

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

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO EM
MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS
PRECURSORAS B**

LETÍCIA TERRES RODRIGUES

Porto Alegre, 2023

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

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO EM
MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS
PRECURSORAS B**

Dissertação apresentada por Leticia Terres
Rodrigues para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Prof. Dr. Diogo André Pilger
Co-Orientador(a): Prof. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11 de setembro de 2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Liane Nanci Rotta
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Tiana Tasca
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Leticia Terres
ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÁCIDOS URSÓLICO E
BETULÍNICO EM MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B /
Leticia Terres Rodrigues. -- 2023.
92 f.
Orientador: Diogo André Pilger.

Coorientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Leucemia linfoblástica aguda. 2. Triterpenos Pentacíclicos. 3. Ácido Ursólico. 4. Ácido Betulinico.
I. Pilger, Diogo André, orient. II. Gnoatto, Simone Cristina Baggio, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) em colaboração com o Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS) e utilizando a estrutura multiusuária do Laboratório de Cultivo Celular (LCC), todos localizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Diogo, que nesse tempo foi orientador, amigo e conselheiro. Aproveito para agradecer não só pela paciência e dedicação nesses dois anos de mestrado, mas também pela oportunidade e por confiar no meu potencial de realizar um bom trabalho mesmo sem a dedicação exclusiva à pesquisa. És pra mim um exemplo de profissional e de professor;

À professora Simone, pela co-orientação nesse projeto e pelo incansável apoio na realização desse trabalho;

À professora Mariana e ao professor Bruno, pela disponibilização das linhagens e pela valiosa colaboração;

À professora Andreia, que me acolheu como bolsista lá em 2016 e permitiu com que eu pudesse trilhar o caminho que culmina nesse trabalho hoje e também ao programa PREMIUM da PROPESQ, do qual fui bolsista durante três anos na graduação, que me permitiu não só a sustentabilidade financeira para concluí-la, como também através do qual fui apresentada à citometria de fluxo, ferramenta muito associada à minha imagem pelos colegas que me conhecem da FACFAR/UFRGS e que foi essencial na realização desse trabalho;

Às minhas colegas do LABC, com quem pude aprender, rir e reclamar nesses anos. À Camila, à Débora e à Júlia, pelo tempo que dedicaram para me iniciarem no mundo da cultura de células; à Jéssica, pelo empenho e auxílio na extração e isolamento dos compostos e por sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas; à Bruna, pelo auxílio no cuidado com as linhagens, e à Julya, por seu coração enorme e por sempre oferecer ajuda e palavras de conforto;

Às colegas e aos colegas do HEMORGS, com quem eu dividi meus anseios, a tensão do dia a dia e o medo de “não dar conta”; de todas e todos sempre recebi palavras de carinho e com vocês quero compartilhar as alegrias da conclusão desse trabalho;

À minha mãe, minha maior fonte de incentivo e de quem eu preciso registrar meu orgulho. Obrigada por ser compreensiva com a minha ausência e pela dedicação com a minha educação. Tua coragem é o que me traz força;

À minha avó e toda minha família, pelo amor e carinho incondicionais;

Ao meu companheiro da vida, de quem tive todo o apoio e amor necessários para a conclusão de mais essa etapa. Agradeço por compartilhar sonhos comigo e por sempre acreditar que eu posso ser melhor. Sou o que sou, porque nós somos;

Este modesto trabalho foi construído a muitas mãos e a todas elas, eu agradeço. Vocês foram essenciais na minha trajetória até aqui.

RESUMO

As fusões gênicas recorrentes, incluindo ETV6::RUNX1 e rearranjos KMT2A (KMT2A-r) são uma característica marcante da leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (LLA-B). ETV6::RUNX1, comum em crianças, está associada a um bom prognóstico, enquanto KMT2A-r, encontrado em ~10% dos adultos e ~5% das crianças, indica um pior prognóstico. O tratamento continua a ser um desafio em grupos específicos, muitas vezes com efeitos adversos significativos. O ácido ursólico (AU) e o ácido betulínico (AB), triterpenos pentacíclicos, demonstram uma atividade antitumoral promissora em tumores sólidos, porém os estudos em tumores hematológicas permanecem pouco explorados. Este estudo avaliou esta atividade em linhagens celulares de LLA-B. Os resultados demonstraram que AU e AB diminuíram a viabilidade da linhagem celular REH (positiva para ETV6::RUNX1) com IC50 de $21,1 \pm 3,4 \mu\text{M}$ (UA) e $18,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (BA) e na linhagem celular RS4;11 (positiva para KMT2A-r), com IC50 de $39,3 \pm 2,0 \mu\text{M}$ (UA) e $25,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (BA), com indução de apoptose em ambos os modelos. As moléculas foram mais seletivas em REH (índice de seletividade de 3,7 para UA e 5,5 para BA, enquanto para RS4;11, o IS foi de 2,0 para UA e 4,0 para BA). BA induziu alterações no ciclo celular e dano ao DNA em REH, enquanto o impacto de UA em RS4;11 se limitou à diminuição da expressão de IKZF1 e BTG1. A autofagia foi detectada apenas em REH, que apresentava maior expressão de VAMP8 (envolvido na autofagia) e onde também foi detectado dano ao DNA. Este trabalho revela uma atividade antitumoral não reportada de UA e BA em modelos de B-ALL.

Palavras chaves: Leucemia linfoblástica aguda, triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico, ácido betulínico.

ABSTRACT

A hallmark of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is recurrent gene fusions, including ETV6::RUNX1 and KMT2A rearrangements (KMT2A-r). ETV6::RUNX1, common in children, is associated with a good prognosis, whereas KMT2A-r, found in ~10% of adults and ~5% of children, indicates an adverse prognosis. Treatment remains a challenge in specific groups, often with significant adverse effects. Ursolic acid (UA) and betulinic acid (BA), pentacyclic triterpenes, show promising antitumor activity in solid tumors, yet studies in hematological malignancies remain limited. This study assessed the activity in B-ALL cell lines. Results demonstrated that UA and BA decreased the viability of REH cell line (ETV6::RUNX1 positive) with IC₅₀ of 21.1 ± 3.4 μM (UA) and 18.1 ± 1.4 μM (BA) and in RS4;11 cell line (KMT2A-r positive), with IC₅₀ of 39.3 ± 2.0 μM (UA) and 25.3 ± 1.1 μM (BA), with apoptosis induction in both models. The molecules were more selective in REH (selectivity index of 3.7 for UA and 5.5 for BA, whereas for RS4;11, SI was 2.0 for UA and 4.0 for BA). BA induced cell cycle changes and DNA damage in REH, while UA's impact on RS4;11 was limited to decreased IKZF1 and BTG1 expression. Autophagy was detected only in REH, which had higher expression of VAMP8 (involved in autophagy) and where DNA damage has also been detected. This work reveals an unreported antitumor activity of UA and BA in B-ALL models.

Keyword: Acute lymphoblastic leucemia; betulinic acid; pentacyclic triterpenes; ursolic acid;

LISTA DE ABREVIATURAS

μM - Micromolar

AB – Ácido Betulínico

ABL1 - *Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1*

AFF1 - ALF Transcription Elongation Factor 1

AGL - Glycogen Debranching Enzyme (Amylo-alpha-1, 6-Glucosidase, 4-Alpha-Glucanotransferase)

AU – Ácido Ursólico

BCAT1 - *Branched Chain Amino Acid Transaminase 1*

BCR - *Breakpoint Cluster Region*

BECN1 - *Beclin 1*

BFM - *Berlin-Frankfurt-Münster*

BTG1 - *B-cell Translocation Gene*

CAR-T - *Chimeric Antigen Receptor T-cell*

CASP3 - *Caspase 3*

CASP8 - *Caspase 8*

CASP9 - *Caspase 9*

CC50 – Concentração Citotóxica 50% (célula não tumoral)

CDKN1A - *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

CLGN - *Calmegin*

CYTIP - *Cytohesin 1 Interacting Protein*

DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DEPDC1 - *DEP Domain-Containing 1*

ETV6 - *ETS Variant 6*

FDA - *Food and Drug Administration*

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

FLT3 - *FMS-like Tyrosine Kinase 3*

GBTLI- Grupo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide Aguda

GTSF1 - *Gametocyte Specific Factor 1*

IC50 - Concentração Inibitória 50% (célula tumoral)

IKZF1 - *Ikaros Family Zinc Finger 1*

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IRX1 - *Iroquois Homeobox Protein 1*
KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
KMT2A - *Lysine Methyltransferase 2A*
LACTB2 - *Lactamase Beta 2*
LLA - *Leucemia Linfoblástica/Linfocítica Aguda*
LLA-B - *Leucemia Linfoblástica/Linfocítica Aguda de Linhagem B*
LLC - *Leucemia Linfoblástica/Linfocítica Crônica*
LMA - *Leucemia Mieloide Aguda*
LMC - *Leucemia Mieloide Crônica*
MAP1LC3 - *Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3*
mRNA - *RNA mensageiro*
NCI – *National Cancer Institute*
NUDT19 - *Nudix Hydrolase 19*
OAT - *Ornithine Aminotransferase*
OMS - *Organização Mundial da Saúde*
OS - *Overall Survival*
p62 (SQSTM1) - *Sequestosome 1*
PCDH8 - *Protocadherin 8*
PCLO - *Piccolo Presynaptic Cytomatrix Protein*
PE - *Phycoerythrin*
PI - *Propidium Iodide*
PIR - *Pirin*
PLEKHA5 - *Pleckstrin Homology Domain-Containing A5*
PMRT1 - *Protein Arginine Methyltransferase 1*
PRL - *Prolactin*
PTPRK - *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor K*
PTPRR - *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type R*
ROS – *Reactive oxygen species*
RUNX1 - *Runt-related Transcription Factor 1*
S100A11 - *S100 Calcium-Binding Protein A11*
SNARE - *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*
SNX10 - *Sorting Nexin 10*
SUS - *Sistema Único de Saúde*

TMSB15A - *Thymosin Beta 15A*

TWIST1 - *Twist Family BHLH Transcription Factor 1*

VAMP8 - *Vesicle-Associated Membrane Protein 8*

VPREB1 - *Pre-B Lymphocyte Gene 1*

YES1 - *YES Proto-Oncogene 1, Src Family Tyrosine Kinase*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. OBJETIVOS.....	35
3. CAPÍTULO I: MANUSCRITO – ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO EM MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B.....	37
4. DISCUSSÃO GERAL.....	69
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	81
6. PERSPECTIVAS.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. ANEXOS.....	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEUCEMIAS

As leucemias correspondem a um grupo heterogêneo de tumores hematológicos originados a partir de alterações moleculares nas células precursoras hematopoiéticas na medula óssea, que passam a proliferar desreguladamente podendo, eventualmente, invadir o sangue periférico e outros tecidos. As leucemias podem ser classificadas em agudas ou crônicas, a depender do nível de diferenciação do progenitor afetado e do número de células imaturas (blastos) presentes na medula óssea ou circulação sanguínea, sendo que o achado de valores maiores ou iguais a 20% de blastos na medula caracteriza o diagnóstico de leucemia aguda (Ladikou et al., 2022). Outra classificação leva em conta a origem do progenitor afetado, sendo as leucemias mieloides oriundas de progenitores da linhagem mieloide e as leucemias linfocíticas, também conhecidas como linfoblásticas ou linfoides, originadas quando o progenitor tumoral já está comprometido com a diferenciação desta linhagem (Zago, 2013).

A etiologia da leucemia é multifatorial, com destaque para as alterações moleculares (como mutações germinativas e adquiridas e anormalidades cromossômicas clonais) associadas à doença. Entre os achados mais frequentes, alterações nas vias de reparo do DNA e alterações cromossômicas parecem levar ao quadro leucêmico. Outro achado consistente é a presença de eventos secundários que se somam às alterações primárias para que ocorra a ativação de vias leucemogênicas, sendo os rearranjos cromossômicos um claro exemplo dessa relação. Além disso, as condições ambientais também são listadas como importantes fatores de risco, incluindo exposição a produtos químicos e radiação, infecções e estilo de vida (Tebbi, 2021).

Os dados epidemiológicos estimados para as leucemias no Brasil mostram que aproximadamente 11.540 novos casos são esperados no triênio 2023-2025, o que as tornam o décimo câncer mais comum no Brasil. Ainda, em 2020, as leucemias foram responsáveis por 6.738 mortes no país, o que corresponde a cerca de 3 mortes a cada 100 mil pessoas (INCA, 2023).

