extremidades *N*- e *C*-terminais. Esses dois lóbulos são ligados entre si por meio de uma região de ligação do ATP, denominada “dobradiça” (do inglês, *hinge*), altamente flexível. Além dessa porção, a alça de ligação de fosfato (*P-loop*) interage com o ATP levando à quebra da ligação anidrido-fosfórica. Localizado dentro do bolsão de ligação de ATP, o resíduo *gatekeeper* Thr315 (treonina na posição 315) determina o volume desse sítio, conectando os lóbulos *C*- e *N*-terminal na conformação ativa da proteína (PAULI; BARREIRO; BARBOSA, 2018; ROSSARI; MINUTOLO; ORCIUOLO, 2018).

Além disso, lóbulo *C*-terminal possui uma alça móvel, chamada de alça de ativação, que é responsável pela ativação e inativação de BCR-ABL1. Essa alça apresenta porções chave, incluindo um resíduo de tirosina na posição 393 (Tyr393) e o motivo DFG, composto pelos aminoácidos aspartato, fenilalanina e glicina (Asp-Phe-Gly). A conformação ativa, chamada *DFG-in*, ocorre quando DFG está dentro do sítio catalítico devido à saída da alça de ativação, enquanto a conformação inativa, chamada *DFG-out*, ocorre quando DFG encontra-se fora do sítio catalítico, impedido de exercer sua função de coordenação do cofator da proteína, Mg^{2+} . Essa conformação *DFG-out* cria um espaço entre a alça de ativação deslocada, o resíduo *gatekeeper* e o lóbulo *C*-terminal que é o alvo principal do desenvolvimento dos ITC. O *gatekeeper* Thr315 é essencial para o estabelecimento da conformação ativa *DFG-in*, porém, sabe-se que, mesmo diante da hiperatividade da cinase, ocorre transitoriedade entre os estados *DFG-in* e *-out*,

possibilitando que os inibidores atuem. Entretanto, mutações na posição 315, como a substituição por isoleucina (Ile315, mutação T315I), levam à ativação constante da proteína, induzindo resistência a vários inibidores DFG-*out* ao impedir a mudança conformacional para a forma inativa (AZAM et al., 2008; PAULI; BARREIRO; BARBOSA, 2018; ROSSARI; MINUTOLO; ORCIUOLO, 2018).

Além disso, sabe-se que ligações de hidrogênio são importantes para estabilizar a interação dos ligantes com o sítio alvo de BCR-ABL1 e, também, que a presença da isoleucina na posição 315 dificulta que os inibidores consigam estabelecer esse tipo de interação. O imatinibe, por exemplo, é estabilizado no sítio alvo pela ligação de hidrogênio estabelecida com Thr315; mutações nessa posição impedem estericamente a sua atuação. Por outro lado, a presença do conector etinil na estrutura do ponatinibe permite a acomodação da isoleucina sem que haja impedimento estérico, garantindo sua atividade (ROSSARI; MINUTOLO; ORCIUOLO, 2018).

Através de nossos ensaios de *docking* molecular e a consequente análise das interações apresentadas pela série de moléculas selecionada para semissíntese, JD-28I e JD-3J-28I, comparativamente às interações estabelecidas pelos ITC imatinibe, fármaco de primeira escolha para o tratamento da LMC, e ponatinibe, único aprovado ativo contra a mutação T315I, constataram-se alguns pontos importantes.

[Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados em periódico da área.]

A diferença entre os correspondentes derivados do AB e do AU consiste apenas nas particularidades dos seus esqueletos triterpênicos, principalmente no que diz respeito aos seus anéis E (INTRODUÇÃO GERAL, Figura 6). Esses achados evidenciam como pequenas modificações nas estruturas químicas podem causar grandes impactos, corroborando a importância que cada fragmento apresenta na composição de uma molécula.

[Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados em periódico da área.]

[Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados em periódico da área.]

Assim, após as etapas de triagem *in silico* e com base nesses resultados *in vitro*, decidiu-se por iniciar a etapa de semissíntese pelos derivados JDB-28I, do AB, e JDU-28I, do AU. O derivado correspondente ao AU ainda está em processo de purificação e elucidação estrutural, enquanto o derivado do AB teve sua caracterização confirmada por RMN e espectrometria de massas. Esse composto está sendo submetido a ensaios *in*

vitro para tratamento de células K562, modelo celular de LMC Ph+, e do controle não tumoral, PBMC.