As leucemias linfoblásticas agudas (LLA) são neoplasias originadas no progenitor linfóide e são o tipo de tumor mais comum na infância. Os pacientes acometidos normalmente apresentam febre, infecções recorrentes, fadiga,

sangramentos e *rash* cutâneo. Além desses sintomas, a apresentação clínica pode ser inespecífica. (Chang et al., 2021) (Davis et al., 2014) Dentre as LLA, a leucemia linfoblástica aguda do tipo B (LLA-B) é o subtipo mais comum, correspondendo a cerca de 75% dos casos. A LLA-B possui caráter bimodal, acometendo, principalmente, crianças de 1 a 4 anos (Malard e Mohty, 2020) e pessoas com mais de 50 anos, (Paul, Kantarjian e Jabbour, 2016) sendo que 60% dos casos de LLA-B recebem o diagnóstico até os 20 anos de idade.

Segundo dados do Observatório de Oncologia (2023), não há indícios de tendência de aumento ou diminuição dos casos de LLA ao longo dos anos no país, já que os números têm se mantido relativamente estáveis, assim como a taxa de mortalidade da doença. A mortalidade acompanha a taxa de incidência, levando a óbito principalmente pacientes diagnosticados na faixa de idade de 0 a 19 anos e acima de 50 anos (Figura 1). (Observatório de Oncologia, 2023)

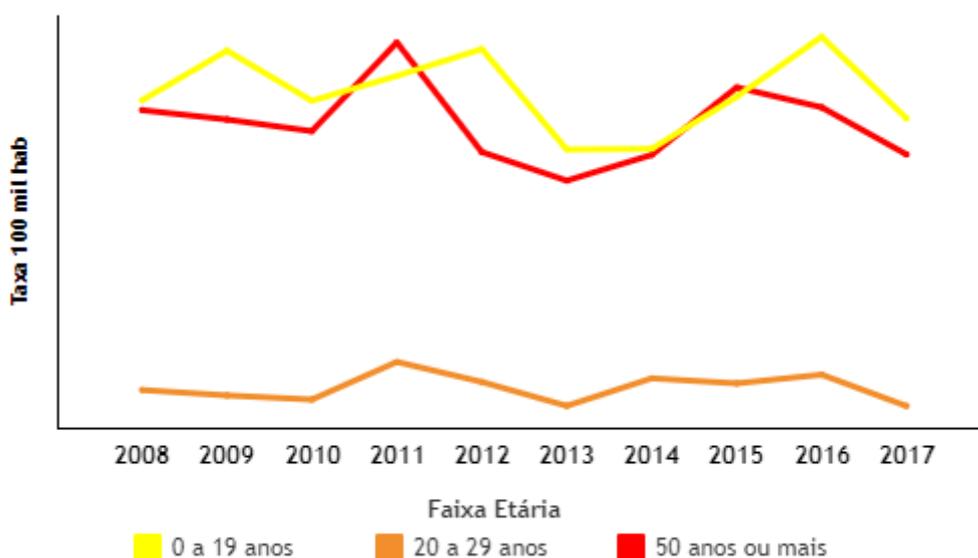


Figura 1: Taxa de Mortalidade por LLA no Brasil (de 2008 a 2017). Fonte: Observatório de Oncologia (2023), elaborado com dados disponíveis no DATASUS.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS DO TIPO B E MODELOS CELULARES UTILIZADOS

De acordo com o último consenso disponibilizado pela OMS (2022), a classificação das leucemias e linfomas cujo predomínio é de células leucêmicas de origem linfóide do tipo B (LLA-B) é feita principalmente considerando as características moleculares dos clones, que levam a características fenotípicas, clínicas ou prognósticas específicas. Dentro da classificação, que inclui subgrupos de linfomas, neoplasias plasmocitárias e outras, há as neoplasias de precursores de células B, cujos subtipos estão descritos na Tabela 1.

Classificação das Neoplasias Hematopoiéticas de precursores de células B
OMS, 5ª edição
LLA-B não especificada em outras
LLA-B com alta hiperploidia
LLA-B com hipodiploidia
LLA-B com iAMP21
LLA-B com fusão BCR::ABL1
LLA-B com características BCR::ABL1-like
LLA-B com rearranjo KMT2A
LLA-B com fusão ETV6::RUNX1
LLA-B com características ETV6::RUNX1-like
LLA-B com fusão TCF3::PBX1
LLA-B com fusão IGH::IL3
LLA-B com fusão TCF3::HLF
LLA-B com outras anormalidades genéticas definidas
*LLA-B: Leucemia/Linfoma linfoblástico(o) do tipo B.

Tabela 1. Classificação de leucemias linfoblásticas/linfomas de precursores de células B, de acordo com os critérios da OMS (2022). (Fonte: adaptada de Alaggio *et al.*, 2022)

Para a avaliação da atividade dos compostos naturais a serem apresentados neste trabalho, serão utilizados dois modelos celulares distintos, representantes dos seguintes subtipos de neoplasias de precursores de células B, conforme classificação da OMS: LLA-B com fusão ETV6::RUNX1 (linhagem celular REH) e LLA-B com rearranjo KTM2A (linhagem celular RS4;11) (Figura 2). Ambos os modelos foram gentilmente fornecidos pela Prof. Dr. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá, coordenadora do Laboratório de Genética das Leucemias Agudas do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

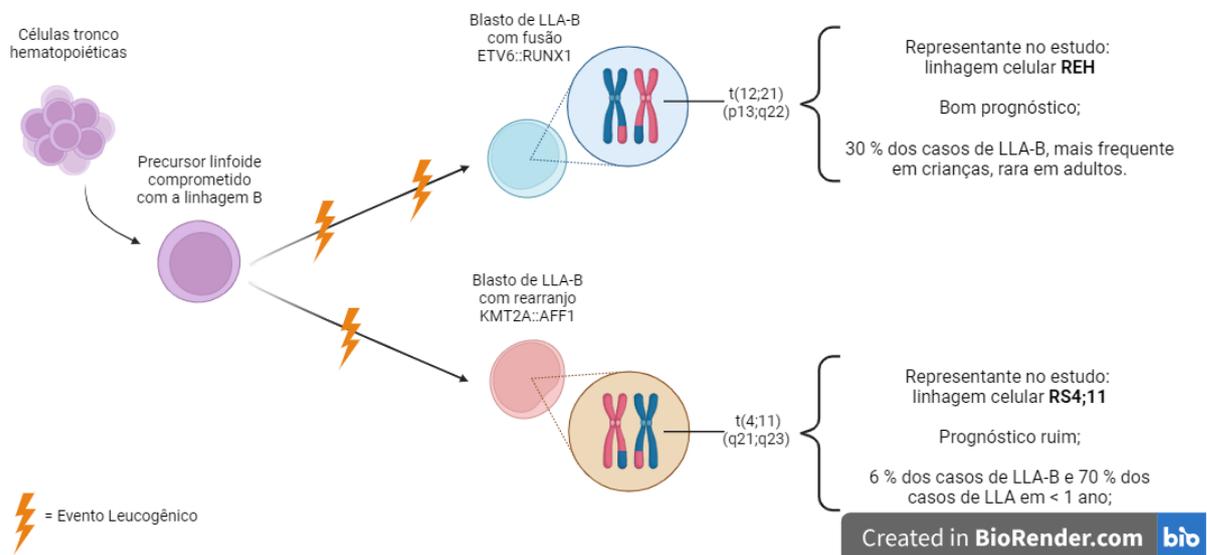


Figura 2. Representação gráfica dos modelos celulares avaliados neste trabalho e representativos das entidades específicas classificadas pela OMS, 2022. Os raios representam alterações que levam à leucogênese. Para o modelo com rearranjo KMT2A, há evidência de que a alteração cromossômica por si só é suficiente para o desenvolvimento da leucemia, enquanto para o modelo ETV6::RUNX1, a translocação não é suficiente, sendo necessário um segundo evento leucogênico. Fonte: Elaboração pela autora com a ferramenta BioRender.com.

O primeiro modelo celular utilizado refere-se à LLA-B com fusão ETV6::RUNX1. Esta linhagem possui a translocação cromossômica t(12;21)(p13;q22) (antigamente classificada como TEL-AML1) que causa a fusão dos genes ETV6 com RUNX1, formando um fator de transcrição quimérico. Tanto o gene ETV6/TEL (*translocation–Ets–leucemia*), localizado no cromossomo 12p13.2, quanto

RUNX1 (*RUNX Family Transcription Factor 1*) são importantes no decorrer da hematopoese e a expressão do fator quimérico promove a autorrenovação dos progenitores de célula B. (Mullighan, 2012)

A simples presença da translocação não é suficiente para a leucogênese, o que sugere a necessidade de alterações genéticas secundárias para o aparecimento da leucemia (Mullighan, 2012). A alteração cromossômica original parece ter origem *in utero*, e as lesões secundárias podem incluir perda adicional de ETV6, ganho de RUNX1, deleção de CDKN1A ou de outros genes envolvidos na diferenciação da célula B. A compreensão da fisiopatologia indica que a busca por novas terapias não deve se limitar a ter como alvo a translocação ETV6::RUNX1, mas deve considerar também os eventos secundários (Kaczmarska et al., 2023; Polak et al., 2019).

A fusão ETV6::RUNX1 é a translocação mais comum em crianças, correspondendo a cerca de 30% dos casos de LLA-B nessa faixa etária, porém é rara em adultos (1,0 - 4,4% dos casos apenas) (Kaczmarska et al., 2023) e está associada a um bom prognóstico e menor risco de recidivas após tratamento (Bhojwani *et al.*, 2012) (Paul et al., 2016). Os pacientes com a fusão têm em torno de 80% a 97% de chance de alcançar 5 anos de sobrevida livre de eventos, porém cerca de 10% dos pacientes ainda apresentam resistência à quimioterapia ou recidiva (Kaczmarska et al., 2023). Em estudos *in vitro*, os modelos celulares ETV6::RUNX1 mostraram maior sensibilidade a antineoplásicos como L-asparaginase, doxorrubicina, etoposídeo e dexametasona em comparação com outros subtipos leucêmicos (Bhojwani *et al.*, 2012).

O segundo modelo celular de LLA-B utilizado neste trabalho caracteriza-se pela presença do rearranjo KMT2A. O gene que codifica a proteína KMT2A (*histone lysine [K]-MethylTransferase 2*) está localizado no cromossomo 11q23 e a proteína codificada tem função essencial na regulação do desenvolvimento da hematopoiese, funcionando como um regulador da cromatina, proteína de ligação ao DNA e metiltransferase. A translocação de origem não está restrita à LLA, estando presente também em LMA e leucemias bifenotípicas (Górecki *et al.*, 2023). Previamente classificado como rearranjo MLL (*mixed-lineage leukemia*), as células tumorais que possuem a alteração trazem consigo características mistas da linhagem mieloide e linfoide.

O rearranjo gênico pode envolver diversos pares, entre eles o gene AFF1/AF4 (*ALF Transcription Elongation Factor 1*), presente em cerca de 44% das KMT2A LLA-B infantis e em 75% dos adultos, sendo também o gene presente na linhagem celular utilizada neste trabalho. Além dele, os genes MLLT3 e MLLT1 são os mais frequentes. (Chaer, El, Keng e Ballen, 2020) A alteração cromossômica por si só é suficiente para a leucogênese, porém, com certa frequência é acompanhada de mutações em vias como PI3K/RAS, KRAS, NRAS e TP53 (Górecki *et al.*, 2023). O rearranjo é encontrado em 10% dos casos de LLA em adultos e 5% em crianças, e acomete cerca de 70% dos novos diagnosticados com LLA menores de 1 ano de idade (Górecki *et al.*, 2023), além de corresponder por 6% dos casos de LLA-B.

A presença do rearranjo KMT2A é considerada como de pior prognóstico e está relacionada à hiperleucocitose, maior resistência ao tratamento com glicocorticoides e asparaginase (El Chaer *et al.*, 2020) e maior agressividade, resultando em aumento da incidência de acometimento do Sistema Nervoso Central (El Chaer *et al.*, 2020; Górecki *et al.*, 2023). Em estudo de *coorte* com 926 pacientes de LLA-B (BCR::ABL1 negativos), a presença da translocação KMT2A::AFF1 foi associada à menor sobrevida global em relação aos pacientes KMT2A::AFF1 negativos (20,3% versus 45,5%) e menor sobrevida livre de doença (9,2% versus 34,3%,) (Figura 3) (Piciocchi *et al.*, 2019).

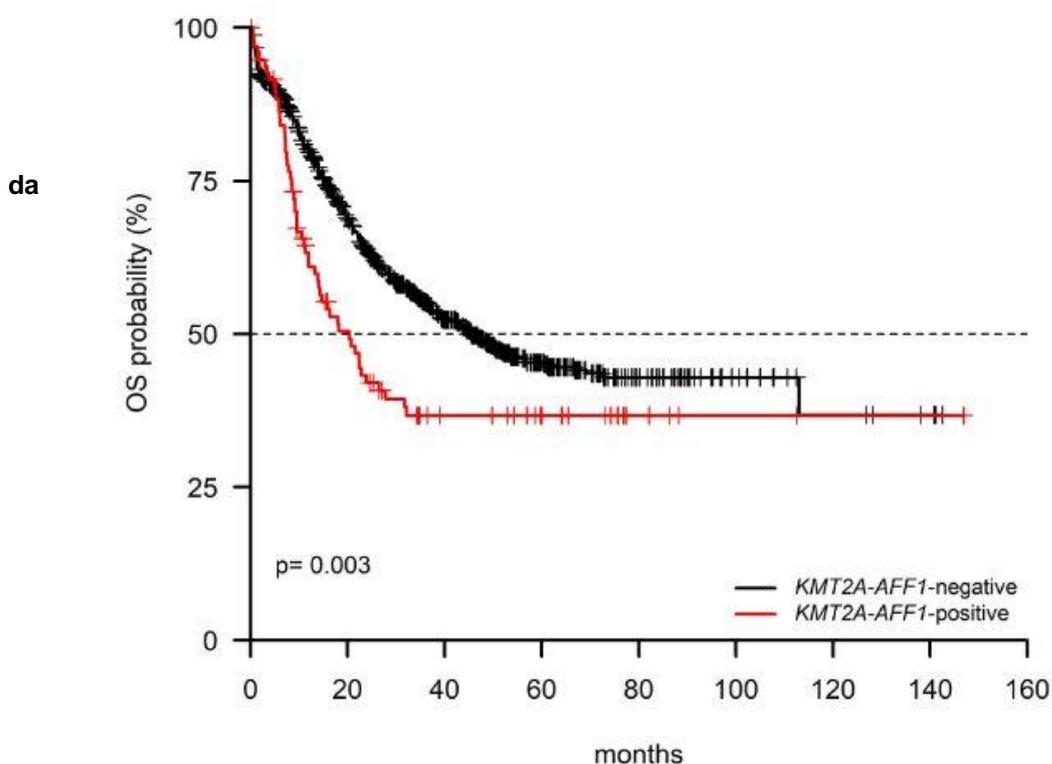


Figura 3.
Análise

sobrevida global (OS – overall survival) de pacientes de LLA-B com rearranjo KMT2A::AFF1 versus pacientes com LLA-B sem a translocação. Fonte: (Piciocchi et al., 2019)

Ainda, pacientes com rearranjo KMT2A apresentam perda do antígeno de célula B CD19 e escape imune à terapia com CAR-T, além de apresentarem a possibilidade de escape clonal, devido às suas características bifenotípicas (Górecki et al., 2023). O desenvolvimento de novos possíveis alvos terapêuticos para LLA-B com rearranjos de KMT2A incluem inibidores de FLT3, MEK, HDAC, BCL-2, MCL-1, CDK, entre outros (El Chaer et al., 2020).

1.3 OPÇÕES TERAPÊUTICAS EM LLA-B

Para quadros de leucemias em geral, normalmente o tratamento pode ser dividido em quimioterapia, radioterapia e imunoterapia, visto o papel limitado dos processos cirúrgicos nos tumores hematológicos. Especificamente, o tratamento da LLA-B considera não só as alterações moleculares detectadas, como também o risco de recidiva e outros parâmetros como as contagens celulares, diferenciação da população linfóide afetada e a frequência dos blastos.

A quimioterapia envolve o uso de diversos fármacos, a depender da fase do tratamento. As fases se dividem em indução, que dura de 4 a 6 semanas, consolidação, com duração de 4 a 6 meses, e manutenção, que pode perdurar por 2 anos em adultos, ou 2 a 3 anos em crianças. Na fase de indução, o objetivo é a remissão da doença, podendo ser utilizados inúmeros quimioterápicos e outros adjuvantes, como glicocorticoides, além da possível inclusão da profilaxia intratecal, a fim de evitar infiltração no Sistema Nervoso Central (Malard & Mohty, 2020).

Segundo dados do Observatório de Oncologia, de 2012 a 2017, no Brasil havia dois principais protocolos em uso para o tratamento de LLA-B na infância. O principal deles é o GBLTLI-99, desenvolvido pelo Grupo Brasileiro para o Tratamento da LLA na Infância, utilizado por 36,0% dos pacientes, seguido pelo protocolo BFM do Grupo Europeu *Berlim-Frankfurt-Münster*, em uso por 29,8% dos pacientes (Observatório de Oncologia, 2023).

Como exemplo de fármacos que podem ser utilizados no tratamento de LLA incluídos nesses protocolos nas diversas fases do tratamento, há a prednisolona,

vincristina, daunorubicina, L-asparaginase, terapia intratecal com metotrexato, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, citarabina e etoposídeo (Trujillo, Linares e Sarmiento, 2016). Em adultos, são exemplos de protocolos em uso o CALBG 9111 (inspirado no protocolo *St. Jude* infantil), GMALL, PETHEMA ALL-96 e NOPHO (Aldoss, Forman e Pullarkat, 2019).

Para o tratamento, independentemente da idade ao diagnóstico, a escolha do esquema depende das alterações moleculares encontradas nos clones de leucemia. Um exemplo importante é a presença da alteração cromossômica conhecida como cromossomo *Philadelfia* (LLA Ph+ ou LLA-B com fusão BCR::ABL1) que chega a atingir 50% dos adultos com LLA-B, enquanto que, em crianças e adolescentes, a alteração é encontrada em somente cerca de 2% a 3%. Para esse subtipo, o uso de inibidores da tirosinoquinase são o tratamento de escolha, com os quais se alcança cerca de 95% de remissão completa e 40 a 50% de sobrevida global (Short, Kantarjian e Jabbour, 2021).

Na década de 90, o tratamento do câncer ganhou novos atores, a partir dos estudos das terapias alvo-moleculares e das imunoterapias (*American Association for Cancer Research, 2023*). Dentre as novidades trazidas pela imunoterapia para o tratamento da LLA-B, pode-se citar o blinatumomabe, um anticorpo monoclonal biespecífico que contém tanto anti-CD3 quanto anti-CD19 e é indicado para o tratamento de LLA-B refratária ou em recidiva. O anticorpo funciona com uma espécie de “apresentador” da célula B tumoral CD19+ às células T CD3+ citotóxicas, resultando na morte das células tumorais pela liberação de granzima e perforina (Kaplan, Grischenko e Giles, 2015).

Outro exemplo de emprego da imunoterapia para o tratamento da LLA-B é o inotuzumabe ozogamicina (InO), um anticorpo monoclonal anti-CD22 conjugado à caliqueamicina. A conjugação do agente citotóxico com o anticorpo é especialmente importante, pois funciona como uma entrega direcionada do fármaco às células B, já que o CD22 é um antígeno expresso na superfície de todas as células B maduras e em mais de 90% das células B precursoras (Ronson, Tvito e Rowe, 2016). A aprovação do InO pela ANVISA se deu em 2019 e a indicação de seu uso é apenas para os casos de LLA-B recidivada ou refratária.

Dentre as imunoterapias aprovadas para o tratamento de LLA-B, sem dúvida o destaque fica para a terapia celular com células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor – T cell*). Em linhas gerais, a terapia com CAR-T se baseia na modificação genética de células T (autólogas ou não) para que expressem antígenos quiméricos que irão reconhecer células tumorais, com o objetivo de aumentar a resposta do indivíduo ao tumor e a capacidade citotóxica deste tipo celular. A primeira CAR-T aprovada nos EUA foi o tisagenlecleucel (CAR-T humanas anti-CD19) em 2017, e hoje existem outros seis produtos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de diferentes tipos de tumores hematológicos, sendo quatro deles anti-CD19 (Zhang et al., 2022).

Além das terapias direcionadas ao tratamento do tumor, pacientes acometidos por LLA-B podem precisar de terapias de suporte, como é o caso da transfusão de concentrado de hemácias, visto que quase todos os pacientes com câncer desenvolvem algum grau de anemia, seja por conta da doença ou como evento adverso ao tratamento quimioterápico (Spivak, Gascón e Ludwig, 2009). No mesmo sentido, considerando a frequência de casos de trombocitopenia em pacientes com leucemias agudas, a transfusão de plaquetas se mostra efetiva no controle dos sangramentos (Li et al., 2020).

Por fim, o transplante de medula óssea também faz parte das opções terapêuticas em pacientes acometidos por leucemias que apresentam doença residual mensurável (DRM) ou remissão completa após o primeiro de tratamento (DeFilipp et al., 2019; Merli et al., 2019).

1.4 AINDA HÁ ESPAÇO PARA A PESQUISA DE COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL COMO OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DO CÂNCER?

A quimioterapia convencional para LLA é crucial para o sucesso do tratamento e tem sido capaz de proporcionar melhora considerável nos resultados de sobrevida nas últimas décadas. Na maioria das vezes, porém, são moléculas que não têm um alvo específico no tumor, o que faz com que também afetem células saudáveis, levando a efeitos adversos. Dentre eles, destaca-se a possibilidade de

neurotoxicidade trazida por moléculas como a L-asparaginase, metotraxato e vincristina. (Śliwa-Tytka et al., 2022) Já a radioterapia inclui em seus efeitos adversos a longo prazo a possibilidade de disfunções endócrinas e cognitivas, infertilidade, diminuição da função renal, entre outros. (Chang et al., 2021)

Outro ponto a ser considerado é que, apesar da melhora das taxas de resposta aos tratamentos atualmente empregados, com o aumento da sobrevida global em 5 anos passando de 31% em 1975 para próximo de 70% em 2009 (podendo chegar a 90% em crianças), (Malard e Mohty, 2020) o tratamento da LLA-B ainda pode se tornar um desafio para grupos específicos, como os indivíduos com 60 anos ou mais, que apresentam taxas de sobrevida após 5 anos em torno de apenas 20%. Nessa faixa etária, os tratamentos que já apresentam intrinsecamente uma menor resposta, se somam às comorbidades presentes nessa faixa etária, que muitas vezes impedem o uso de quimioterápicos na mesma intensidade dos pacientes mais jovens e levam a uma maior toxicidade dos quimioterápicos e à resistência do clone neoplásico.

Nas últimas duas décadas, junto ao surgimento da imunoterapia, a terapia celular com CAR-T trouxe uma perspectiva de revolução no tratamento do câncer, já que vêm possibilitando aos pacientes uma sobrevida livre de doença incomparável às terapias disponíveis empregadas até seu surgimento. Entretanto, imunoterápicos utilizados no tratamento de LLA-B, como os anticorpos monoclonais, também podem causar efeitos adversos. O blinatumomab está relacionado à neurotoxicidade e risco aumentado de infecções (Stein *et al.*, 2019), enquanto o inotuzumabe ozogamicina foi associado ao risco aumentado de hepatotoxicidade e de desenvolvimento de doença veno-oclusiva hepática (Malard & Mohty, 2020).

Quanto à terapia celular, seu uso apresenta a maior limitação em seus efeitos adversos, dos quais o mais perigoso é a síndrome de liberação de citocinas. (Zhang et al., 2022) Além disso, até o momento, o uso de CAR-T só foi aprovado pelas agências reguladoras para pacientes resistentes ou refratários aos tratamentos convencionais ou nos casos de recidivas (ANVISA, 2023). Ademais, o sucesso da terapia depende de um sistema imunológico minimamente imunocompetente, o que também faz com que essa terapia não seja uma opção para todos os pacientes (Zhang et al., 2022).