Resultados preliminares obtidos até o momento indicam o notável IC50 para a linhagem tumoral. Esses resultados *in vitro*, juntamente aos obtidos *in silico*, indicam que foi produzido um composto altamente ativo contra células de LMC, com bom perfil de toxicidade predito e sugestiva seletividade ao alvo proposto *in silico*, BCR-ABL1. [*Trecho suprimido por conter informações relacionadas aos resultados do estudo, os quais serão publicados em periódico da área.*]

No entanto, a citotoxicidade observada frente a PBMC conferiu ao composto um baixo índice de seletividade às células leucêmicas e precisa ser melhor investigada, uma vez que pode indicar atuação em outra via de sinalização que não a pretendida, considerando que PBMC não são Ph+ e, conseqüentemente, não expressam BCR-ABL1. Dessa forma, esse estudo possui importantes perspectivas, as quais são apresentadas no respectivo item, mais adiante nessa dissertação, e incluem, por exemplo, essa elucidação de mecanismo, assim como a conclusão da purificação do promissor derivado JDU-28I e a avaliação da sua atividade *in vitro*, além da síntese dos compostos modificados com 28I contendo também a modificação 3J em C-3, JD-3J-28I.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesse estudo, tanto pela revisão da literatura realizada quanto pela parte experimental proposta, permitem concluir que:

- a) Triterpenos pentacíclicos, sejam naturais ou semissintéticos, são importantes candidatos a fármacos antileucêmicos, com relevante atividade apoptótica em células de LMC Ph+, tanto sensíveis quanto resistentes aos ITC;
- b) Derivados semissintéticos dos triterpenos pentacíclicos possuem enorme potencial exploratório para desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da LMC, podendo ser sintetizados de forma direcionada às vias de sinalização relevantes à doença;
- c) Foram propostos derivados de AB e AU inéditos com importante potencial inibitório de BCR-ABL1 demonstrado por ensaios *in silico* de *docking* molecular frente à modelos do alvo em sua forma selvagem e naquela com a mutação clinicamente relevante T315I;
- d) Os derivados do AU JDU-28I e JDU-3J-28I mostram-se ainda mais promissores para a finalidade estudada que os correspondentes derivados do AB, uma vez que apresentam interação *in silico* com a variante T315I de BCR-ABL1, de maneira semelhante ao ponatinibe;
- e) Os compostos JDB-28I e JDU-28I foram produzidos com sucesso a partir do AB e do AU;
- f) O composto JDB-28I, já purificado, apresenta IC50 potente frente a células K562 em etapa de avaliação de atividade *in vitro*, com índice de seletividade para células leucêmicas calculado.

7. PERSPECTIVAS

Devido às longas restrições de acesso às dependências da Faculdade de Farmácia durante o isolamento social decorrente da pandemia de COVID-19, diversos experimentos foram prejudicados e não puderam ser executados dentro do prazo programado. Logo, permanecem como perspectivas essenciais desse projeto:

- a) Semissíntese dos derivados JD-3J e, principalmente, JD-3J-28I, para finalização da série proposta inicialmente para produção;
- b) Semissíntese de outros derivados que possam ser de interesse dentre os promissores nas etapas *in silico*;
- c) Purificação do composto JDU-28I e subsequente finalização de sua elucidação estrutural;
- d) Fechamento das replicatas necessárias para confirmação dos valores de IC50 de GLB1A e GLB5A em K562 e em PBMC;
- e) Fechamento das replicatas necessárias para confirmação dos valores de IC50 de JDB-28I em K562 e em PBMC;
- f) Avaliação *in vitro* da atividade do composto JDU-28I nas células K562 sensíveis aos ITC e em PBMC;
- g) Avaliação *in vitro* da atividade de ambos os compostos JD-28I em células K562 com fenótipo de resistência aos ITC, para comprovação dessa pretendida atividade;
- h) Realização de ensaio de anexina IV e iodeto, para determinação de mecanismo final de morte celular (apoptose ou necrose), frente a todos os modelos celulares propostos;
- i) Realização de ensaio de ciclo celular para análise de efeito apoptótico e/ou antiproliferativo;
- j) Investigação das vias de sinalização celular envolvidas na atividade;
- k) Confirmação da inibição de BCR-ABL1 como alvo terapêutico dos compostos produzidos, através de ensaio de atividade enzimática e *Western blot*.