Alinhado aos efeitos adversos graves, o alto custo também é um importante limitador ao uso do CAR-T. Em 2023, uma única dose de tisagenlecleucel nos Estados Unidos custa cerca de 475 mil de dólares (Drugs, 2023). Em nível comparativo, levando em conta o valor médio do dólar, a dose custaria cerca de 2,4 milhões de reais, o que supera o valor total de recursos federais distribuídos para o Componente Básico da Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde (SUS) em 2022 para os municípios de Porto Alegre (R\$ 723.338,36), Curitiba (R\$ 942.388,69) e Florianópolis (R\$ 244.224,34), as três capitais da região Sul do país (BRASIL, 2022). No Brasil, a dificuldade de acesso ao tratamento ainda enfrenta outras barreiras. O tisagenlecleucel, apesar de utilizado nos EUA desde 2017, foi aprovado pela ANVISA somente em fevereiro de 2022, o que faz com que o acesso ao produto no país ainda seja incipiente e, em vista do custo, quase que inacessível aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (ANVISA, 2023).

Buscando alternativas que alinham as novas tecnologias aos tratamentos convencionais, em janeiro de 2023, o governo norte-americano, através do *National Cancer Institute (NCI)*, aprovou um financiamento com o objetivo de apoiar estudos focados nas intervenções voltadas ao tratamento do câncer em duas frentes: imunoterapia e produtos naturais. O instituto anunciou a disponibilização de 23 milhões de dólares ao longo de 5 anos para a pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais que sejam seguros, não tóxicos e que possam ser utilizados com eficácia na prevenção e no tratamento nas fases iniciais do câncer (National Cancer Institute, 2023).

A iniciativa do NCI leva em conta a importância histórica dos produtos naturais no tratamento do câncer. Exemplo disso são os resultados trazidos por um estudo de revisão realizado em 2020, que indicou que entre os novos medicamentos antineoplásicos aprovados de 1981 a 2019, 18 (7,3%) eram moléculas de origem natural inalteradas. Dentre elas, podemos citar opções terapêuticas amplamente utilizadas no tratamento de leucemias, como a vincristina, a vimblastina, doxorubicina, daunorrubicina, bleomicina, asparaginase, entre outras. Quando consideradas as moléculas derivadas de produtos naturais, este número sobe para 62 (25%) (Newman e Cragg, 2020).

Portanto, dadas as terapias disponíveis até o momento e suas várias limitações, a busca por novos compostos continua sendo uma necessidade para um melhor manejo dos pacientes com câncer. Nesse sentido, os compostos de origem natural permanecem como uma importante alternativa, pois podem ser mais facilmente extraídos, isolados e purificados com menores custos de produção quando comparados às terapias celulares e imunoterapias. Uma vez demonstrada sua efetividade e segurança, surgem como uma fonte de moléculas ativas para o tratamento e prevenção dos tumores hematológicos, seja para sua utilização como monoterapia ou mesmo como adjuvantes a outros tratamentos já empregados.

Ainda, nesse cenário, o Brasil se destaca como um país que detém importantes reservas de recursos naturais. Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento da biotecnologia nessa área são vistos como uma possibilidade que pode tornar o país uma potência na busca de novos medicamentos contra o câncer.

1.5 QUEM SÃO OS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO E QUAL SUA POSSÍVEL CONTRIBUIÇÃO NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER?

Ácido ursólico (AU) e ácido betulínico (AB) são moléculas de origem natural pertencentes à classe dos triterpenos pentacíclicos. Os triterpenos pentacíclicos são moléculas compostas por um esqueleto de trinta carbonos, normalmente metabólitos secundários presentes em cascas, folhas e caules de diferentes espécies vegetais (Hussain et al., 2017). A atividade antitumoral da classe já foi estudada *in vitro* em diversos tipos de câncer, incluindo câncer de mama, pulmão, próstata, pâncreas, cervical, colorretal, melanoma e leucemia mieloide crônica (Dzubak et al., 2006; Gill et al., 2016; Jäger et al., 2016).

Ácido ursólico (Figura 4) é o protótipo da classe e possui diversas atividades biológicas estudadas para fins terapêuticos, sendo a substância da classe mais explorada quanto à atividade antitumoral. Está presente em diferentes quantidades a depender da espécie vegetal, e possui concentração próxima a 2% na casca da maçã (*Malus domestica*) e folhas de orégano (*Origanum vulgare*), entre outras espécies vegetais (Woźniak et al., 2015).

Estudos *in vitro* exploraram a atividade antitumoral do ácido ursólico em modelos celulares de diversos tipos de tumores sólidos e há resultados promissores demonstrando sua efetividade em modelos de câncer de mama, pulmão, cervical, colorretal, entre outros (Woźniak, Skąpska e Marszałek, 2015).

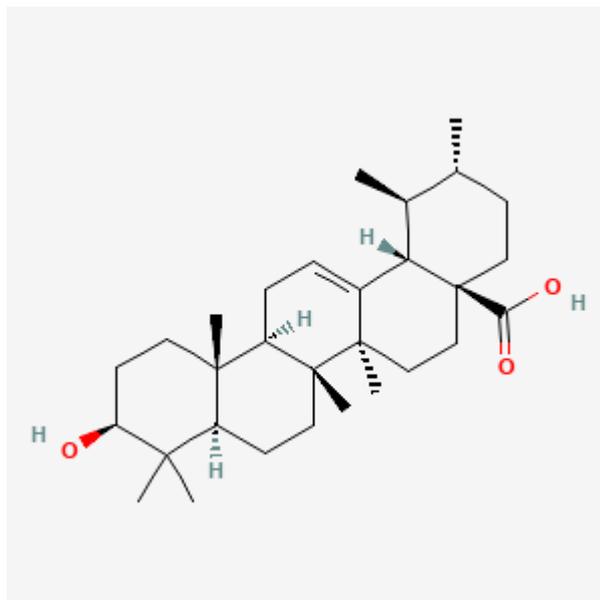


Figura 4. Estrutura química do ácido ursólico. Fonte: *National Center for Biotechnology Information (2023)*.

Alguns mecanismos moleculares já foram explorados e podem ajudar a explicar sua atividade antitumoral, como é o caso da inibição de alvos como PLK1, IKK/NF- κ B e vias como RAF/ERK (Guo et al., 2020). Além destes, as vias metabólicas PTEN, AKT/mTOR/PI3, JAK/STAT e BAK1, CASP3, CASP8 e PTPN1 também foram sugeridas como alvos do AU (Barreto Vianna et al., 2021; Zafar et al., 2022).

Já o ácido betulínico (Figura 5) se difere do ácido ursólico por se classificar como um triterpeno de esqueleto lupano em vez do esqueleto de ursano de seu isômero. AB é um triterpeno observado em mais de duzentas espécies vegetais que também demonstrou atividade *in vivo* e *in vitro* contra diversos tipos tumorais, dentre eles a leucemia mieloide crônica e o glioblastoma (Amiri et al., 2019). Também há relatos de atividade em outros modelos de tumores, como colorretal, mama, pancreático e pulmão (Jiang et al., 2021).

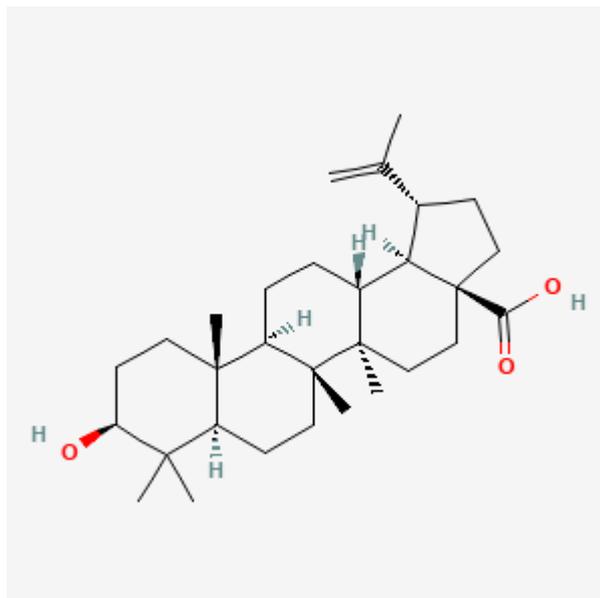


Figura 5. Estrutura química do ácido betulínico. Fonte: *National Center for Biotechnology Information (2023)*.

Quanto aos possíveis alvos moleculares que podem explicar sua atividade antitumoral, há relatos de alteração de diversas vias e alvos como NF- κ B, VEGF e STAT3, tal como aumento da expressão de PTEN, PERK, CASP3, CASP8 e alterações na expressão de proteínas da família Bcl-2 e dos fatores de transcrição SP (Barreto Vianna *et al.*, 2021) (Jiang *et al.*, 2021) (NPACT, 2023).

Além dos estudos *in vitro*, há registros de estudos clínicos tanto para ácido ursólico quanto para betulínico em intervenções relacionadas ao câncer. Para AU, há registro de estudo de fase I, não randomizado e de *coorte* com três braços de intervenção. Neste estudo, foi proposto o uso de ácido ursólico (150 mg), curcumina (600 mg) ou o uso concomitante dos dois em pacientes com diagnóstico de câncer de próstata com planejamento de prostatectomia radical. O estudo visava avaliar parâmetros farmacocinéticos como a biodisponibilidade, tempo de meia-vida e de segurança e o número, frequência e duração de eventos adversos. O estudo foi proposto em 2020, mas foi retirado com a informação de que o pesquisador principal busca financiamento e realizará a revisão do protocolo para ressubmissão futura, de acordo com dados de julho de 2023 (ClinicalTrials.gov, 2023). O segundo estudo clínico registrado de fases I e II se refere à avaliação da segurança e eficácia de uma pomada com ácido betulínico a 20% no tratamento de nevos displásicos, uma desordem proliferativa dos melanócitos associada a maior risco de melanoma. Este

estudo, porém, também se encontra retirado, sem maiores informações sobre os motivos (ClinicalTrials.gov, 2023).

1.6 ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO EM TUMORES HEMATOLÓGICOS

Além das atividades descritas para os tumores sólidos, também há dados quanto à avaliação dos ácidos ursólico e betulínico em tumores hematológicos. AU foi avaliado em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda do tipo T, leucemia mieloide aguda (Li et al., 2013) e leucemia aguda monocítica. Os resultados nesses modelos indicam que houve inibição da proliferação, com indução da apoptose.

Em modelo celular de leucemia mieloide aguda (LMA), AB demonstrou atividade antitumoral mediada por produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), com ativação de mecanismos de apoptose e interrupção do ciclo celular (Park *et al.*, 2021). Há relatos, também, de que o tratamento com AB foi capaz de restaurar a sensibilidade ao inibidor de tirosina quinase imatinibe em modelo de LMA BCR::ABL+ resistente (Barreto Vianna et al., 2021). AB ainda obteve resultados semelhantes em modelo de leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T), com inibição da proliferação, parada no ciclo celular e ativação da apoptose (Chen *et al.*, 2008). Já em outro estudo, com 10 linhagens celulares distintas para modelos de Linfoma de Burkitt derivado de células B, AB levou as células tumorais à morte, através de mecanismos independentes da ativação de caspases, com características típicas de morte por necrose (Karpova *et al.*, 2006).

Embora existam outros estudos que tenham avaliado a atividade antitumoral dos ácidos ursólico e betulínico em modelos celulares de tumores sólidos, observa-se que há menor número de evidências de sua atividade *in vitro* em tumores hematológicos e não há dados sobre seus efeitos em modelos de LLA-B com fusão ETV6::RUNX1 ou rearranjo KTM2A descritos até o momento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando a escassez de registros sobre a avaliação da atividade dos ácidos ursólico e betulínico em neoplasias hematológicas, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de AU e AB *in vitro* em dois modelos celulares de LLA-B, representantes de prognósticos clínicos e resposta aos tratamentos convencionais distintos, com a perspectiva de seu uso terapêutico. Os objetivos específicos se encontram descritos abaixo.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito antitumoral do tratamento com AU e AB nas linhagens celulares RS 4;11 e REH, modelos celulares de LLA-B;
2. Determinar o índice de seletividade dos compostos comparando os modelos tumorais a células mononucleares não tumorais;
3. Investigar os possíveis mecanismos de morte celular envolvidos na resposta aos tratamentos com os compostos;
4. Avaliar se os tratamentos são capazes de causar danos ao DNA celular;
5. Avaliar possíveis alterações no ciclo celular frente à exposição aos compostos;
6. Avaliar se o tratamento com AU ou AB é capaz de alterar a expressão gênica dos fatores prognósticos de LLA-B: FLT3, BTG1 e IKZF1;
7. Avaliar a expressão gênica diferencial entre as linhagens estudadas, a fim de investigar se as alterações a nível de mRNA presentes podem ter influência nas diferentes respostas ao tratamento com AU e AB;

3. CAPÍTULO I: MANUSCRITO – ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÁCIDOS URSÓLICO E BETULÍNICO EM MODELOS CELULARES DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B

O manuscrito contido nas páginas 37 – 67 foi elaborado conforme as normas da revista *European Journal of Pharmacology*, disponíveis no link <https://www.sciencedirect.com/journal/european-journal-of-pharmacology/publish/guide-for-authors>, na categoria de *Research Paper*.

4. DISCUSSÃO GERAL

A leucemia linfoblástica aguda de linhagem B permanece apresentando-se como um desafio em termos de tratamento e frequência de recidivas, principalmente quando acomete pacientes com mais de 60 anos e a depender das alterações moleculares presentes no clone tumoral. Portanto, a busca por terapias alternativas acessíveis e viáveis que se mostrem efetivas no combate às células tumorais e possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes continua sendo uma necessidade. Para tanto, os produtos de origem natural, responsáveis por parte das moléculas em uso hoje, continuam sendo uma importante fonte de pesquisa.

Dentre as moléculas de origem natural com atividade antitumoral estabelecida em modelos *in vitro* estão os triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico e betulínico. Ambas as moléculas apresentam resultados promissores em linhagens tumorais de tumores sólidos, porém há pouca evidência de seu papel em tumores hematológicos e nenhuma evidência para modelos de LLA-B.

Por isso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do ácido ursólico e do ácido betulínico nos modelos celulares com rearranjo KMT2A e fusão ETV6::RUNX1, buscando verificar sua influência em alguns marcadores característicos dos processos neoplásicos.

Sabe-se que a maioria, se não todos os tumores, têm características funcionais típicas (os chamados “*hallmarks*”) que englobam diversos mecanismos fenotípicos e moleculares que culminam no desenvolvimento da doença. (Hanahan, 2022) A partir da representação destas características, pontuaram-se aquelas nas quais os tratamentos apresentados neste trabalho influenciaram diretamente e, em torno delas, foram propostas as discussões apresentadas a seguir. (Figura 6)

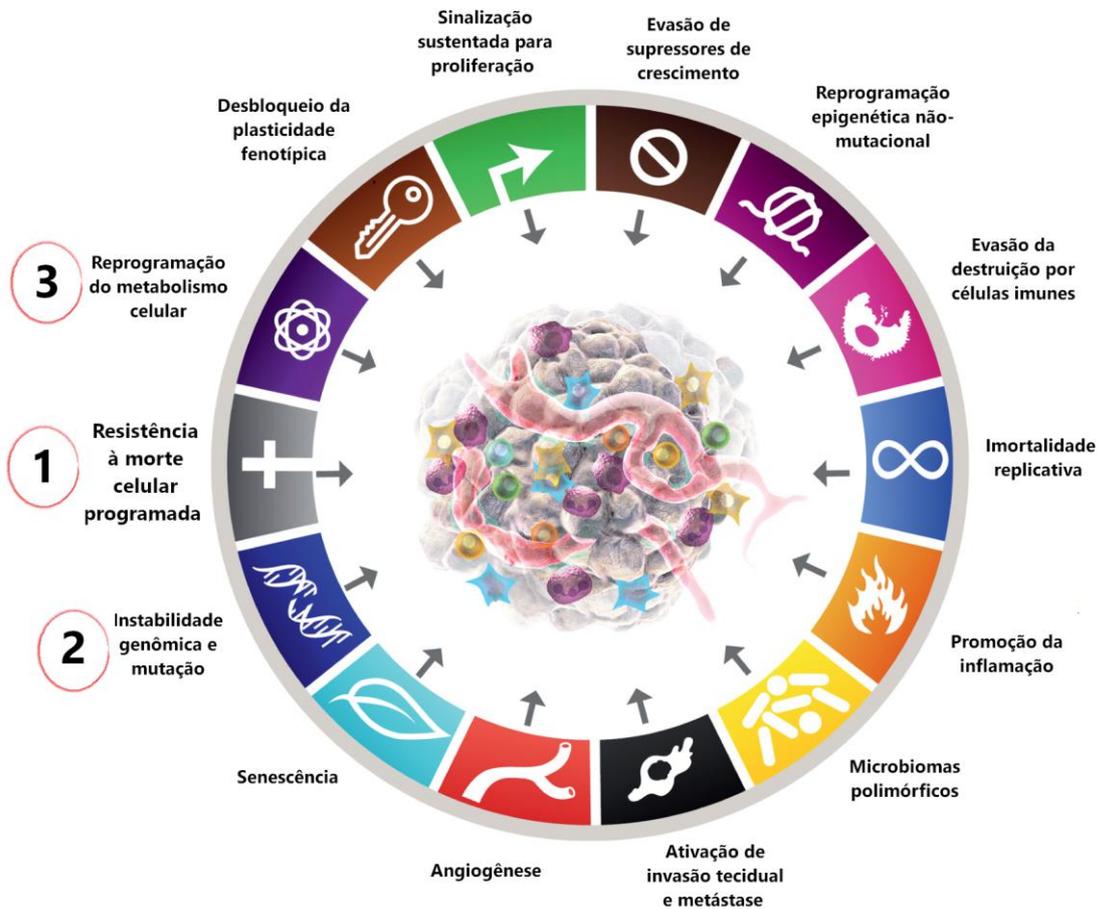


Figura 6 . Representação dos 14 hallmarks do câncer. Os *hallmarks* foram descritos primeiramente em 2000 como sendo alterações e capacidades características da fisiopatologia de células tumorais que são determinantes para o desenvolvimento e crescimento dos tumores. Na imagem, foram circutados aqueles que serão discutidos neste trabalho, sendo considerados os resultados experimentais e as hipóteses formuladas para explicar os resultados obtidos neste trabalho. (Fonte: adaptado de (Hanahan, 2022))

1. Hallmark 1 - Resistência à morte programada:

Dentre os 14 *hallmarks* propostos até agora, um dos clássicos diz respeito à capacidade das células tumorais evitarem a morte celular programada, sendo este um passo determinante para o sucesso do desenvolvimento tumoral. Portanto, entender os mecanismos pelos quais os tumores resistem aos mecanismos de morte programada, como a resistência à apoptose, e explorar moléculas que sejam capazes de restaurar a morte dessas células representam importantes lacunas a serem preenchidas na descoberta de compostos antitumorais.

Com relação a esta característica, verificou-se que os tratamentos com os compostos em ambas as linhagens foram capazes de induzirem as células à morte por apoptose, confirmada pelos marcadores clássicos CASP3, CASP8 e CASP9. Funcionalmente, a CASP3 é classificada como uma caspase efetora, dependente da ativação de caspases iniciadoras, como é o caso da CASP9 (Shi, 2004) e atua tendo um papel central na execução final da apoptose. (GeneCards, 2023) A CASP9 é um importante promotor da formação do apoptosoma e funciona como uma caspase ativadora, clivando e ativando as caspases efetoras (CASP3 e CASP7) e é considerada uma representante da ativação da via intrínseca da apoptose, via ativada por estímulos como dano ao DNA, hipóxia e estresse oxidativo. (GeneCards, 2023) (Kashyap et al., 2021) Já a CASP 8, uma representante da via extrínseca da apoptose, é ativada por ligantes externos e atua clivando as caspases efetoras, como CASP3, CASP6 e CASP7. (Kashyap et al., 2021)

Neste trabalho, em consonância com resultados prévios do uso de AU e AB em outros modelos *in vitro*, foi demonstrado que os tratamentos foram capazes de restaurar a morte celular por apoptose em ambos os modelos celulares trabalhados, e os resultados foram confirmados através das técnicas de identificação da externalização da fosfatidilserina, pela expressão gênica de caspases, pela identificação do aumento da porção Sub-G1 no ensaio do ciclo celular e pelo ensaio cometa.

1.1 Autofagia

Este trabalho também avaliou a ativação da autofagia em resposta aos tratamentos. A autofagia é um processo fisiológico complexo que pode ser ativado em condições celulares de estresse com o objetivo de garantir a manutenção da homeostase e integridade de organelas celulares, proteínas e outros componentes que possam estar disfuncionais, através de sua reciclagem pela degradação lisossomal. (Yun & Lee, 2018)

O processo de autofagia possui relação com mais de um *hallmark* do câncer, mas, neste trabalho, optou-se por discuti-la no tópico relativo à morte celular, visto que a autofagia pode, por si só, ser considerada um tipo de morte celular e, além disso, está intrinsecamente relacionada à morte celular por apoptose, por ambas convergirem nas mesmas vias de sinalização e proteínas efetoras. Adiciona-se a

isso o fato de ambas serem ativadas em condições de estresse celular. (Alvarez-Meythaler et al., 2020) Surge então a ligação entre a autofagia com um dos mais antigos *hallmarks* do câncer: a resistência à morte celular programada. Mas para além deste, a autofagia já foi relacionada a outros *hallmarks*, como o processo de senescência celular, (Filippi-Chiela et al., 2015) integridade genômica (Vessoni et al., 2013) e reprogramação metabólica, pelo óbvio envolvimento na reciclagem de nutrientes. (Goldsmith et al., 2014)

Em linhas gerais, durante a autofagia, há a formação de autofagossomos, que envolvem os componentes celulares para que sejam degradados ou reciclados e estes então se fundem ao lisossomo, resultando na degradação do conteúdo pelas hidrolases lisossômicas (Nishimura & Tooze, 2020; Thorburn et al., 2014; Yun & Lee, 2018). Diversos genes já foram associados à formação do autofagossomo e são chamados de genes relacionados à autofagia (ATG – do inglês *autophagy-related genes*) e outros conhecidamente estão envolvidos nesse processo. Dentre eles, está o gene LC3-II, que é formado pela conjugação do gene MAP1LC3 (*Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3*) com fosfaditiletanolamina, tendo seu aumento de expressão relacionado à autofagia. (Nishimura & Tooze, 2020). Além deste, o papel de BECN1 na autofagia é reconhecido há anos, sendo este um dos primeiros genes conhecidos como mediadores do processo autofágico em linhagens tumorais. (Menon & Dhamija, 2018)

Quando avaliada no contexto tumoral, a autofagia pode ter um papel dúbio, (Figura 7) agindo como um supressor do tumor, ao inibir o crescimento tumoral, evitar o estresse oxidativo e a degradação de organelas. Para a ativação do processo de morte celular, normalmente é necessário um alto estímulo pró-autofágico, resultando na suspensão da maturação do autofagossomo, o que leva ao acúmulo dessa organela. (Jung et al., 2020) Sabe-se que várias classes de medicamentos aprovados para o tratamento do câncer, como os inibidores de mTOR (o maior exemplo é a rapamicina), induzem a autofagia, provando que esse mecanismo pode agir como um aliado no tratamento de tumores. (Yun & Lee, 2018)

Por outro lado, a ativação da autofagia pode atuar como promotora do tumor, auxiliando as células tumorais a superarem condições de estresse como a hipóxia ou privação de nutrientes, além de induzir a proliferação tumoral ao realizar a reciclagem e disponibilização dos componentes celulares necessários à sobrevivência de células tumorais. (Debnath et al., 2023; Polak et al., 2019) Por isso, no início do tratamento quimioterápico, a aplicação de inibidores do processo autofágico pode ser benéfica, ao diminuir a capacidade de resistência de células agressivas. (Alvarez-Meythaler et al., 2020) E, nesse contexto, a inibição do processo autofágico é considerada benéfica para tratamento do tumor.