8. REFERÊNCIAS

ABBOUD, C. et al. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. **Blood**, v. 121, n. 22, p. 4439–4442, 30 maio 2013.

APPERLEY, J. F. **Chronic myeloid leukaemia**. The Lancet. **Anais...Lancet Publishing Group**, abr. 2015Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613621200>>. Acesso em: 11 maio. 2020

ARBER, D. A. et al. Review Series THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016.

AZAM, M. et al. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. **Nature Structural & Molecular Biology 2008 15:10**, v. 15, n. 10, p. 1109–1118, 14 set. 2008.

BACCARANI, M. et al. **A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CMLAnnals of Hematology**Springer Verlag, , 1 abr. 2015.

BAGLIN, I. et al. A Review of Natural and Modified Betulinic, Ursolic and Echinocystic Acid Derivatives as Potential Antitumor and Anti-HIV Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 525–539, 25 mar. 2005.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2 jul. 2018.

BARRETO VIANNA, D. R. et al. **Natural and Semisynthetic Pentacyclic Triterpenes for Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Reality, Challenges and PerspectivesChemMedChem**John Wiley and Sons Ltd, , 2021. Disponível em: <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.202100038>>. Acesso em: 30 maio. 2021

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

CAPDEVILLE, R. et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 7, p. 493–502, 2002.

CHAN, W. W. et al. Conformational Control Inhibition of the BCR-ABL1 Tyrosine Kinase, Including the Gatekeeper T315I Mutant, by the Switch-Control Inhibitor DCC-2036. **Cancer Cell**, v. 19, n. 4, p. 556–568, 12 abr. 2011.

CHEN, H. et al. **Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents** *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson SAS, , 6 mar. 2015.

CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. **Triterpenes as potentially cytotoxic compounds** *Molecules* MDPI AG, , 2015.

ÇİFTÇİ, H. Effects of glycyrrhetic acid on human chronic myelogenous leukemia cells. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 49–55, 2020.

CİFTÇİ, H. I. et al. The First Pentacyclic Triterpenoid Gypsogenin Derivative Exhibiting Anti-ABL1 Kinase and Anti-chronic Myelogenous Leukemia Activities. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 4, p. 570–574, 1 abr. 2018.

CİFTÇİ, H. I. et al. Design, synthesis and biological evaluation of pentacyclic triterpene derivatives: Optimization of anti-Abl kinase activity. **Molecules**, v. 24, n. 19, 30 set. 2019.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012–3043, 8 jul. 2009.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules OPEN. **Nature Publishing Group**, 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357, 1 jul. 2019.

DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. **The molecular biology of chronic myeloid leukemia***Blood*, 15 nov. 2000.

ERLANSON, D. A.; MCDOWELL, R. S.; O'BRIEN, T. Fragment-Based Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 3463–3482, 1 jul. 2004.

F, G. Molecular simulations of drug-receptor complexes in anticancer research. **Future medicinal chemistry**, v. 4, n. 15, p. 1961–1970, out. 2012.

FAKHRI, S. et al. **Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review***Seminars in Cancer Biology* Academic Press, , fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X20300407>>. Acesso em: 15 maio. 2020

FERNANDES, J. et al. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: Cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 165–169, 20 fev. 2003.

FLIS, S.; CHOJNACKI, T. <p>Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities</p>. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 13, p. 825–843, 8 mar. 2019.

FOLLEY, J. H.; BORGES, W.; YAMAWAKI, T. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. **The American Journal of Medicine**, v. 13, n. 3, p. 311–321, set. 1952.

FORCE, T.; KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. **Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition***Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , maio 2007.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. **The Ulster medical journal**, v. 76, n. 1, p. 8–17, jan. 2007.

GEARY, C. G. The story of chronic myeloid leukaemia. Historical review. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 1, p. 2–11, 1 jul. 2000.

GILL, B. S.; KUMAR, S.; NAVGEET. **Triterpenes in cancer: significance and their influence** *Molecular Biology Reports* Springer Netherlands, , 1 set. 2016.