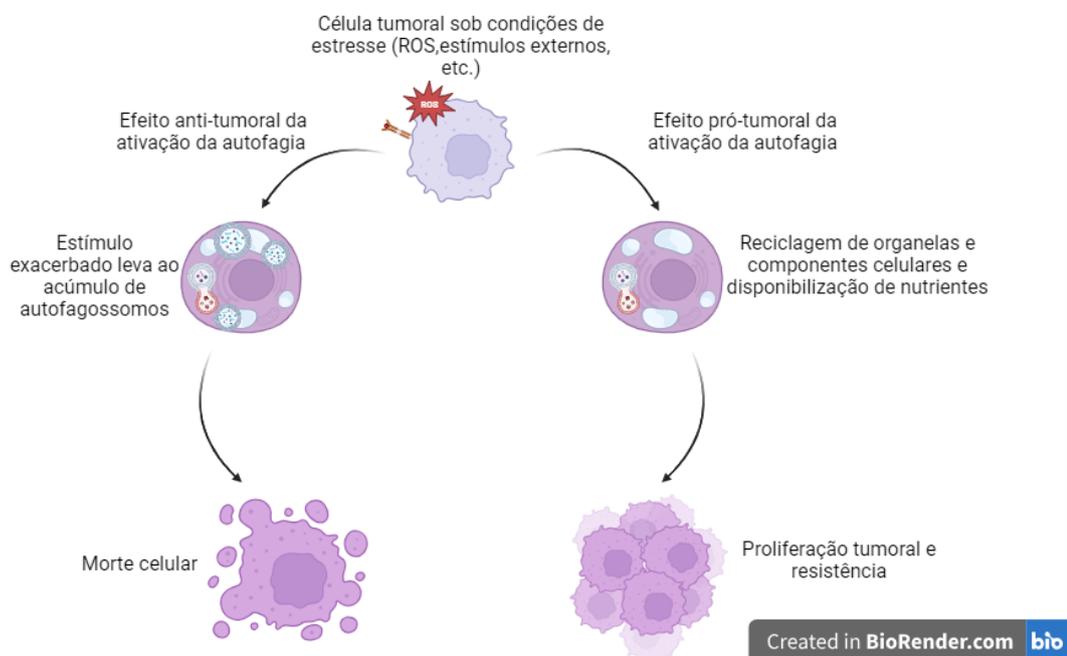


Figura 7. Representação do processo de autofagia no câncer. A depender do contexto e estímulo, a autofagia pode agir como supressora ou promotora do tumor. Fonte: Elaboração pela autora com a ferramenta BioRender.com.

Além do que foi discutido, a autofagia pode influenciar o tumor não só pela atuação diretamente nas células neoplásicas, mas também nas células do microambiente tumoral e células do sistema imunológico, em vista do seu papel na disponibilização dos nutrientes para estas células. Por isso, com o que se sabe até o momento, conclui-se que a influência da autofagia no câncer depende de diferentes aspectos, como o estágio do tumor, o contexto oncogênico e até mesmo o microambiente tumoral. (Debnath et al., 2023; Polak et al., 2019)

Neste trabalho, os tratamentos com AU e AB foram capazes de induzir autofagia somente no modelo celular de LLA-B com fusão ETV6::RUNX1. A linhagem com rearranjo KMT2A, por outro lado, não ativou o mecanismo. A resposta aos tratamentos incluiu a diminuição da viabilidade celular e ativação de mecanismos de apoptose e danos ao DNA.

Nesse contexto, dentre os genes diferencialmente expressos entre as linhagens, destaca-se a maior expressão de VAMP8 (da família de proteínas SNARE) na linhagem REH, em relação à linhagem RS4;11. A proteína codificada por VAMP8 está envolvida na via de ativação da autofagia pelo controle direto da fusão do autofagossomo com a membrana do lisossomo. Além disso, as proteínas da família SNARE têm ganhado interesse pelo seu papel na tumorigênese pelo seu envolvimento na invasão tecidual, resistência à quimioterapia, fosforilação de quinases essenciais para a oncogênese, autofagia, entre outros, e vêm se apresentando como alvos de potencial investigação na terapia antitumoral. (Meng e Wang, 2015).

Os resultados encontrados neste trabalho convergem com relato de maior nível basal de autofagia em LLA-B ETV6::RUNX1, verificado experimentalmente em modelos *in vitro* e em pacientes, que apresentaram menores níveis das proteínas p62 (SQSTM1) e LC3B (ambas degradadas durante o processo autofágico). (Polak et al., 2019) Nesse sentido, a maior expressão do gene na linhagem pode ter relação com a maior ativação da autofagia nesse modelo e, no contexto aqui apresentado, entende-se que a autofagia atuou como supressora tumoral, já que a linhagem REH apresentou diminuição da viabilidade frente aos tratamentos.

2. Harllmark 2 - Instabilidade genômica e mutações

Historicamente, o tratamento do câncer inclui o uso de quimioterápicos e radioterapia, que conhecidamente induzem danos ao DNA. Em contextos não tumorais e fisiológicos, as células possuem mecanismos de reparação do DNA frente às ameaças endógenas ou exógenas. (Reuvers et al., 2020) No tumor, a tentativa de ativação de mecanismos de reparo ao dano também é realizada, porém muitas vezes as células tumorais já se encontram acometidas pela instabilidade genômica e possuem alterações que impedem o correto funcionamento das vias de reparo, levando a danos irreparáveis ao DNA, à apoptose e diminuição da

proliferação celular. Nesse sentido, a busca por terapias que induzam dano ao DNA de células tumorais é encorajada. (Jurkovicova et al., 2022)

Adicionalmente, a correta proliferação celular depende de um conjunto de eventos orquestrados, sequenciais e extremamente regulados. Esses eventos são reunidos nas fases do ciclo celular. Em resumo, o ciclo inicia-se pela saída das células de uma fase G0 (fase de quiescência) e entrada das células na fase G1 do ciclo, essa fase é dependente de fatores de crescimento e prepara a célula para a fase S, na qual há a síntese de DNA e a verificação da integridade do DNA recém-sintetizado. Após o “controle de qualidade” realizado pelos *checkpoints*, a célula passa pela fase G2 (preparação para a mitose), quando finalmente chega à divisão celular. (Ligasová et al., 2023) As células tumorais geralmente apresentam desregulações no ciclo celular e uma capacidade de ultrapassarem os mecanismos inibidores da progressão do ciclo mesmo quando há danos ao DNA. (Matthews et al., 2022)

Este trabalho demonstrou que os tratamentos com AU e AB foram capazes de causar dano ao DNA no modelo celular com fusão ETV6::RUNX1, mas não no modelo com rearranjo KMT2A. Os resultados, porém, carecem de confirmação por técnica adicional, visto que foram encontrados valores percentuais mais altos de conteúdo de DNA na cauda na linhagem KMT2A, porém com ausência de significância estatística, o que pode ter relação com a ferramenta utilizada na análise.

Além disso, a análise do ciclo celular demonstrou que AU e AB aumentaram a proporção de eventos na porção Sub-G1 do ciclo celular na linhagem REH, mas somente AB foi capaz causar alterações no ciclo celular, com a diminuição da proporção de eventos em G1, S e G2. Por outro lado, na linhagem RS4;11, apenas o aumento na porção Sub-G1 foi evidenciado, sem alterações no ciclo celular.

Ainda no contexto de alterações moleculares encontradas no câncer, alguns genes que se apresentam como fatores prognósticos características das leucemias também foram avaliados neste trabalho, são eles o gene FLT3, BTG1 e IKZF1. O gene FLT3 (*fms-related tyrosine kinase 3*), também conhecido como CD135, codifica um receptor transmembrana da família dos receptores de tirosina quinase. Seu papel inclui a diferenciação, proliferação e a sobrevivência do precursor hematopoiético. (GeneCards, 2023) O gene é expresso na maioria das leucemias

agudas, incluindo 94% das LLA-B, 32% das LLA-T e 89% de LMA e seu aumento de expressão tem sido relacionado à patogênese da LLA infantil nas leucemias com rearranjo de KMT2A. (Brown et al., 2005) Entretanto, o mecanismo molecular envolvido no aumento de sua expressão não é completamente esclarecido, porém sua ativação constitutiva, através de mutações ou desregulações epigenéticas, parece contribuir para a leucogênese nos diferentes tipos de leucemias agudas. (Zhao et al., 2022)

Este trabalho evidenciou que a linhagem REH não apresentou expressão do gene FLT3 no controle ou nos tratamentos, resultado conflitante com relato prévio quanto à alta expressão do gene na mesma linhagem celular. (Brown et al., 2005). Por sua vez, a linhagem RS4;11 não apresentou diferença significativa na expressão do gene nos tratamentos, o que mostra que as moléculas testadas não parecem influenciar na atividade de FLT3. (Figura 12)

Já o gene IKZF1 (*IKAROS Family zinc finger 1*) codifica o fator de transcrição IKAROS, com importante papel na regulação da linfopoiese. Está envolvido diretamente no comprometimento do progenitor clonal à linhagem linfoide, visto que ativa fatores de transcrição relacionados aos linfócitos, reprimindo a expressão de fatores mieloides. (Mullighan et al., 2009) As deleções em IKZF1 são eventos comuns em LLA, acometendo até 15% das LLA-B infantis e 40% das LLA-B em adultos, (Stanulla et al., 2020) e têm sido investigadas por seu poder prognóstico nas leucemias infantis, visto estarem associadas à idade mais avançada ao diagnóstico, maiores contagens celulares e maiores chances de DRM. (Stanulla et al., 2020)

Com relação ao papel de IKZF1 na resistência ao tratamento, os mecanismos não se encontram totalmente elucidados, (Stanulla et al., 2020) mas sugere-se que o gene tem relação com a mediação da resistência ao tratamento com corticosteroides. (Marke et al., 2016) Na avaliação do gene IKZF1, a linhagem RS4;11 não apresentou diferença significativa na expressão gênica quando tratada com AU ou AB, enquanto a linhagem REH apresentou diminuição significativa na expressão gênica do marcador no tratamento em ambos os tratamentos.

Por fim, o gene BTG1 (*B-cell translocation gene 1, anti-proliferative*) pertence a uma família de genes supressores tumorais que tem papel na progressão do ciclo celular, diferenciação e apoptose. (S. H. Kim et al., 2022) As deleções do gene

foram relacionadas à resistência ao tratamento com glicocorticoide em LLA, (van Leeuwen et al., 2009) e definem um grupo de alto risco em pacientes que já possuem deleções em IKZF1, por isso seu papel importante nesse subtipo de LLA-B, principalmente no que se refere à regulação da resposta ao tratamento com glicocorticoides. (Scheijen et al., 2017) Neste trabalho, observou-se diminuição significativa na expressão do gene BTG1 na linhagem RS4;11 tanto no tratamento com AU quanto AB. Já a linhagem REH somente apresentou diferença na expressão gênica de BTG1 quando tratada com AU, onde também foi observada diminuição da expressão.

Portanto, considerando o papel de BTG1 e IKZF1 no prognóstico de pacientes com leucemia e seu envolvimento na resistência ao tratamento com glicocorticoides, os resultados aqui apresentados indicam que é necessária uma investigação quanto à possível atividade antagonista das moléculas aqui estudadas com glicocorticoides, dada a importância clínica dos glicocorticoides no tratamento de pacientes com leucemia.

3. Hallmark 3 - Reprogramação do metabolismo celular

Neste trabalho, foi realizada a avaliação da transcriptômica dos modelos estudados, através da análise diferencial da expressão gênica entre as duas linhagens celulares trabalhadas, utilizando dados da base MERAV. O objetivo da análise foi identificar se as expressões gênicas basais de possíveis marcadores poderiam ser as responsáveis pelas diferentes respostas aos tratamentos com AU e AB.

Com relação aos genes mais expressos na linhagem RS4;11, merece destaque a maior expressão de OAT no modelo, pela sua relação com os substratos do ciclo da ureia e o metabolismo celular. Os metabólitos produzidos pelo ciclo da ureia são essenciais para a iniciação e progressão dos tumores e as células tumorais adaptam suas vias metabólicas para atenderem à maior necessidade requerida para a proliferação e o crescimento tumoral. (Tabe et al., 2019) A reprogramação metabólica busca maximizar o uso de nutrientes como nitrogênio e carbono e uma das estratégias utilizadas pelas células tumorais é diminuir o catabolismo e a disponibilidade de nitrogênio e outros aminoácidos importantes, como é o caso da arginina. (Keshet et al., 2018)

A arginina é classificada como um aminoácido semiessencial, pois é sintetizada por indivíduos saudáveis, mas a disponibilização de forma exógena pode ser necessária em condições patológicas. (Keshet et al., 2018) Além disso, o aminoácido pode servir de substrato para a geração de outros componentes celulares importantes como a agmatina, prolina, ornitina e poliaminas. Por isso, a privação de arginina pode auxiliar na terapêutica do câncer através da indisponibilidade desse aminoácido para utilização pelas células tumorais.

O uso de ADI-PEG20 (*pegylated arginine deiminase*) vêm sendo explorado em estudos pré-clínicos e clínicos por sua atividade antitumoral. A enzima, também conhecida como pegarginase, degrada a arginina em citrulina e amônia, depletando os níveis desse aminoácido e diminuindo a produção endógena de arginina pela enzima ASL (*argininosuccinate lyase*). A enzima vem demonstrando resultados promissores nos estudos de sua utilização em monoterapia para o tratamento de tumores sólidos e, em leucemias, há relatos de sua eficácia em estudos de fase clínica II em LMA refratária e linfoma de células T. (Keshet et al., 2018)

O sucesso na reprogramação metabólica reconhecidamente traz vantagens às células tumorais pela melhor utilização dos nutrientes, e o fato de a linhagem RS4;11 apresentar maior expressão gênica de genes envolvidos nesse processo poderia explicar seu melhor aproveitamento metabólico e, por consequência, sua maior capacidade de crescimento e proliferação, e podendo, ainda que de forma parcial, explicar seu pior prognóstico clínico e os valores de IC50 mais altos encontrados com os tratamentos propostos neste trabalho, se comparada à linhagem REH.

Dessa forma, explorar de forma detalhada e buscar entender melhor o papel emergente da reprogramação metabólica nos modelos de leucemia estudados neste trabalho pode elucidar novos alvos terapêuticos e esclarecer mecanismos envolvidos nas terapias atuais.

Dentre as possibilidades que podem fazer com que diferentes tumores apresentem diferentes características fenotípicas, prognósticas e de resposta terapêutica, incluem-se as alterações cromossômicas, a presença de mutações, as características do microambiente tumoral, as alterações pós-traducionais, entre outras. Este trabalho focou principalmente na análise transcricional dos modelos

celulares, tanto experimentalmente (através da avaliação da expressão gênica de CASP3, CASP8, CASP8, BECN1, LC3II, FLT3, IKZF1 e BTG1), quanto dos dados obtidos pela análise *in silico* dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens.

Por conta disso, apesar da expressão gênica normalmente possuir correlação razoável com os níveis obtidos de proteína, (Buccitelli & Selbach, 2020) a interpretação dos resultados aqui apresentados deve ser realizada considerando as limitações inerentes ao método e os diversos fatores que podem resultar em uma possível menor correlação entre a transcriptômica e a proteômica, como as modificações pós-traducionais, *splicing*, miRNA de interferência, degradação do mRNA, entre outros. Por esse motivo, é uma perspectiva desse trabalho tanto a avaliação *in vitro* dos genes aqui encontrados diferencialmente expressos a níveis de mRNA frente aos tratamentos com AU ou AB, como também a análise dos níveis e da atividade de algumas das proteínas avaliadas neste trabalho.

Por fim, deve-se notar que embora AU e AB apresentem relevante atividade antitumoral, suas propriedades farmacocinéticas são prejudicadas por sua alta lipofilia, o que confere às moléculas baixa solubilidade aquosa. Além disso, tal característica pode resultar em sua rápida metabolização e redução da biodisponibilidade, dificultando seu uso terapêutico (H. Chen et al., 2015; Valdés et al., 2016)

Neste sentido, abre-se como perspectiva deste trabalho o desenvolvimento de formas farmacêuticas nanotecnológicas com o objetivo de superar as limitações farmacocinéticas citadas, e assim obter efeitos biológicos com o uso de menores concentrações da molécula. Outra possibilidade é a realização de modificações químicas estruturais nos compostos, buscando o aumento da seletividade, alternativa que vem se mostrando efetiva em diferentes modelos de tumores, conforme demonstrado inclusive por trabalhos do nosso grupo de pesquisa. (da Silva et al., 2021; Willig et al., 2023)

5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Este trabalho foi o primeiro a avaliar a atividade antitumoral dos ácidos ursólico e betúlinico em linhagens de leucemia linfoblástica aguda do tipo B e em modelos com fusão ETV6::RUNX1 e rearranjo KMT2A. Os resultados encontrados demonstram que os tratamentos das linhagens RS4;11 e REH com AU e AB foram capazes de diminuir a viabilidade das células tumorais;
2. A análise do índice de seletividade permitiu identificar uma maior seletividade de AU e AB na linhagem REH em relação à linhagem RS4;11. Ainda, AB se revelou uma molécula mais promissora, face aos resultados aqui apresentados, principalmente no que diz respeito à indução de autofagia e às alterações no ciclo celular evidenciadas na linhagem REH e ausentes na linhagem RS4;11;
3. Os tratamentos com ambas as moléculas causaram a morte celular por apoptose nas linhagens tumorais, porém a autofagia foi identificada apenas na linhagem REH;
4. A análise do ciclo celular permitiu corroborar a indução de apoptose pelo aumento da proporção de células com pouco conteúdo de DNA fragmentado frente aos tratamentos com AU e AB em ambas as linhagens. Ademais, apenas AB foi capaz de causar alterações no ciclo, exclusivamente na linhagem REH;
5. Na avaliação dos fatores prognósticos de LLA-B, FLT3 não apresentou expressão na linhagem REH, enquanto os tratamentos diminuíram a expressão de IKZF1 e de BTG1 somente no tratamento com AU; Já para a linhagem RS4;11, os tratamentos não foram capazes de causar alteração na expressão gênica de FLT3, mas ambos diminuíram a expressão de BTG1, porém, sem trazer alterações nos níveis de IKZF1;
6. A análise do ensaio cometa permitiu identificar que tanto AU quanto AB foram capazes de causar dano ao DNA na linhagem REH, mas não foi demonstrada diferença significativa na linhagem RS4;11;
7. A análise diferencial da expressão gênica dos modelos estudados, obtida através de base de dados, permitiu identificar que a linhagem REH possui níveis basais mais altos de genes envolvidos em processos biológicos importantes para o sucesso da autofagia. Já na linhagem RS4;11, os genes mais altamente

expressos se mostraram envolvidos em vias cruciais para o metabolismo celular, como o ciclo da ureia;

6. PERSPECTIVAS

À luz dos resultados obtidos até o momento, novas perspectivas surgem para complementar o entendimento das hipóteses aqui levantadas:

1. Realizar modificações químicas estruturais em AU e AB, tal como sua veiculação em sistemas nanoestruturados, visando aumentar o IS e superar as limitações farmacocinéticas descritas;
2. Realizar a análise *in vitro* dos níveis e atividade das proteínas para as quais houve alteração da expressão gênica frente aos tratamentos com AU e AB, em especial, IKZF1 e BTG1.
3. Analisar, através de modelos de bioinformática e dinâmica molecular, outros possíveis alvos de AU e AB, além dos já hipotetizados neste trabalho. No mesmo sentido, busca-se confirmar *in silico* a expressão dos genes diferencialmente expressos nos modelos celulares em modelos clínicos;
4. Realizar a análise *in vitro* dos níveis de expressão gênica dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens frente aos tratamentos com AU e AB;
5. Realizar ensaios *in vitro* avaliando a ação de AU e AB em conjunto com glicocorticoides, a fim de melhor elucidar as possíveis implicações clínicas decorrentes das alterações encontradas relativas à alteração da expressão dos marcadores de resistência a esse tratamento;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGGIO, R. *et al.* **The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms** *Leukemia* Springer Nature, , 1 jul. 2022.

ALDOSS, I.; FORMAN, S. J.; PULLARKAT, V. **Acute Lymphoblastic Leukemia in the Older Adult** *J Oncol Pract.* [s.l: s.n.].

ALVAREZ-MEYTHALER, J. G.; GARCIA-MAYEA, Y.; MIR, C.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. **Autophagy Takes Center Stage as a Possible Cancer Hallmark** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 22 out. 2020.

AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (AACR). (2023). Turning Science into Lifesaving Care. **Cancer Progress Report 2020**. Disponível em: <<https://cancerprogressreport.aacr.org/progress/cpr20-contents/cpr20-turning-science-into-lifesaving-care/>> Acesso em: 25 mai. 2023.

AMIRI, S.; DASTGHAIB, S.; AHMADI, M.; MEHRBOD, P.; KHADEM, F.; BEHROUJ, H.; AGHANOORI, M.; MACHAJ, F. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. n. May, 2019.

BARRETO VIANNA, D. R.; GOTARDI, J.; BAGGIO GNOATTO, S. C.; PILGER, D. A. Natural and Semisynthetic Pentacyclic Triterpenes for Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Reality, Challenges and Perspectives. **ChemMedChem**, v. 16, n. 12, p. 1835–1860, 2021.

BHOJWANI, D. *et al.* ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: Improved outcome with contemporary therapy. **Leukemia**, v. 26, n. 2, p. 265–270, fev. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022). Portaria GM/MS nº 330, de 15 de fevereiro de 2022. IN.gov.br. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-330-15-de-fevereiro-de-2022-380761593> Acesso em: 20 mai. 2023.

BROWN, P.; LEVIS, M.; SHURTLEFF, S.; CAMPANA, D.; DOWNING, J.; SMALL, D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. 2005.

BUCCITELLI, C.; SELBACH, M. **mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control** *Nature Reviews Genetics* Nature Research, , 1 out. 2020.

CHAER, F. EL; KENG, M.; BALLEEN, K. K. **MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia** *Current Hematologic Malignancy Reports* Springer, , 1 abr. 2020.

CHANG, J. H. C.; POPPE, M. M.; HUA, C. H.; MARCUS, K. J.; ESIASHVILI, N. Acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 68, n. S2, 1 maio 2021.

CHEN, H.; GAO, Y.; WANG, A.; ZHOU, X.; ZHENG, Y.; ZHOU, J. **Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents***European Journal of Medicinal Chemistry*Elsevier Masson SAS, , 6 mar. 2015.

CHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, Y.; HE, J. Effects of betulinic acid on proliferation and apoptosis in Jurkat cells and its in vitro mechanism. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v. 28, n. 6, p. 634–638, dez. 2008.

DAVIS, A. S.; VIERA, A. J.; MEAD, M. D. Leukemia: An overview for primary care. **American Family Physician**, v. 89, n. 9, p. 731–738, 2014.

DEBNATH, J.; GAMMOH, N.; RYAN, K. M. **Autophagy and autophagy-related pathways in cancer***Nature Reviews Molecular Cell Biology*Nature Research, , 1 ago. 2023.

DEFILIPP, Z. *et al.* Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Updated 2019 Evidence-Based Review from the American Society for Transplantation and Cellular **Therapy***Biology of Blood and Marrow Transplantation*Elsevier Inc., , 1 nov. 2019.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications †. v. 20, n. 29, p. 394–411, 2006.

FILIPPI-CHIELA, E. C.; SILVA, M. M. B.; THOMÉ, M. P.; LENZ, G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099–1113, 1 jan. 2015.

GOLDSMITH, J.; LEVINE, B.; DEBNATH, J. Autophagy and cancer metabolism. *Em: Methods in Enzymology*. [s.l.] Academic Press Inc., 2014. v. 542p. 25–57.

GÓRECKI, M.; KOZIOŁ, I.; KOPYSTECKA, A.; BUDZYŃSKA, J.; ZAWITKOWSKA, J.; LEJMAN, M. **Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia***Biomedicines*MDPI, , 1 mar. 2023.

GUO, W.; XU, B.; WANG, X.; ZHENG, B.; DU, J.; LIU, S. The analysis of the anti-tumor mechanism of ursolic acid using connectively map approach in breast cancer cells line MCF-7. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 3469–3476, 2020.

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions***Cancer Discovery*American Association for Cancer Research Inc., , 1 jan. 2022.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R.; ALI, I.; KHAN, I. A.; ALI, Z.; AL-SADI, A. M.; AHMED, I. Ursolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2012-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 9, p. 1061–1072, 2017.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. N.; SCHEFFLER, A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-potent Plant Extracts. p. 2016–2031, 2016.

JIANG, W.; LI, X.; DONG, S.; ZHOU, W. **Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: Application and research progress** *Biomedicine and Pharmacotherapy* Elsevier Masson s.r.l., , 1 out. 2021.

JUNG, S.; JEONG, H.; YU, S. W. **Autophagy as a decisive process for cell death** *Experimental and Molecular Medicine* Springer Nature, , 1 jun. 2020.