GOVERNO FEDERAL. **Portal da transparência - Detalhamento do documento de Empenho.** Disponível em: <https://portaltransparencia.gov.br/despesas/empenho/254446252012015NE800538?orDenarPor=fase&direcao=asc>. Acesso em: 23 nov. 2021.

GROFFEN, J. et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. **Cell**, v. 36, n. 1, p. 93–99, 1 jan. 1984.

GROFFEN, J.; HEISTERKAMP, N. The BCR/ABL hybrid gene. **Bailliere's Clinical Haematology**, v. 1, n. 4, p. 983–999, dez. 1987.

HANTSCHHEL, O.; SUPERTI-FURGA, G. **Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , jan. 2004.

HARTWELL, J. L. **Plants used against cancer: a survey.** [s.l.] Quarterman Publications, 1982.

HOCHHAUS, A. et al. **European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia** *Leukemia* Springer Nature, , 1 abr. 2020.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer.**

INNOCENTE, A. et al. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12003–12014, 12 out. 2012.

J, S. et al. Celastrol: A Review of Useful Strategies Overcoming its Limitation in Anticancer Application. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, 18 nov. 2020.

JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. Chronic Myeloid Leukemia: 2020 Update on Diagnosis, Therapy and Monitoring. **American Journal of Hematology**, n. March, p. 1–19, 2020.

JENCKS, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 7, p. 4046–4050, 1 jul. 1981.

KLEIN, A. DE et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 300, n. 5894, p. 765–767, dez. 1982.

KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Triterpenes. In: **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2010. v. 1p. 673–708.

LASZCZYK, M. N. **Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy** *Planta Medica*, 2009.

LI, J. et al. Anti-Cancer Effects of Pristimerin and the Mechanisms: A Critical Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 0, p. 746, 12 jul. 2019.

LIN, Z.; JIANG, J.; LIU, X. S. Ursolic acid-mediated apoptosis of K562 cells involves Stat5/Akt pathway inhibition through the induction of Gfi-1. **Scientific Reports**, v. 6, 16 set. 2016.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.

LIU, X. S.; JIANG, J. Induction of apoptosis and regulation of the MAPK pathway by ursolic acid in human leukemia K562 cells. **Planta Medica**, v. 73, n. 11, p. 1192–1194, set. 2007.

MINCIACCHI, V. R.; KUMAR, R.; KRAUSE, D. S. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. **Cells**, v. 10, n. 1, 10 jan. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA CONJUNTA Nº 04, DE 01 DE MARÇO DE 2021. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Leucemia Mieloide Crônica do Adulto.** Disponível em:

<http://conitec.gov.br/images/Protocolos/20210318_PORTAL_Portaria_Conjunta-PCDT_LMC_Adulto.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2021.

MISHRA, B.; TIWARI, V. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 16 ago. 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014** *Journal of Natural Products* American Chemical Society, , 25 mar. 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 25, n. 1, p. 85–109, 1960.

O'BRIEN, S.; JABBOUR, E. The Chronic Leukemias. In: **Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fifth Edition**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 1246–1257.

OLOYEDE, H. O. B. et al. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 338–344, 1 out. 2017.

PAULI, F. P.; BARREIRO, E. J.; BARBOSA, M. L. C. Características Estruturais das Proteínas Cinases e Seus Inibidores em Uso Clínico. **Virtual Quim**, v. 10, n. 5, p.

1280–1303, 2018.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. **Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia** *Blood*, , 19 fev. 2009.

RAGHUVAR GOPAL, D. V. et al. Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. **Toxicology Letters**, v. 155, n. 3, p. 343–351, 15 mar. 2005.

REN, R. **Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 18 mar. 2005.

ROSS, D. M.; HUGHES, T. P. Treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukaemia. **Nature Reviews Clinical Oncology**, p. 1–11, 6 maio 2020.

ROSSARI, F.; MINUTOLO, F.; ORCIUOLO, E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: From chemical development to clinical efficacy. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290–293, jun. 1973.

SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K. V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 713–718, 11 jan. 2006.

SHAN, J. Z. et al. Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 17, n. 8, p. 607–611, 2011.

SILVA, G. N. et al. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 20, n. 1, p. 29–39, 1 jan. 2015.

SOVERINI, S. et al. **Chronic myeloid leukemia: The paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy** *Molecular Cancer* BioMed Central Ltd., , 19 fev. 2018.

SULTANA, N.; SAEED SAIFY, Z. Naturally Occurring and Synthetic Agents as Potential Anti-Inflammatory and Immunomodulants. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 3–19, 19 out. 2012.

VALDÉS, K. et al. **Potential use of nanocarriers with pentacyclic triterpenes in cancer treatments** *Nanomedicine* Future Medicine Ltd., , 1 dez. 2016.

WAECHTER, F. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Betulinic Acid Derivatives as New Antitumor Agents for Leukemia. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 13, 16 jan. 2018.

WILLIG, J. et al. Imatinib mesylate affects extracellular ATP catabolism and expression of NTPDases in a chronic myeloid leukemia cell line. **Purinergic signalling**, v. 16, n. 1, p. 29–40, 1 mar. 2020.

WU, Q. et al. Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban**, v. 30, n. 4, p. 453–457, 2010.

ZHANG, W.; MEN, X.; LEI, P. **Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds** *Journal of Cancer Research and Therapeutics* Medknow Publications, , 1 jan. 2014.

Anexo I

Parecer consubstanciado aprovado – Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antitumoral de derivados semissintéticos dos ácidos betulínico e ursólico em modelo celular de leucemia mieloide crônica

Pesquisador: Diogo André Pilger

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05684819.3.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.159.063

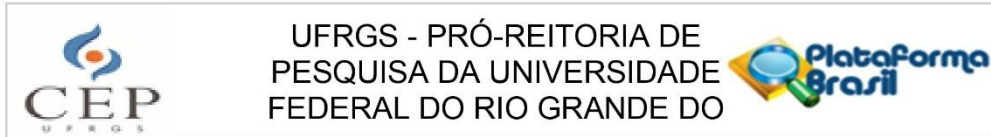
Apresentação do Projeto:

Trata-se da análise de retorno de diligência do projeto "Avaliação da atividade antitumoral de derivados semissintéticos dos ácidos betulínico e ursólico em modelo celular de leucemia mieloide crônica".

Os ácidos betulínico e ursólico são triterpenos amplamente encontrados em plantas, cujas relevantes atividades antitumorais já foram descritas, inclusive em modelo de leucemia mieloide crônica (LMC). Entretanto, sua alta lipofilia e baixa biodisponibilidade oral e sistêmica prejudica seu uso terapêutico. Em células K-562, compostos derivados do ácido betulínico contendo grupamento oxima e amina apresentaram IC50 de 55,2µM e 19,5µM, respectivamente, que em comparação ao IC50 de 85,5µM do ácido betulínico demonstram aumento do efeito citotóxico. Para os derivados do ácido ursólico contendo esses mesmos grupamentos, os resultados obtidos foram também promissores conforme observado com os IC50 de 21,9µM, 14,9µM e 33,4µM para a oxima, a amina e o ácido ursólico, respectivamente (Figueiredo et al, dados ainda não publicados). Ainda, derivados do ácido betulínico, com outras modificações moleculares também demonstraram importante efeito antitumoral frente a células K-562 em estudo de Waechter et al.. No presente estudo, as novas modificações a serem propostas serão baseadas em estudos de docking molecular com a proteína-alvo BCR/ABL, direcionando a atividade antineoplásica dos compostos derivados dos ácidos betulínico e ursólico para a leucemia mieloide crônica.

A pesquisa terá financiamento próprio e o cronograma é de 24 meses, com início em 2019 e

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.159.063

término em 2020.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Avaliar a atividade antitumoral de novos derivados semissintéticos dos ácidos betulínico e ursólico, em linhagem celular derivada de LMC (Ph+) como perspectiva para tratamento da doença.

Objetivos específicos:

- a) Identificar por análises de docking molecular os resíduos de aminoácidos mais importantes na interação com fármacos ITK e os ácidos betulínico e ursólico, para planejamento dos novos compostos;
- b) Realizar estudos de docking molecular para determinar quais dos compostos propostos possuem maior afinidade de ligação pela proteína alvo BCR/ABL.;
- c) Planejar as rotas de semissíntese dos compostos escolhidos na etapa in silico;
- d) Sintetizar os derivados dos ácidos betulínico e ursólico escolhidos;
- e) Avaliar a toxicidade dos compostos produzidos em células mononucleares de sangue periférico de voluntários saudáveis, através de ensaio de viabilidade celular;
- f) Avaliar o efeito do tratamento com os compostos produzidos sobre a viabilidade de células K-562;
- g) Investigar mecanismos de morte celular em células K-562 após o tratamento com os compostos produzidos;
- h) Estudar a influência do tratamento com os compostos produzidos no ciclo celular e na autofagia de células K-562;
- i) Realizar os ensaios biológicos planejados anteriormente em células K-562 resistentes ao imatinibe.