JURKOVICOVA, D.; NEOPHYTOU, C. M.; GAŠPAROVIĆ, A. Č.; GONÇALVES, A. C. **DNA Damage Response in Cancer Therapy and Resistance: Challenges and Opportunities** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, , 1 dez. 2022.

KACZMARSKA, A.; DEREBAS, J.; PINKOSZ, M.; NIEDŹWIECKI, M.; LEJMAN, M. **The Landscape of Secondary Genetic Rearrangements in Pediatric Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;21)Cells** MDPI, , 1 fev. 2023.

KAPLAN, J. B.; GRISCHENKO, M.; GILES, F. J. **Blinatumomab for the treatment of acute lymphoblastic leukemia** *Investigational New Drugs* Springer New York LLC, , 1 dez. 2015.

KARPOVA, M. B.; SANMUN, D.; HENTER, J. I.; SMIRNOV, A. F.; FADEEL, B. Betulinic acid, a natural cytotoxic agent, fails to trigger apoptosis in human Burkitt's lymphoma-derived B-cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 1, p. 246–252, 1 jan. 2006.

KASHYAP, D.; GARG, V. K.; GOEL, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Em: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 125p. 73–120.

KESHET, R.; SZLOSAREK, P.; CARRACEDO, A.; EREZ, A. **Rewiring urea cycle metabolism in cancer to support anabolism** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 1 out. 2018.

KIM, S. H.; JUNG, I. R.; HWANG, S. S. **Emerging role of anti-proliferative protein BTG1 and BTG2** *BMB Reports* The Biochemical Society of the Republic of Korea, , 2022.

LADIKOU, E. E.; ASHWORTH, I.; SEVIAR, D.; CHEVASSUT, T. Acute leukaemia: no reason to panic. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 22, n. 3, p. 221–224, 1 maio 2022.

LEEUVEN, F. N. VAN *et al.* BTG1, a Gene Frequently Deleted in Pre-B ALL, Controls Glucocorticoid Receptor-Mediated Gene Expression. **Blood**, v. 114, n. 22, p. 3458–3458, 20 nov. 2009.

LI, C.; HAO, Z.; BO, G.; ZHENG, G. Clinical efficacy of platelet transfusion therapy in patients with leukemia and analysis of risk factors for ineffective transfusion. **Oncology Letters**, v. 19, n. 3, p. 2554–2561, 2020.

LI, G.; ZHOU, T.; LIU, L.; CHEN, J.; ZHAO, Z.; PENG, Y.; LI, P.; GAO, N. Ezrin dephosphorylation/downregulation contributes to ursolic acid-mediated cell death in human leukemia cells. **Blood Cancer Journal**, v. 3, n. 4, abr. 2013.

LIGASOVÁ, A.; FRYDRYCH, I.; KOBERNA, K. **Basic Methods of Cell Cycle Analysis***International Journal of Molecular Sciences*MDPI, , 1 fev. 2023.

MALARD, F.; MOHTY, M. **Acute lymphoblastic leukaemia***The Lancet*Lancet Publishing Group, , 4 abr. 2020.

MARKE, R. *et al.* **Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia***Leukemia*Nature Publishing Group, , 1 jul. 2016.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; BRUIN, R. A. M. DE. **Cell cycle control in cancer***Nature Reviews Molecular Cell Biology*Nature Research, , 1 jan. 2022.

MENG, J.; WANG, J. **Role of SNARE proteins in tumourigenesis and their potential as targets for novel anti-cancer therapeutics***Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*Elsevier, , 1 ago. 2015.

MENON, M. B.; DHAMIJA, S. **Beclin 1 phosphorylation - at the center of autophagy regulation***Frontiers in Cell and Developmental Biology*Frontiers Media S.A., , 12 out. 2018.

MERLI, P.; ALGERI, M.; BUFALO, F. DEL; LOCATELLI, F. **Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia***Current Hematologic Malignancy Reports*Current Science Inc., , 15 abr. 2019.

MULLIGHAN, C. G. *et al.* Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia . **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 5, p. 470–480, 29 jan. 2009.

MULLIGHAN, C. G Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest.** 2012;122(10):3407-3415. doi:10.1172/JCI61203

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). NCI funding approved to expand research on immunoprevention, natural products. Disponível em: <<https://prevention.cancer.gov/news-and-events/blog/nci-funding-approved-expand-research-immunoprevention-natural-products>>. Acesso em: 8 ago. 2023.

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*American Chemical Society, , 27 mar. 2020.

NISHIMURA, T.; TOOZE, S. A. **Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation***Cell Discovery*Springer Nature, , 1 dez. 2020.

OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA. Mortalidade por leucemias. Disponível em: https://observatoriodeoncologia.com.br/mortalidade_leucemias/. Acesso em: 01 ago. 2023.

OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA. Tratamento quimioterápico da leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes no SUS. Disponível em:

<https://observatoriodeoncologia.com.br/tratamento-quimioterapico-da-leucemia-linfoide-aguda-em-criancas-e-adolescentes-no-sus/>. Acesso em: 01 ago. 2023.

PARK, C.; JEONG, J. W.; HAN, M. H.; LEE, H.; KIM, G. Y.; JIN, S.; PARK, J. H.; KWON, H. J.; KIM, B. W.; CHOI, Y. H. The anti-cancer effect of betulinic acid in u937 human leukemia cells is mediated through ROS-dependent cell cycle arrest and apoptosis. **Animal Cells and Systems**, v. 25, n. 2, p. 119–127, 2021.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2016.

PICIOCCHI, A. *et al.* Prognostic Impact of t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1-Positivity in 926 BCR-ABL1-Negative B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated in Gimema Clinical Trials Since 1996. **Blood**, v. 134, n. Supplement_1, p. 1469, 13 nov. 2019.

POLAK, R.; BIERINGS, M. B.; LEIJE, C. S. VAN DER; SANDERS, M. A.; ROOVERS, O.; MARCHANTE, J. R. M.; BOER, J. M.; CORNELISSEN, J. J.; PIETERS, R.; BOER, M. L. DEN; BUITENHUIS, M. Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 104, n. 4, p. 738–748, 31 mar. 2019.

REUVERS, T. G. A.; KANAAR, R.; NONNEKENS, J. DNA damage-inducing anticancer therapies: From global to precision damage. **Cancers**. MDPI AG, , 1 ago. 2020.

RONSON, A.; TVITO, A.; ROWE, J. M. Treatment of Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults **Current Oncology Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 jun. 2016.

SHI, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. **Protein Science**, v. 13, n. 8, p. 1979–1987, ago. 2004.

SHORT, N. J.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. Optimizing the treatment of acute lymphoblastic leukemia in younger and older adults: new drugs and evolving paradigms. **Leukemia**. Springer Nature, , 1 nov. 2021.

ŚLIWA-TYTKO, P.; KACZMARSKA, A.; LEJMAN, M.; ZAWITKOWSKA, J. Neurotoxicity Associated with Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia Chemotherapy and Immunotherapy **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 maio 2022.

SPIVAK, J. L.; GASCÓN, P.; LUDWIG, H. Anemia Management in Oncology and Hematology. **The Oncologist**, v. 14, n. S1, p. 43–56, 1 set. 2009.

STANULLA, M.; ÈNE CAVÉ, H. ; CAVÉ, C.; MOORMAN, A. V. **Blood Spotlight IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker?** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/4/252/1558279/bloodbld2019000813c.pdf>>.

STEIN, A.; FRANKLIN, J. L.; CHIA, V. M.; ARRINDELL, D.; KORMANY, W.; WRIGHT, J.; PARSON, M.; AMOUZADEH, H. R.; CHOUDHRY, J.; JOSEPH, G. **Benefit–Risk Assessment of Blinatumomab in the Treatment of Relapsed/Refractory B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia** *Drug Safety* Springer International Publishing, , 1 maio 2019.

TABE, Y.; LORENZI, P. L.; KONOPLEVA, M. **Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/134/13/1014/1222984/blood.bld.2019001034c.pdf>.

TEBBI, C. K. **Etiology of acute leukemia: A review** *Cancers* MDPI, , 1 maio 2021.

THORBURN, A.; THAMM, D. H.; GUSTAFSON, D. L. **Autophagy and cancer therapy** *Molecular Pharmacology* American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, , 2014.

TRUJILLO, Á. M.; LINARES, A.; SARMIENTO, I. C. Intensive chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. Interim analysis in a referral center in Colombia. **Revista Facultad de Medicina**, v. 64, n. 3, p. 417–425, 2016.

VALDÉS, K.; MORALES, J.; RODRÍGUEZ, L.; GÜNTHER, G. **Potential use of nanocarriers with pentacyclic triterpenes in cancer treatments** *Nanomedicine* Future Medicine Ltd., , 1 dez. 2016.

VESSONI, A. T.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; MENCK, C. F. M.; LENZ, G. **Autophagy and genomic integrity** *Cell Death and Differentiation*, nov. 2013.

WOŹNIAK, Ł.; SKAŃSKA, S.; MARSZAŁEK, K. **Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities** *Molecules* MDPI AG, , 19 nov. 2015.

YUN, C. W.; LEE, S. H. **The roles of autophagy in cancer** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 5 nov. 2018.

ZAFAR, S.; KHAN, K.; HAFEEZ, A.; IRFAN, M.; ARMAGHAN, M.; RAHMAN, A. UR; GÜRER, E. S.; SHARIFI-RAD, J.; BUTNARIU, M.; BAGIU, I. C.; BAGIU, R. V. **Ursolic acid: a natural modulator of signaling networks in different cancers** *Cancer Cell International* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2022.

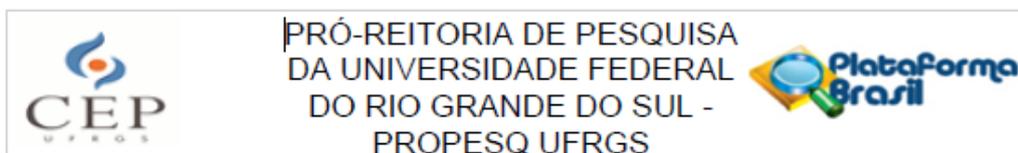
ZHANG, X.; ZHU, L.; ZHANG, H.; CHEN, S.; XIAO, Y. **CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 10 jun. 2022.

ZHAO, X. *et al.* Epigenetic activation of the FLT3 gene by ZNF384 fusion confers a therapeutic susceptibility in acute lymphoblastic leukemia. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

8. ANEXOS

ANEXO I – Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Seres Humanos

A seguir, estão apresentadas a primeira e última página do parecer.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antitumoral dos ácidos betunílico, ursólico e derivados em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda

Pesquisador: Diogo André Pilger

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54509621.9.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.230.750

Apresentação do Projeto:

Trata-se da análise do retorno de diligência do projeto de mestrado "Avaliação da atividade antitumoral dos ácidos betunílico, ursólico e derivados em linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (CAAE: 54509621.9.0000.5347)", de Leticia Terres Rodrigues (aluna do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade federal do Rio Grande do Sul, UFRGS), sob orientação do Prof. Dr. Diogo André Pilger e co-orientação da Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto.

POR SE TRATAR DE RETORNO DE DILIGÊNCIA, OS TEXTOS APRESENTAÇÃO, OBJETIVOS, E RISCOS E BENEFÍCIOS DA PESQUISA FORAM TRANSCRITOS DO PARECER ANTERIOR.

Segundo os pesquisadores, são diversos os relatos sobre a atividade antitumoral dos ácidos ursólico e betunílico, assim como seus derivados, frente a diferentes tipos de tumores. Com relação aos tumores hematológicos, as análises anteriores realizadas pelo grupo de pesquisa, juntamente com o grupo coordenado pela professora Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto, encontraram efeitos antileucêmicos do ácido betunílico e ursólico e seus derivados semissintéticos em linhagem celular de leucemia mieloide crônica (K562), sendo esses resultados promissores e coincidentes com os previamente demonstrados para a mesma linhagem de leucemia mieloide

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 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



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



Continuação do Parecer: 5.230.750

Ausência	TCLE.pdf	22/12/2021 09:23:22	Diogo André Pilger	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	22/12/2021 09:22:28	Diogo André Pilger	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 08 de Fevereiro de 2022

Assinado por:

Patrícia Daniela Melchiors Angst
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 311 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