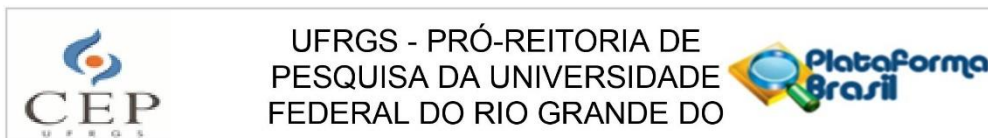
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os textos dos riscos e dos benefícios da pesquisa não foram alterados. Como mostrado no parecer anterior, os textos estão adequados quanto aos aspectos éticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em atendimento à solicitação "Informar como serão obtidos os ácidos betulínico e ursólico", os pesquisadores informaram no projeto de pesquisa e carta resposta ao CEP: "Os ácidos betulínicos

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.159.063

e ursólicos já se encontram extraídos pelo grupo de pesquisa da Professora Simone Gnoatto e não fazem parte da metodologia do presente projeto. Porém, a título informativo, o ácido ursólico é normalmente obtido de cascas de maçã, *Mallus domestica* e o ácido betulínico a partir de cascas de *Platanus acerifolia*”.

Em atendimento à solicitação “Esclarecer se a amostra de células obtidas de doadores saudáveis será também usada para extração de RNA total. Em caso afirmativo, essa informação deve constar no TCLE e deve ser oferecido ao doador opção de aceitar ou não o uso de seu material doado para essa finalidade”, os pesquisadores informaram no TCLE: “Sua participação será exclusivamente para obtermos células saudáveis para utilizarmos como controle não tumoral e extração do seu material genético para estudo de proteínas relacionadas à leucemia”. Os pesquisadores ainda informaram no TCLE: “Você também tem total liberdade em não aceitar que sejam isoladas as células e extraído o material genético, podendo solicitar isso a qualquer momento, antes ou mesmo durante o estudo”.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexado termo de concordância do Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS) devidamente assinado.

Em carta resposta ao CEP, os pesquisadores informaram que os termos de concordância dos Laboratórios de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) e de Cultivo Celular (LCC) não foram acrescentados por ser o pesquisador responsável pelo projeto coordenador dos dois laboratórios. Os pesquisadores ainda informaram na carta resposta que asseguram a realização do projeto nas suas dependências.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos.

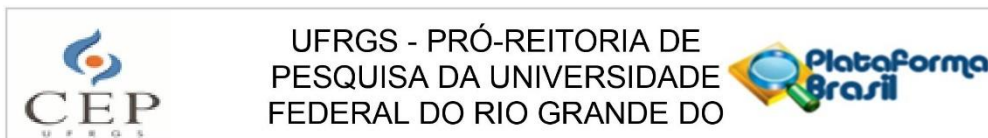
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam as solicitações. Assim, recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa quanto aos aspectos éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.159.063

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1284079.pdf	12/02/2019 16:41:54		Aceito
Outros	Termo_LaFis.pdf	12/02/2019 16:41:24	Diogo André Pilger	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	12/02/2019 16:40:56	Diogo André Pilger	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_010219.pdf	12/02/2019 16:40:34	Diogo André Pilger	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_010219.pdf	12/02/2019 16:40:19	Diogo André Pilger	Aceito
Outros	Cartaz.pdf	11/01/2019 09:49:56	Diogo André Pilger	Aceito
Outros	TermodeConcordancia.pdf	11/01/2019 09:49:34	Diogo André Pilger	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/01/2019 09:49:15	Diogo André Pilger	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_090119.pdf	11/01/2019 09:48:59	Diogo André Pilger	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	11/01/2019 09:48:42	Diogo André Pilger	Aceito

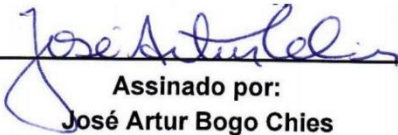
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Fevereiro de 2019


Assinado por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br